

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° ORDRE
de la thèse: 2233

THESE DE DOCTORAT

présentée devant
L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1
mention **Biologie**

par
Christelle DELALANDE

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

Ecole doctorale: Sciences de la Vie et de la Santé

<p>LA PROTEINE eEF-1 ET LE DEVELOPPEMENT PRECOCE DE L'OURSIN <i>Sphaerechinus granularis</i>.</p>
--

Soutenue le 8 décembre 1999 devant la Commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY:

Mr E. ITARTE	Professeur à l'université autonome de Barcelone	Rapporteur
Mr A. PICARD	Directeur de recherches CNRS à Banyuls	Rapporteur
Mr M. PHILIPPE	Professeur à l'institut de France	Examinateur
Mr J. KUBIAK	Chargé de recherches CNRS à Rennes 1	Examinateur
Mr O. HACCARD	Chargé de recherches CNRS à Paris VI	Examinateur
Mr L. MEIJER	Directeur de recherches CNRS à Roscoff	Examinateur
Mr R. BELLE	Professeur à l'université de Paris VI	Directeur de Thèse

Ce travail a été réalisé à la Station biologique de Roscoff dans l'équipe biologie cellulaire de l'ovocyte (CNRS UPR 9042-UPMC).

Je tiens à remercier le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station biologique.

Je remercie le Professeur Robert Bellé et le Docteur Odile Mulner-Lorillon de m'avoir accueillie dans l'équipe "Biologie cellulaire de l'ovocyte". Je les remercie pour le soutien et la confiance qu'ils m'ont accordés ainsi que pour leurs conseils au cours de mon travail de thèse et de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Marie-Lyse Thieulant pour m'avoir donné le goût de la recherche au cours de mon stage de DEA.

Je remercie le Docteur André Picard et le Professeur Emilio Itarte Fresquet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Professeur Michel Philippe, le Docteur Jacek Kubiak, le Docteur Laurent Meijer ainsi que le Docteur Olivier Haccard d'avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie Patrick Cormier de m'avoir beaucoup appris. Je tiens à remercier Annabelle Monnier, Julia Morales et Sandrine Boulben pour leur soutien quotidien, leur compétence et leur bonne humeur.

Je remercie également toutes les personnes de la station biologique pour leur gentillesse et leurs conseils.

Merci.



A Stéphane et à mes parents

RESULTATS

I- Analyse phylogénétique

p. 55

Article 1

p. 56

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

II- Clonage et expression de eEF-1 δ et eEF-1A au cours du développement précoce d'oursin

p. 61

Article 2

p. 63

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

Article 3

p. 70

Changes in elongation factor-1 transcripts are uncoupled to changes in EF-1 during sea urchin development, *Biol. Cell*, 90, 661-663.

III- Caractérisation et changement d'une activité eEF-1 δ kinase identifiée à la CK2

p. 73

Article 4

p. 74

Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development, accepté à *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I- Fonction de eEF-1 δ et rôle de sa phosphorylation

p. 92

II- La protéine eEF-1 δ et ses partenaires

p. 93

III- Expression de eEF-1 δ

p. 93

IV- La eEF-1 δ kinase

p. 94

BIBLIOGRAPHIE

p. 96

Sommaire des figures

Figure 1: Les trois phases de la synthèse protéique	p. 2
Figure 2: Représentation schématique de la phase délongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes	p. 3
Figure 3: Composition de eEF-1B	p. 5
Figure 4: Structure de la protéine eEF-1	p. 8
Figure 5: Structure de la protéine de type eEF-1	p. 11
Figure 6: Alignement des séquences protéiques de eEF-1 α , eEF-1 β et eEF-1beta2 dans la région contenant le ou les sites de phosphorylation par la CKII	p. 12
Figure 7: Structure de la protéine eEF-1	p. 14
Figure 8: Alignement des séquences protéiques de eEF-1	p. 16
Figure 9: Les phosphorylations des différentes protéines eEF-1	p. 20
Figure 10: Modèles structuraux de eEF-1	p. 23
Figure 11: Schéma de l'oeuf d'oursin à la fécondation	p. 30
Figure 12: Déroulement de la maturation méiotique et de la fécondation chez l'oursin	p. 31
Figure 13: Quelques stades de développement de l'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i>	p. 32
Figure 14: Profil des différentes classes de messagers	p. 35
Figure 15: Profil des activités kinase mesurées au cours du développement précoce	p. 39
Figure 16: Familles des substrats de la CK2.	p. 49
Figure 17: Rôles de la CK2	p. 52

