

Facteurs d'initiation eIF4 : du développement embryonnaire de l'oursin à la leucémie lymphoïde chronique

par Hussam Saad^{*,**}, Robert Bellé^{*}, Julia Morales^{*}, Bertrand Cosson^{*}, Odile Mulner-Lorillon^{*}, Christian Berthou^{**} & Patrick Cormier^{*}

^{*} Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer & Santé ; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 ; Équipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique, Roscoff, F-29682 France ; ^{**} Laboratoire de Thérapie cellulaire et d'Immunologie-Biologie du Cancer, CHU Morvan, Université de Bretagne Ouest, BP 824, F-29609 Brest cedex, France.

Correspondance : Docteur Hussam Saad Station Biologique, place George Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tél. : +33 (0) 2 98 29 23 66. Fax : +33 (0) 2 98 29 23 06. E-mail : saad@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

La traduction des ARNm est une étape régulatrice importante de l'expression des gènes au cours de différents mécanismes physiologiques et physiopathologiques, incluant la prolifération cellulaire et l'apoptose. Parmi les maladies du cycle cellulaire, la leucémie lymphoïde chronique B-CD5⁺ (LLC) est caractérisée par une perte de l'apoptose. Les protéines eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) et 4E-BPs (eIF4E Binding Proteins), qui jouent un rôle important dans la régulation traductionnelle, ont récemment été impliquées dans les mécanismes de survie et d'apoptose. Nos études ciblant ces acteurs au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin nous ont permis de souligner leur importance pour l'entrée

dans le cycle cellulaire en réponse à la fécondation. Dans ce modèle, la dégradation de 4E-BP représente un nouveau mécanisme de contrôle de la traduction et doit être pris en compte dans d'autres mécanismes physiologiques et physiopathologiques. L'ensemble des données permet de proposer les facteurs eIF4 comme cible potentielle pour de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer en général et contre la LLC en particulier. Cette revue met en évidence l'apport du modèle biologique du développement précoce de l'oursin dans cet axe de recherche qui associe de façon originale une équipe de recherche de biologie cellulaire et une équipe médicale spécialisée dans la cancérologie de la leucémie lymphoïde chronique B-CD5⁺.

SUMMARY Initiation factors eIF4: from sea urchin embryonic development to chronic lymphocytic leukemia

mRNA translation is now recognized as a important regulatory step for gene expression in different physiological and pathophysiological processes including cell proliferation and apoptosis. B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is characterized by the accumulation of resting lymphocytes and defective apoptosis. The mRNA cap-binding protein eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) and its repressor 4E-BP (eIF4E Binding protein) are crucial translational regulators that have been involved in survival and apoptosis processes of cells. We have shown that

the release of eIF4E from its translational repressor 4E-BP is an important event for the first mitotic division triggered by fertilization and that the degradation of 4E-BP is a new means to regulate 4E-BP function that has to be analyzed in other physiological and pathophysiological processes. In this chapter, we describe recent advances illustrating the importance of eIF4E and 4E-BP in cancer processes, suggesting that these actors can be targeted for potential therapy against cancer in general and LLC in particular.

INTRODUCTION

La traduction protéique est une étape importante dans la régulation de l'expression des gènes, et ceci dans différents mécanismes physiologiques et/ou physiopathologiques comme l'apoptose (Holcik & Sonenberg, 2005 ;

Morley *et al.*, 2005) et la prolifération cellulaire (revue dans Clemens, 2004 ; Mamane *et al.*, 2004).

Les facteurs de la traduction protéique, qu'ils soient impliqués dans la phase d'initiation ou liés à la phase d'élongation, en réponse à divers stimuli, participent à la traduction spécifique d'éléments régulateurs du cycle cel-

lulaire (Cormier, 2000). Une expression aberrante d'un de ces facteurs peut donc conduire vers la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. Comprendre comment ces facteurs de traduction sont contrôlés et comment ils peuvent influencer le bon fonctionnement de la cellule représentent des objectifs importants en recherche fondamentale. Les points de contrôle de la traduction nouvellement identifiés sont autant de cibles thérapeutiques potentielles contre les mécanismes de transformation de cellules saines en cellules cancéreuses.

Le développement embryonnaire précoce de l'oursin est caractérisé par une levée d'inhibition de la synthèse protéique impliquant une régulation drastique de la machinerie de la traduction. Cette synthèse protéique est indispensable pour l'entrée dans le cycle cellulaire de l'embryon d'oursin qui se caractérise ensuite par une alternance rapide de phases S (synthèse d'ADN) et M (mitose). Ce modèle expérimental est donc optimal pour l'étude des relations entre la régulation traductionnelle et le cycle cellulaire offrant l'opportunité de développer une action transversale pour lutter contre le cancer. Nos approches actuelles se sont concentrées sur des régulations traductionnelles chez l'oursin impliquant les facteurs d'initiation eIF4. D'un côté, nous avons mis en évidence des régulations originales de ces facteurs dans le modèle oursin. D'un autre côté, dans les cellules de mammifères, ces facteurs sont associés à diverses pathologies du cycle cellulaire affectant soit la prolifération soit l'apoptose. La leucémie lymphoïde chronique CD5⁺ (LLC CD5⁺) est une pathologie qui se caractérise au niveau cellulaire par une perte de l'apoptose. Dans le cadre de cette recherche transversale, nous nous intéressons actuellement à l'implication potentielle dans la LLC des mécanismes de contrôle des facteurs eIF4 identifiés chez l'oursin.

Dans cette revue, nous présenterons dans un premier temps les niveaux de contrôle actuellement considérés comme les plus importants dans la régulation traductionnelle. En identifiant les acteurs qui permettent de comprendre les liens entre la synthèse protéique et le cycle cellulaire, nous expliquerons l'apport des connaissances acquises sur l'embryon d'oursin à cette thématique. Nous verrons enfin comment ces acteurs et leur contrôle représentent des cibles intéressantes pour lutter contre le cancer en général et contre la LLC CD5⁺ en particulier.