Sommaire des tableaux

Tableau I: Nomenclature des facteurs d'élongation eucaryotiques	p. 5
Tableau II: Les différentes protéines eEF-1 séquencées	p. 8
Tableau III: Les différentes protéines eEF-1 α , eEF-1 β et eEF-1 beta2 séquencées	p. 10
Tableau IV: Les différentes protéines eEF-1 séquencées	p. 14
Tableau V: Purification et structure de eEF-1	p. 22
Tableau VI: Effecteurs de la CK2	p. 43

Liste des abbréviations

- ADN: acide désoxyribonucléique
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- ARNt: acide ribonucléique de transfert
- CDK1: cyclin dependant kinase 1
- CK2: caséine kinase 2
- CSS : cleavage stage specific
- GSK3: glycogen synthase kinase 3
- GST: glutathione S-transferase
- eEF: eukaryotic elongation factor
- eIF: eucaryotic initiation factor
- eRF: eucaryotic releasing factor
- ICPO : infected cell protein 0
- PCS : post cleavage specific
- PKA: protéine kinase A
- PKC: protéine kinase C
- PI3K: phosphoinositide 3 kinase
- PMA : phorbol 12 myristate 13 acetate
- PTI : prostatic tumor inducing gene carcinoma
- Val-RS: valyl-ARNt synthetase

INTRODUCTION

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

- 1) transcriptionnel: transcription ou non d'un gène donné
- 2) post-transcriptionnel: épissage, maturation, stabilité, localisation des ARNm, etc...
- 3) traductionnel: ARNm traduit ou masqué, état de la machinerie de traduction
- 4) post-traductionnel: glycosylation, phosphorylation, etc....

Nous nous intéressons à l'un des facteurs de la machinerie de traduction eEF-1 et à ses changements de phosphorylation dans les mécanismes de régulation traductionnelle.

Nos recherches ont été conduites chez l'embryon d'oursin qui constitue un modèle expérimental de choix pour les études de régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel et post-traductionnel.

Nous avons étudié l'origine phylogénétique de la protéine eEF-1, sous-unité du facteur eEF-1 (article 1). Nous avons identifié eEF-1 chez l'oursin et démontré une régulation de l'expression de ses ARNm au cours du développement (article 2), qui est découplée de celle de eEF-1 (article 3). Nous avons démontré l'existence pendant le développement précoce, d'un pic transitoire d'une activité eEF-1 kinase et l'avons identifiée à la caséine kinase 2 (CK2) (article 4).

L'introduction de ce mémoire fait le point des connaissances sur:

- Le facteur d'élongation de la synthèse protéique : eEF-1.
- Le modèle expérimental: le développement des embryons d'oursin
- L'activité et la régulation de la CK2.

Note : La nomenclature du facteur d'élongation eEF-1 est actuellement très confuse (voir tableau I, page 5). Nous utiliserons pour le facteur eEF-1 α la nomenclature eEF-1A et pour le complexe d'échange qui contient eEF-1 δ , eEF-1B.

I- Le facteur d'élongation de la synthèse protéique: eEF-1

A- Etapes de la synthèse protéique

Les protéines constituent plus de la moitié de la masse d'une cellule et leur synthèse est nécessaire pour l'homéostasie, la division et la différenciation cellulaires. La traduction de l'ARNm en protéine a lieu au niveau des ribosomes. Elle est composée de trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison qui font intervenir plus de 200 molécules dont les ribosomes, les ARNt, les ARNm et des protéines appelées facteurs de traduction (revues dans Merrick et Hershey, 1996; Clemens et Bommer, 1999). La figure 1 représente la succession des trois phases de la synthèse protéique.

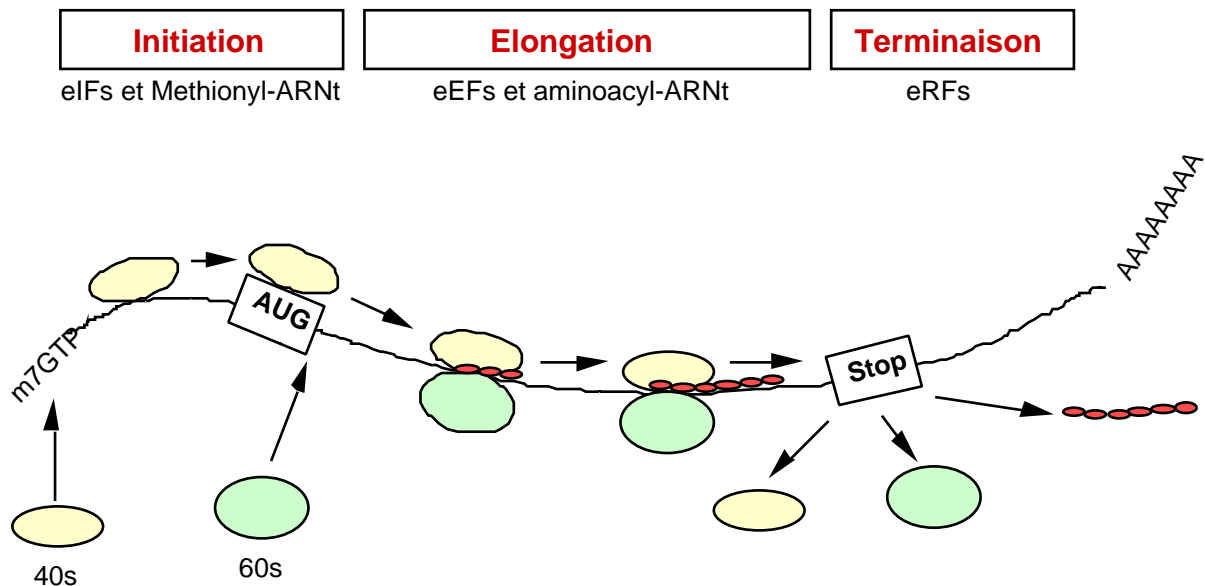


Figure 1: Les trois phases de la synthèse protéique (Proud et Denton, 1997).

Le schéma montre un ARNm avec sa coiffe en 5' et sa queue poly(A) en 3'. Au cours de la phase d'initiation, un ARNm est recruté par la machinerie de traduction et forme un complexe d'initiation avec la petite sous-unité ribosomale. Dans ce complexe, l'anticodon de l'ARNt-méthionine initiateur interagit avec le codon d'initiation AUG. Cette association spécifie la phase de lecture. La phase d'élongation provoque l'addition séquentielle d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne polypeptidique naissante (ellipse rouge).

Lors de la rencontre d'un codon stop, la terminaison a lieu et le polypeptide ainsi que les ribosomes sont relargués. Chacune des phases nécessite des facteurs spécifiques : eIFs: eukaryotic initiation factors; eEFs: eukaryotic elongation factors; eRFs: eukaryotic releasing factors. m7GTP: 7 -méthyl -GTP (coiffe).

Les sous-unités ribosomales 40s et 60s sont respectivement en jaune et en vert

L'initiation est la phase la plus étudiée (revue dans Merrick et Hershey, 1996). C'est au cours de cette étape que l'ARNm est sélectionné et forme un complexe d'initiation au niveau

du ribosome dans lequel l'anticodon du méthionyl-ARNt initiateur interagit avec le codon initiateur. L'étape de liaison du méthionyl-ARNt et de l'ARNm aux ribosomes fait intervenir 11 facteurs d'initiation (eIFs) (revue dans Merrick et Hershey, 1996).