L'INITIATION DE LA TRADUCTION COIFFE-DÉPENDANTE EST UNE ÉTAPE RÉGULATRICE PRÉPONDÉRANTE DANS LA PRODUCTION DES PROTÉINES

La régulation de la synthèse protéique, qui intervient après et affine le contrôle exercé lors de la transcription, représente une étape importante de l'expression des gènes. Un contrôle efficace de la traduction d'ARNm aboutit à des modulations rapides des quantités de protéines dans un contexte temporel et spatial à l'échelle de

la cellule et des tissus. La traduction se déroule classiquement en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Fig. 1). Bien que des contrôles puissent s'appliquer à chacune de ces trois phases, l'initiation de la synthèse protéique est reconnue comme une phase régulatrice primordiale de la synthèse protéique. La majorité des ARNm eucaryotes sont traduits de façon dépendante de la coiffe m⁷GTP présente à leur extrémité 5' (Von Der Haar *et al.*, 2004). L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation (eIFs: eukaryotic Initiation Factors) permet de recruter la sous-unité 40S en 5'UTR des ARNm. Cette étape fait intervenir au moins onze facteurs protéiques (Gingras *et al.*, 1999) dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé pour réguler l'initiation de la traduction (Fig. 2A).

La protéine eIF4E lie la coiffe m⁷GTP des ARNm (Gingras *et al.*, 1998) à d'autres eIFs et protéines régulatrices (Richter & Sonenberg, 2005). Trois isoformes d'eIF4E, dont les rôles respectifs sont inconnus, ont été identifiées chez les mammifères. La protéine eIF4G de haut poids moléculaire (220 kDa) s'associe à eIF4E et

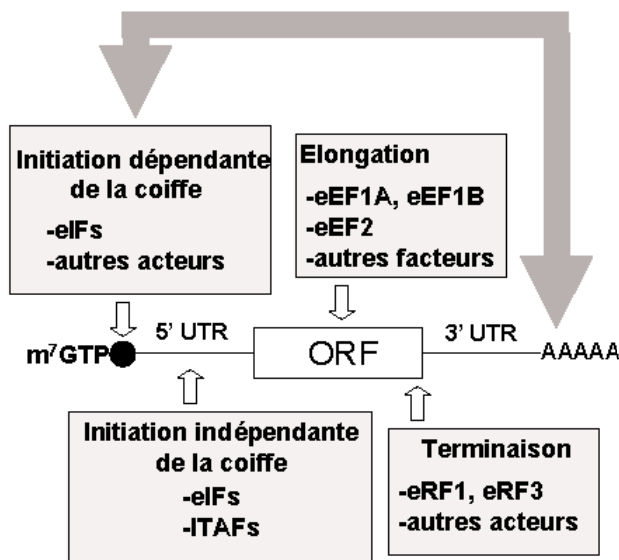


FIG. 1. – Ce schéma représente les étapes clés de la régulation traductionnelle avec les facteurs de traduction concernés. L'ARNm est symbolisé avec la coiffe m⁷GTP par où la traduction « cap-dépendante » est initiée. Les régions non traduites en 5' (UnTranslated Region) peuvent être la cible de recrutement interne des ribosomes (IRES). La phase de lecture ouverte (ORF) commence à l'AUG initiateur à partir duquel la phase d'élongation synthétise le polypeptide et s'arrête au codon stop. À ce niveau les facteurs de terminaison libèrent les ribosomes. Il est important de noter que la traduction peut être contrôlée spécifiquement par des signaux cis contenus dans les régions non traduites en 5' et 3' de l'ARNm et reconnues par des protéines transrégulatrices. De plus, la protéine PABP permet de proposer le modèle en boucle (flèche grise) qui relie la coiffe à la queue poly(A). (d'après Morales *et al.*, 2006; Oulhen & Cormier, 2006).

Abbreviations : eEF : eukaryotic Elongation Factor ; eIF : eukaryotic Initiation Factor ; eRF : eukaryotic Releasing Factor ; ITAFs : IRES Trans Acting Factors ; ORF : Open Reading Frame ; UTR : UnTranslated Region.

recrute des partenaires tels qu'eIF4A, eIF3 et PABP (Fig. 2A). Il existe deux isoformes d'eIF4G de mammifères (Gingras *et al.*, 1999). Le facteur eIF3 recrute la sous-unité 40S et permet de faire le lien entre cette petite sous-unité ribosomique et la coiffe m⁷GTP. La protéine PABP (*Poly-Adenylated Binding Protein*) se lie à la queue polyA des messagers et relie les parties 3' et 5'UTR (Kahvejian *et al.*, 2005). Le facteur eIF4A (46 kDa) lie eIF4G. Ce facteur utilise son activité ARN hélicase pour défaire les structures secondaires en 5'UTR des ARNm et faciliter le déplacement de 40S sur l'ARNm. L'activité RNA hélicase d'eIF4A est faible lorsque la protéine est isolée (Rogers *et al.*, 2001) et est significativement stimulée par la protéine ubiquitaire eIF4B. Chez les mammifères, il existe trois isoformes d'eIF4A (Gingras *et al.*, 1999).

Lorsque la traduction dépendante de la coiffe m⁷GTP est inhibée dans des mécanismes physiologiques telle que la mitose ou l'infection virale, un mécanisme alternatif de synthèse protéique se met en place (Fig. 2). Dans ces cas, les ARNm concernés sont recrutés dans les polysomes par l'intermédiaire de sites internes d'entrée des ribosomes appelées IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Fig. 2B).

L'obtention récente du génome de l'oursin (*Sea urchin* sequencing consortium, 2006) nous a permis d'annoter l'ensemble des facteurs de traduction dans cet organisme et a révélé que la majorité des facteurs protéiques contrô-

lant la régulation traductionnelle est codée par des gènes non redondants (Morales *et al.*, 2006). Cette obtention représente un avantage pour les approches fonctionnelles. Ainsi les 3 classes d'eIF4E existent chez l'oursin alors que 4E-BP et eIF4G ne sont codés respectivement que par un seul gène. L'analyse du génome de l'oursin nous a aussi permis de montrer l'existence de gènes homologues à plusieurs ITAFs (*IRES Trans Acting Factors*) impliqués dans la traduction des protéines en apoptose (p97/DAP5, *PTB polypyrimidine tract protein*, PCBP *PolyC binding protein*) (Morales *et al.*, 2006).

La traduction dépendante de la coiffe est implicitement contrôlée par la disponibilité d'eIF4E à ces différents partenaires. La compréhension des niveaux de contrôle de cette disponibilité est donc très importante.

RÉGULATION DE LA DISPONIBILITÉ D'eIF4E

L'accessibilité d'eIF4E pour former le complexe actif eIF4F est une étape primordiale dans le processus d'initiation de la synthèse protéique. La formation du macro-complexe eIF4F est contrôlée par une famille de petites protéines, suppresseurs de la traduction, appelées 4E-BPs (*eIF4E Binding Proteins*) (revue dans Gingras *et al.*, 1999). Chez les mammifères, trois isoformes 4E-BPs ont été décrites, respectivement 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3. La protéine 4E-BP1 (nommée aussi PHAS-I pour *Phosphorylated Heat-and Acid-Stable protein, Insulin stimulated*) est de loin la plus étudiée. Les 4E-BPs n'inhibent pas la liaison d'eIF-4E sur la coiffe mais ils bloquent la formation du complexe eIF4F par compétition avec eIF-4G sur le même site de liaison d'eIF-4E (Haghighat *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995). 4E-BP et eIF4G représentent donc deux protéines qui s'associent à eIF4E mais qui possèdent deux activités antagonistes sur la synthèse protéique dépendante de la coiffe, avec une stimulation pour eIF4G et une inhibition pour 4E-BP (Fig. 3). La liaison des 4E-BPs sur eIF4E est réversible et l'affinité des 4E-BPs pour eIF-4E est régulée selon leur état de phosphorylation (Fig. 4). Ainsi, la forme hypophosphorylée de 4E-BP1 interagit fortement avec eIF-4E tandis que la forme hyperphosphorylée se dissocie d'eIF-4E (Gingras *et al.*, 1998). La phosphorylation de 4E-BP1 est dépendante de FRAP/mTOR (FKBP12 and *Rapamycin-Associated Protein/mammalian Target Of Rapamycin*) qui est un effecteur agissant en aval de la voie de signalisation PI3K/Akt kinase (*PhosphoInositide 3'-OH kinase*) (Gingras *et al.*, 2001).

Les œufs d'oursins contiennent le facteur eIF4E, associé à une protéine de type 4E-BP. La fécondation provoque une diminution de l'association eIF4E/4E-BP corrélée à une hyperphosphorylation de 4E-BP ce qui entraîne la dé-répression de eIF4E et l'augmentation de la traduction cap-dépendante (Cormier *et al.*, 2001). D'une manière intéressante, la levée de l'inhibition de la traduction fait intervenir de façon originale la dégradation rapide de 4E-BP, dans un mécanisme sensible à la rapamycine, drogue immunosuppressive et antiproliféra-

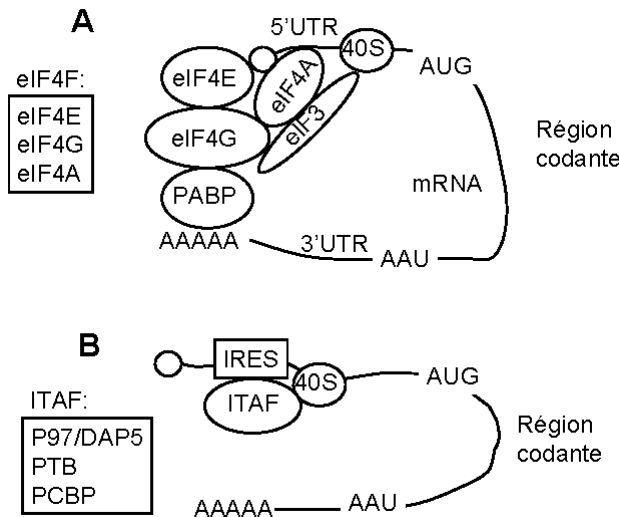


FIG. 2. – Synthèse protéique dépendante ou non de la coiffe m⁷GTP des ARNm. (A) Le modèle en boucle et la synthèse protéique dépendante de la coiffe. eIF4E lie la coiffe des ARNm. La protéine eIF4E fait partie du complexe eIF4F (eIF4E-eIF4G-eIF4A). eIF4G recrute les autres protéines. eIF4A défait les structures secondaires en 5'UTR (UnTranslated Region) des ARNm. eIF3 recrute la petite sous-unité ribosomique 40S sur l'ARNm. eIF4G s'associe également à PABP (*Poly-Adenylated Binding Protein*) pour stimuler la traduction des ARNm polyadénylés (AAAAA) en 3'UTR. (B) Traduction indépendante de la coiffe. Une séquence IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) présente dans la région 5' UTR de l'ARNm permet un recrutement direct du ribosome par l'intermédiaire d'ITAFs (*IRES Trans Acting Factors*) et permet la traduction indépendamment de la coiffe.

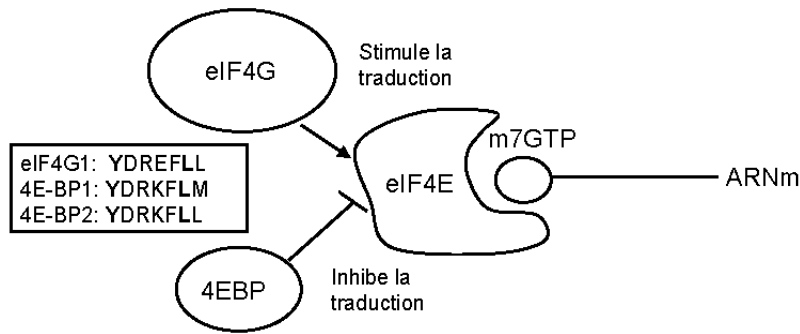


FIG. 3. – 4E-BP et eIF4G s'associe de façon compétitive à la protéine eIF4E qui lie la coiffe m⁷GTP des ARNm, pour réguler l'initiation de la traduction. Les isoformes humaines eIF4G (par exemple eIF4G1) et 4E-BP (par exemple 4E-BP1 et 4E-BP2) sont capables de lier eIF4E par leur motif consensus YXXXXLφ (où φ est un acide aminé aliphatique).

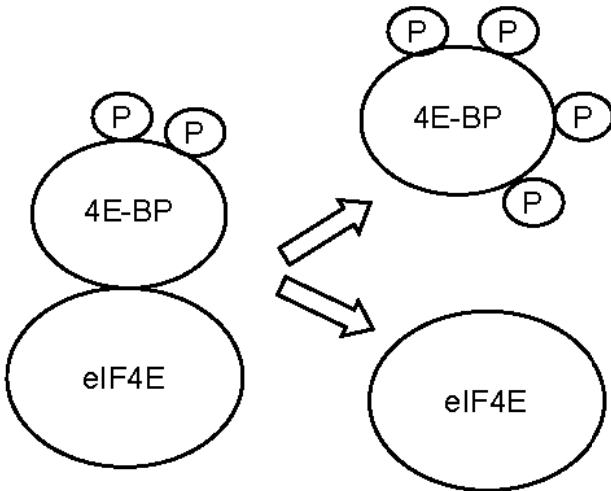


FIG. 4. – Contrôle de la libération d'eIF4E. Pour être actif, eIF4E doit être libéré de son inhibiteur 4E-BP (*eIF4E-Binding-Protein*). La phosphorylation de 4E-BP est reconnue pour être un moyen de contrôle de la libération d'eIF4E. 4E-BP hypophosphorylé s'associe fortement alors que la forme hyperphosphorylée se dissocie de eIF4E.

tive (Salaün *et al.*, 2003). L'introduction par micro-injection d'un peptide correspondant à la séquence minimale de liaison à eIF4E affecte la première division mitotique induite par la fécondation de manière analogue au traitement à la rapamycine (Salaün *et al.*, 2005, Oulhen *et al.*, 2007). La libération rapide d'eIF4E de son inhibiteur 4E-BP est rapidement suivie du recrutement de la protéine eIF4G (Oulhen *et al.*, 2007) impliquant la traduction dépendante de la coiffe m⁷GTP dans le contrôle de la première division mitotique de l'embryon.

L'analyse de la machinerie de la traduction chez l'oursin a ainsi permis d'obtenir des résultats originaux qui doivent maintenant être pris en considération dans les autres modèles. La dégradation de 4E-BP mise en évidence chez l'oursin souligne le rôle de la stabilité de cette protéine dans la régulation traductionnelle et représente un nouveau mécanisme de contrôle de la disponibilité de la protéine eIF4E. De plus, le modèle oursin a permis de montrer que le niveau de la protéine 4E-BP est sous contrôle de voies de signalisation en réponse à l'endommagement de l'ADN ou de conditions hypoxi-

ques (Le Bouffant *et al.*, 2006). Ce niveau de contrôle mis en évidence chez l'oursin est maintenant reconnu et le turnover de la protéine 4E-BP est en cours d'étude dans des lignées cellulaires humaines. Une protéine de haut poids moléculaire suggérant des modifications post-traductionnelles de 4E-BP a aussi été mise en évidence (Salaün *et al.*, 2005). Il est à noter que l'existence d'un 4E-BP de haut poids moléculaire, résultat de poly-ubiquitination, a récemment été montrée dans des cellules de mammifères (Clemens M., communication personnelle), suggérant que la dégradation de 4E-BP d'oursin et la forme haute sont associées à des mécanismes conservés au cours de l'évolution. Des modifications post-traductionnelles importantes de la protéine eIF4G après fécondation ont aussi été identifiées pour la première fois dans le système oursin (Oulhen *et al.*, 2007).

L'ensemble des modifications post-traductionnelles, dont les facteurs de traduction eIF4 sont la cible, suggère que ces acteurs de la synthèse protéique sont contrôlés finement et rapidement au cours de la vie de la cellule. L'étroite relation entre ces contrôles et le cycle cellulaire renforce encore l'importance de ces acteurs moléculaires dans la physiologie de la cellule.

TRADUCTION DÉPENDANTE DE LA COIFFE M⁷GTP ET CYCLE CELLULAIRE

Il existe un lien étroit entre la traduction et le cycle cellulaire (revue dans Cormier *et al.*, 2003 ; Le Breton *et al.*, 2005). La synthèse protéique se retrouve à la fois en amont du cycle cellulaire puisqu'elle est indispensable à son déroulement et en aval puisqu'elle est modifiée au cours du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se compose de 4 phases : G₁, S, G₂ et M. Les phases G₁ (gap1), S (synthèse d'ADN), G₂ (gap2) préparent les cellules à la division lors de la mitose (phase M). Ces étapes sont contrôlées par les CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*) qui sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation de toute division cellulaire en association avec leurs partenaires, les cyclines. La transition G₂/M est sous contrôle du MPF (*Maturation Promoting Factor*) constitué d'une sous-unité catalytique CDK1 et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B. De manière intéressante, la traduction de la cycline B est sous contrôle de la voie dépendante de la coiffe m⁷GTP dans

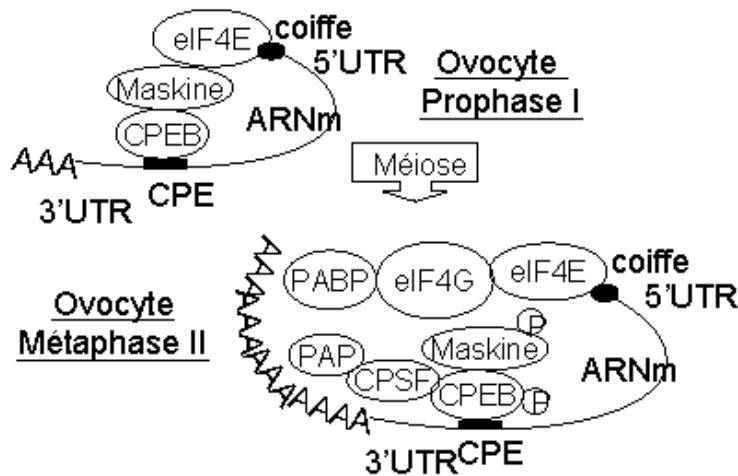
différents modèles (*cf.* Oulhen *et al.*, dans le même volume). Cependant, en fonction du processus physiologique, des différences dans les mécanismes de contrôle peuvent être observées. Ainsi, la libération d'eIF4E de son répresseur 4E-BP est une étape importante pour la première division mitotique de l'embryon d'oursin (Salaün *et al.*, 2005). En revanche, pour la seconde division méiotique de l'ovocyte d'étoile de mer (Lapasset *et al.*, 2005) et la première division méiotique de l'ovocyte de xénope (Fig. 5), le mécanisme de polyadénylation de l'ARNm codant pour la cycline B est le facteur limitant et nécessite l'intervention d'acteurs transrégulateurs telle que la protéine CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding*) (revue dans Oulhen & Cormier, 2006).

Le gène codant pour eIF4E a été identifié comme un gène régulateur du cycle cellulaire et a été nommé CDC33

(*Cell Division Control 33*). La séquestration d'eIF4E par son répresseur 4E-BP1 hypophosphorylé a été corrélée à une baisse de synthèse protéique dépendante de la coiffe m⁷GTP durant la phase de mitose et en revanche à un recrutement privilégié par les IRES (Pyronnet *et al.*, 2001). Cependant, à l'inverse, certaines équipes montrent la phosphorylation de 4E-BP1 et la dissociation des deux protéines en mitose (Heesom *et al.*, 2001). De plus, la protéine 4E-BP1 est hyperphosphorylée par un mécanisme CDK1 dépendant, en présence d'une drogue utilisée en chimiothérapie (Greenberg *et al.*, 2005). La kinase responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 en mitose reste à identifier.

De manière intéressante, la protéine 14-3-3 σ qui joue un rôle important dans divers aspects du cycle cellulaire (progression dans le cycle, points de contrôle liés à

A Maturation méiotique (Xénope)



B Fécondation (Oursin)

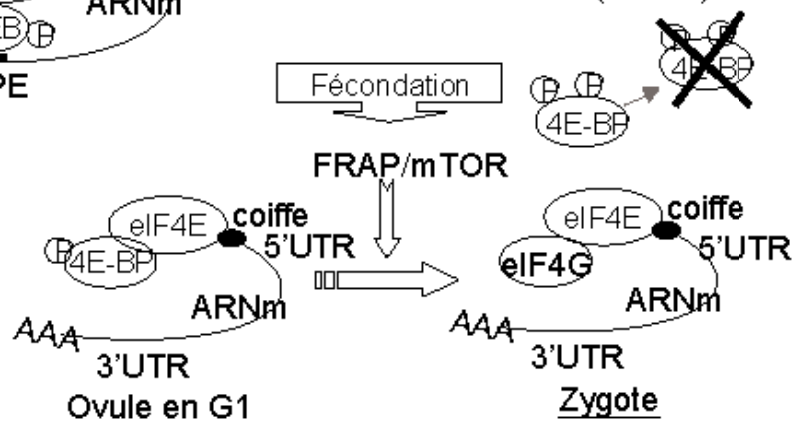


FIG. 5. – Des différences dans les mécanismes de contrôle de la synthèse protéique dépendante de la coiffe peuvent exister. (A) Polyadénylation et recrutement d'ARNm au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope. Dans l'ovocyte de xénope, avant la maturation méiotique induite par la progestérone, la traduction est réprimée par une protéine appelée Maskine qui limite le recrutement d'eIF4G sur eIF4E. La Maskine est aussi liée à CPEB qui interagit en 3'UTR avec des ARNm tel que celui codant pour la Cycline B. La progestérone induit la reprise des synthèses protéiques après induction d'une voie de phosphorylation de CPEB et Maskine. La phosphorylation de CPEB stabilise l'association de CPSF qui recrute PAP, la polymérase responsable de l'allongement de la queue poly (A) de l'ARNm. La protéine PABP s'associe à la queue poly (A) néosynthétisée et à eIF4G. Ce complexe déplace la Maskine d'eIF4E. La protéine eIF4G associée à eIF4E peut alors participer au recrutement d'ARNm contrôlé de manière dépendante de la coiffe. Ce mécanisme permet le recrutement spécifique d'un ARNm dans la machinerie de traduction. (B) Dégradation de 4E-BP en réponse à la fécondation chez l'oursin. Avant la fécondation chez l'oursin, eIF4E est lié à 4E-BP. La fusion des gamètes active la kinase FRAP/mTOR. Le répresseur 4E-BP est alors rapidement phosphorylé et dégradé. Après fécondation, eIF4E est disponible pour des partenaires tel que eIF4G qui permettra de stimuler la synthèse protéique dépendante de la coiffe des ARNm. (d'après Oulhen & Cormier, 2006). Ce mécanisme est principalement impliqué dans un recrutement global des ARNm dans les polysomes.

l'endommagement de l'ADN) et l'apoptose est aussi impliquée dans la régulation de la traduction en phase M (Wynshaw-Boris, 2007). Durant la mitose, 14-3-3 σ lie plusieurs protéines, dont eIF4B qui est nécessaire pour l'activité traductionnelle dépendante de la coiffe m⁷GTP. Cette association inhibe l'activité traductionnelle au profit de la traduction dépendante des IRES et interviendrait dans le contrôle de la synthèse protéique au cours du cycle cellulaire.

La compréhension des relations subtiles existant entre l'activité traductionnelle et le cycle cellulaire reste un des points de recherche fondamentale clés à éclaircir. Cette inter-relation souligne de plus le rôle potentiel que peuvent jouer ces acteurs de la traduction dans les mécanismes de cancérisation.

eIF4E ET CANCER

Il existe un nombre croissant de rapports cliniques et fondamentaux qui illustrent la surexpression anormale des facteurs d'initiation eIFs (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3 et eIF2) dans de nombreux cancers (Dua *et al.*, 2001). Parmi ces facteurs, eIF4E a un rôle majeur dans la prolifération maligne (Mamane *et al.*, 2004). Plusieurs données supportent ce rôle. La surexpression d'eIF4E active l'oncogène Ras et coopère avec l'expression des deux oncogènes immortalisés E1A et myc (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1992; Lazaris-Karatzas & Sonenberg, 1992). Une expression élevée d'eIF4E a été retrouvée dans la majorité des tumeurs solides comme le cancer de la vessie (Crew *et al.*, 2000), du sein, des muscles du cou et de la prostate (Kerekatte *et al.*, 1995; DeFatta *et al.*, 1999). L'expression et la disponibilité d'eIF4E pour ses partenaires sont régulées à plusieurs niveaux par les oncogènes et les facteurs de la croissance (Gingras *et al.*, 1999), suggérant un rôle central de cette protéine dans la convergence des voies de signalisation qui conduisent au cancer. De plus, il a été démontré que l'activation du complexe eIF4F joue un rôle essentiel dans la genèse et le maintien du phénotype malin des cellules épithéliales mammaires (Avdulov *et al.*, 2005).

D'un point de vue expérimentale, la surexpression d'eIF4E peut induire la transformation de cellules saines en cellules malignes (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990). Il est particulièrement intéressant de noter que la surexpression de son inhibiteur 4E-BP permet de réverser le phénotype cancéreux en cellules saines de plusieurs lignées cellulaires (revue dans Cormier *et al.*, 2003). L'analyse récente des ARNm recrutés dans les fractions polysomales démontre que la surexpression d'eIF4E provoque une augmentation spécifique de la traduction d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ainsi que, de manière tout à fait intéressante, pour des protéines anti-apoptotiques (Mamane *et al.*, 2007). Ces données apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes par lesquels eIF4E peut affecter non seulement la prolifération mais aussi l'apoptose.

LES FACTEURS D'INITIATION eIF4 ET L'APOPTOSE

L'intérêt des liens entre l'apoptose et les facteurs de traduction ne s'est révélé que très récemment (revue dans Morley *et al.*, 2005; Holcick & Sonenberg, 2005). Ainsi, le taux de synthèse protéique est contrôlé par de nombreux facteurs qui induisent l'apoptose et de manière générale, des modifications affectant la machinerie traductionnelle précèdent l'apoptose. Associées à l'apoptose, des modifications post-traductionnelles ciblent les facteurs de traduction par deux phénomènes principaux qui sont les phosphorylations/déphosphorylations et/ou le clivage protéique spécifique. Ainsi, plusieurs études ont montré que le facteur eIF4G est spécifiquement clivé pendant l'apoptose (revue dans Morley *et al.*, 2005; Holcick & Sonenberg, 2005). Le clivage progressif d'eIF4G et l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe m⁷GTP au cours de l'apoptose sont associés à la déplétion de facteurs de croissance, à l'activation du récepteur Fas ou au traitement par le cisplatine, l'etoposide, le TNF ou TRAIL. Lors du clivage d'eIF4G en réponse à des conditions apoptotiques, les domaines fonctionnels d'interactions avec eIF4E d'une part et avec eIF3 et eIF4A d'autre part sont séparés. Dans ce cas, eIF4G ne peut plus assurer la traduction dépendante de la coiffe m⁷GTP mais en revanche, le fragment C-terminal de eIF4G est capable de promouvoir la traduction IRES-dépendante de certains ARNm. Ainsi, deux régulateurs importants de l'apoptose, les protéines APAF-1 (*pro-apoptotic activating factor 1*) et XIAP (*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis*), sont traduits de façon IRES dépendante (Holcick & Sonenberg, 2005) et ceci sous le contrôle de eIF4G tronqué ou de son isoforme DAP-5.

Les modifications de l'état de phosphorylation de la protéine 4E-BP pendant l'apoptose semble être un élément important pour le contrôle négatif de la traduction. Ainsi dans le cancer du sein, l'activation de TRAIL induit l'apoptose de façon corrélée à la déphosphorylation de 4E-BP et à l'accumulation de cette petite protéine (Morley *et al.*, 2005). Le niveau d'expression de 4E-BP représentant un nouveau mécanisme de régulation de la disponibilité d'eIF4E, la dégradation de 4E-BP initialement mise en évidence en réponse à la fécondation chez l'oursin (Salaün *et al.*, 2003) pourrait jouer un rôle important dans ces mécanismes. De manière intéressante et de façon similaire à ce qui se passe dans le cancer du sein, le niveau de 4E-BP1 augmente substantiellement dans les lymphomes humains traités par TRAIL (Morley *et al.*, 2005). TRAIL n'est pas le seul inducteur d'apoptose qui affecte l'état de phosphorylation ou la quantité de 4E-BP1. Ainsi, le traitement de cellules à la staurosporine ou par un agent endommageant l'ADN tel que l'etoposide provoque la déphosphorylation et le clivage médié par les caspases de 4E-BP1. Enfin, l'induction de l'apoptose dans des cellules humaines traitées par des peptides mimant le site d'association contenu sur 4E-BP1 et se liant à eIF4E démontre de manière intéressante que la protéine 4E-BP peut être reliée directement au mécanisme d'apoptose (Herbert *et al.*, 2000).

Comprendre le rôle du facteur eIF4E et de ses inhibiteurs 4E-BPs dans les mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire et l'apoptose représente un challenge important. Le modèle de l'embryon d'oursin devrait apporter rapidement des informations importantes dans ce sens. Il existe à ce jour assez d'éléments pour envisager une recherche transversale pour étudier le rôle de ces acteurs dans un contexte physiopathologique susceptible d'être sous leur contrôle. La leucémie lymphoïde chronique étant caractérisée par une perte de l'activité apoptotique, nous avons initié un projet de recherche sur cette maladie hématologique.

LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE DES LYMPHOCYTES B

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie lymphoïde chronique définie par l'accumulation d'un clone de petits lymphocytes B d'aspect morphologique mûr dans le sang (lymphocytes supérieurs à 4.10^9 /litre) et la moelle osseuse. La LLC est la plus fréquente des hémopathies chez les adultes en occident. Elle présente le tiers de l'ensemble des leucémies. Son incidence atteint 2,7 pour 10^5 des individus aux États-Unis et en Europe. Cette incidence atteint 20 pour 10^5 des personnes âgées de plus de 70 ans. La découverte de la maladie est fortuite dans la majorité des cas, à l'occasion d'un hémogramme chez un adulte en bonne santé apparente, conduisant à la découverte d'une hyperlym-

phocytose variable, habituellement comprise entre 5 et $50\,000/\text{mm}^3$ et atteignant parfois des centaines de milliers de lymphocytes B. Ces lymphocytes B présentent des caractéristiques particulières qui permettent de les distinguer des lymphocytes B normaux.

Un immunophénotype caractéristique : les lymphocytes B de la LLC expriment des immunoglobulines à leur surface avec une monotypie des chaînes légères et des déterminants idiotypiques des chaînes lourdes (Fu *et al.*, 1975), témoignant de la nature monoclonale de la cellule. La monoclonalité est confirmée par l'étude du réarrangement des gènes des immunoglobulines (Fialkow *et al.*, 1978).

Les lymphocytes de la LLC sont caractérisés par une expression quasiment constante du marqueur CD5 (Boumsell *et al.*, 1978). Le marqueur CD5 est habituellement présent sur les cellules T mûres et est exprimé dans une sous-population des cellules B normales. Ces caractéristiques phénotypiques constituent aujourd'hui un des critères diagnostiques de la maladie (Moreau *et al.*, 1997). Le diagnostique repose sur la présence d'une lymphocytose excessive constatée sur plusieurs hémogrammes d'aspect morphologique particulier (l'étude immunologique confirme l'augmentation d'une population de lymphocytes B monoclonaux $\text{CD}19^+ \text{CD}5^+ \text{CD}23^+$ (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999).

LLC, TRADUCTION, CYCLE CELLULAIRE ET APOPTOSE

Dans la leucémie lymphoïde chronique et comme dans tous les cancers, l'hémostase cellulaire est rompue par la prédominance d'un mécanisme d'apoptose défectueux. L'hyperlymphocytose sanguine est avant tout la conséquence de l'accumulation des lymphocytes matures arrêtés en phase précoce du cycle cellulaire et ayant une durée de vie prolongée (Fig. 6). L'étude de l'expression des protéines régulatrices durant les phases précoces du cycle cellulaire confirme cet arrêt (Meinhardt *et al.*, 1999). Ainsi, les cyclines D1 et D3 ne sont pas exprimées, mais il existe une surexpression de cycline D2 pouvant refléter un état d'avancement en G1 des cellules dans le cycle, potentiellement sous influence d'un facteur de survie ou lié à leur caractère B $\text{CD}5^+$. La cycline D2 peut former un complexe avec CDK4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*), fonctionnel mais inactif, probablement en raison de la forte expression de l'inhibiteur de kinase p27 (Delmer *et al.*, 1995). De façon intéressante, le niveau d'expression de p27 est un marqueur pronostique pour l'agressivité de la LLC (Vhrovac *et al.*, 1998). La traduction de p27 est sous contrôle d'une séquence IRES (Miskimins *et al.*, 2001) suggérant un impact important de ce mode de traduction dans la pathologie. Le rôle de la synthèse protéique en général et la balance entre la traduction coiffe-dépendante et coiffe-indépendante en particulier restent donc importants à élucider dans ces mécanismes.

Les voies d'activation mises en jeu par les facteurs de survie dans les cellules LLC concourent à freiner l'apoptose par divers mécanismes convergents. Il a été récem-

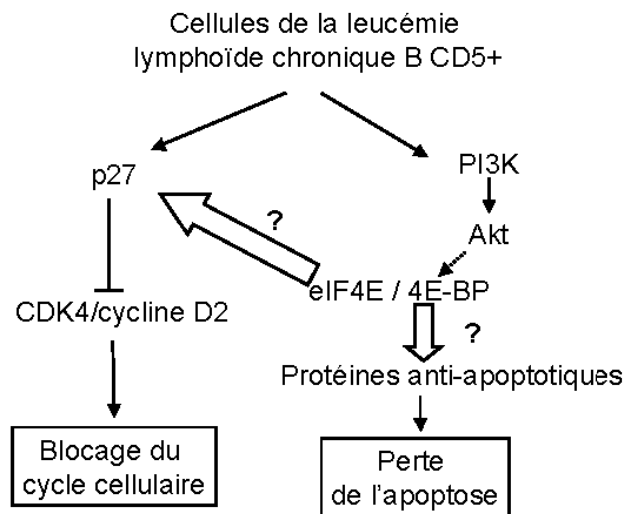


FIG. 6. – Liens potentiels des facteurs eIF4E et 4E-BP avec le blocage en G0 et dans la perte de l'apoptose des lymphocytes B $\text{CD}5^+$ de la LLC. La surexpression de p27 a été associée au blocage dans le cycle cellulaire des lymphocytes $\text{CD}5^+$. De même, la traduction de protéines anti-apoptotiques participe à la survie anormale de ces lymphocytes B. La machinerie de traduction en générale et les protéines eIF4E et 4E-BP en particulier pourraient jouer un rôle important dans l'acquisition de ces deux mécanismes, soit en participant à la synthèse de protéines anti-apoptotiques soit en agissant en amont de la traduction de p27. L'activation constitutive de la voie PI3-Akt kinase pourrait aussi être impliquée en amont du contrôle traductionnel dans la LLC.

ment montré que les voies de PI3-Akt kinase sont constitutivement actives dans les LLC B CD5⁺ (Barragan *et al.*, 2002). Les protéines 4E-BPs sont des cibles en aval de la voie PI3-Akt kinase (Gingras *et al.*, 1999). L'effet de l'activation constitutive de cette voie kinasique sur les facteurs eIF4 dans les LLC CD5⁺ est encore inconnu et est actuellement en cours d'étude.

La machinerie traductionnelle pourrait jouer un rôle important dans l'acquisition du phénotype des lymphocytes B CD5⁺ de la LLC. L'état de phosphorylation ou la quantité de 4E-BP doivent être analysés afin de déterminer l'accessibilité d'eIF4E pour ses autres partenaires. De même les mesures des activités traductionnelles dépendantes de la coiffe m⁷GTP ou des IRES apporteront des informations sur leur rôle potentiel dans la LLC et permettront de cibler les acteurs clés dans le cadre d'approches thérapeutiques.

CONCLUSION

La synthèse protéique fait intervenir un nombre important d'acteurs qui permettent de moduler finement l'expression des protéines. Ce niveau de contrôle est maintenant bien reconnu comme pouvant influencer la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses. La leucémie lymphoïde chronique B-CD5⁺ est une maladie caractérisée par la perte de l'apoptose. Le facteur eIF4E est considéré comme anti-apoptotique et son répresseur est caractérisé par une activité pro-apoptotique. L'étude de l'expression d'eIF4E et de ses inhibiteurs 4E-BPs ainsi que des interactions entre les partenaires de ces protéines devraient permettre de comprendre le rôle de ces acteurs dans les lymphocytes B monoclonaux CD5⁺ de la leucémie lymphoïde chronique. L'analyse à partir des cellules tumorales prélevées de patients permettra de respecter le contexte physiopathologique de la maladie, pour envisager le développement d'une nouvelle option thérapeutique combinant une approche peptidique et une thérapie ciblée utilisant des anticorps monoclonaux. Les connaissances et les possibilités expérimentales du modèle du développement précoce de l'oursin (*cf.* Oulhen *et al.*; Bellé *et al.*, dans le même volume) permettent une analyse fine des régulations de la traduction et du cycle cellulaire nécessaires à ce programme.

Remerciements. – Le projet dont les fondements sont présentés dans la revue a été accepté comme programme de recherche d'intérêt régional (PRIR-Bretagne), financé également par les tutelles (CNRS et l'Université Pierre et Marie Curie), l'Association de Recherche sur le Cancer (ARC), La Ligue contre le Cancer (comités départementaux du Morbihan, du Finistère, des côtes d'Armor et de la Vendée) et le Conseil Général du Finistère.

Nous remercions l'ensemble des membres de l'équipe et de la Station Biologique de Roscoff pour leurs contributions efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

- Avdulov S., Li S., Michalek V., Burrichter D., Peterson M., Perlman D. M., Manivel J. C., Sonenberg N., Yee D., Bitterman P. B. & Polunovsky V. A., Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell*, 2004, 5, 553-563.
- Barragan M., Bellosillo B., Campas C., Colomer D., Pons G. & Gil J., Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 2002, 99, 2969-2976.
- Boumsell L., Bernard A., Lepage V., Degos L., Lemerle J. & Dausset J., Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur. J. Immunol.* 1978, 8, 900-904.
- Caligaris-Cappio F. & Hamblin T. J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17, 399-408.
- Clemens M. J., Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*, 2004, 23, 3180-3188.
- Clemens M. J., van Venrooij W. J. & van de Putte L. B., Apoptosis and autoimmunity. *Cell Death Differ.*, 2000, 7, 131-133.
- Cormier P., Translation factors: from protein synthesis to cell cycle regulation and tumorigenesis. *Med. Sci.*, 2000, 16, 378-385.
- Cormier P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Sonenberg N. & Bellé R., eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev. Biol.*, 2001, 232, 275-283.
- Cormier P., Pyronnet S., Salaun P., Mulner-Lorillon O. & Sonenberg N., Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2003, 5, 469-475.
- Crew J. P., Fuggle S., Bicknell R., Cranston D. W., de Benedetti A. & Harris A. L., Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 161-166.
- DeFatta R. J., Turbat-Herrera E. A., Li B. D., Anderson W. & de Benedetti A., Elevated expression of eIF4E in confined early breast cancer lesions: possible role of hypoxia. *Int. J. Cancer*, 1999, 80, 516-522.
- Delmer A., Ajchenbaum-Cymbalista F., Tang R., Ramond S., Faussat A. M., Marie J. P. & Zittoun R., Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood*, 1995, 85, 2870-2876.
- Dua K., Williams T. M. & Beretta L., Translational control of the proteome: relevance to cancer. *Proteomics*, 2001, 1, 1191-1199.
- Fialkow P. J., Najfeld V., Reddy A. L., Singer J. & Steinmann L., Chronic lymphocytic leukaemia: clonal origin in a committed B-lymphocyte progenitor. *Lancet*, 1978, 2, 444-446.
- Fu S. M., Winchester R. J. & Kunkel H. G., Similar idiotypic specificity for the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 1975, 114, 250-252.
- Gingras A. C., Raught B. & Sonenberg N., eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, 68, 913-963.
- Gingras A. C., Raught B. & Sonenberg N., Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.*, 2001, 15, 807-826.
- Greenberg V. L. & Zimmer S. G., Paclitaxel induces the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 through a Cdk1-dependent mechanism. *Oncogene*, 2005, 24, 4851-4860.
- 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.
- Heesom K. J., Gampel A., Mellor H. & Denton R. M., Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* 2001, 11, 1374-1379.

- Herbert T. P., Fahraeus R., Prescott A., Lane D. P. & Proud C. G., Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E. *Curr. Biol.* 2000, 10, 793-796.
- 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.
- Kerekatte V., Smiley K., Hu B., Smith A., Gelder F. & De Benedetti A., The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 1995, 64, 27-31.
- 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.
- Lazaris-Karatzas A., Montine K. S. & Sonenberg N., Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*, 1990, 345, 544-547.
- Lazaris-Karatzas A., Smith M. R., Frederickson R. M., Jaramillo M. L., Liu Y. L., Kung H. F. & Sonenberg N., Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. *Genes Dev.*, 1992, 6, 1631-1642.
- Lazaris-Karatzas A., & Sonenberg N., The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12, 1234-1238.
- Le Bouffant R., Cormier P., Mulner-Lorillon O. & Bellé R., Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell Biochem.*, 2006, 99, 126-132.
- Le Breton M., Cormier P., Belle R., Mulner-Lorillon O. & Morales J., Translational control during mitosis. *Biochimie*, 2005, 87, 805-811.
- Mader S., Lee H., Pause A. & Sonenberg N., The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 γ and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 1995, 15, 4990-4997.
- Mamane Y., Petroulakis E., Rong L., Yoshida K., Ler L. W. & Sonenberg N., eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene*, 2004, 23, 3172-3179.
- Mamane Y., Petroulakis E., Martineau Y., Sato T., Larsson O., Rajasekhar V. K. & Sonenberg N., Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE*, 2007, 2, e242.
- Meinhardt G., Wendtner C. M. & Hallek M., Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J. Mol. Med.*, 1999, 77, 282-293.
- Miskimins W. K., Wang G., Hawkinson M. & Miskimins R., Control of cyclin-dependent kinase p27 expression by cap-independent translation. *Mol. Cell Biol.*, 2001, 21, 4960-4967.
- Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Morin E., Bellé R., Bradham C. A., Beane W. S. & Cormier P., Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 239-307.
- Moreau E. J., Matutes E., A'Hern R. P., Morilla A. M., Morilla R. M., Owusu-Ankomah K. A., Seon B. K. & Catovsky D., Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.*, 1997, 108, 378-382.
- Morley S. J., Coldwell M. J. & Clemens M. J., Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ.*, 2005, 12, 541-546.
- Oulhen N. & Cormier P., eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development *Med. Sci.*, 2006, 22, 507-513.
- Oulhen N., Salaün P., Cosson B., Cormier P. & Morales J., Following 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.
- Pyronnet S. & Sonenberg N., Cell-cycle-dependent translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001, 11, 13-18.
- Richter J. D. & Sonenberg N., Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 2005, 433, 477-480.
- Rogers G. W., Richter N. J., Lima W. F. & Merrick W. C., Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 30914-30922.
- Salaün P., Boulben S., Mulner-Lorillon O., Bellé 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.
- Salaün P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Bellé R., Sonenberg N. & Cormier P., eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.*, 2003, 255, 428-439.
- Von Der Haar T., Gross J. D., Wagner G. & Mc Carthy J. E., The mRNA cap binding protein eIF4E in post transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 11, 503-511.
- Vrhovac R., Delmer A., Tang R., Marie J. P., Zittoun R. & Ajchenbaum-Cymbalista F., Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*, 1998, 91, 4694-4700.
- Wynshaw-Boris A., Lost in mitotic translation. *Nature*, 2007, 446, 274-275.