La phase d'élongation consiste en l'allongement de la chaîne polypeptidique naissante par ajout successif d'acides aminés à l'extrémité C-terminale (Figure 2).

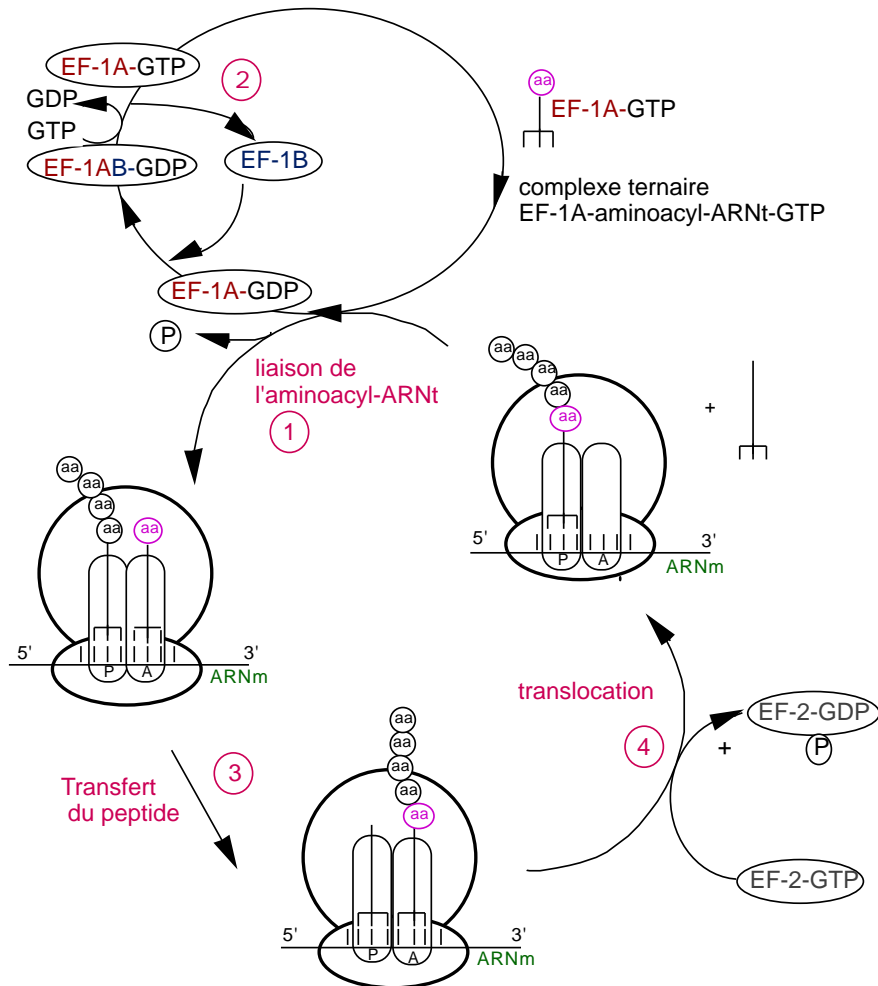


Figure 2: Représentation schématique de la phase d'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (Merrick et Hershey, 1996)

Les chiffres de 1 à 4 représentent la succession des différentes étapes de l'élongation

- 1) L'aminocyl-ARNt se lie sur le site A du ribosome via eEF-1 (formation d'un complexe ternaire: eEF-1-aminocyl-ARNt-ribosome). Cette liaison nécessite l'hydrolyse de GTP lié à eEF-1A.
- 2) Recyclage de GDP/GTP au niveau de eEF-1
- 3) Formation du pont peptidique
- 4) Translocation du peptidyl-ARNt sur le site P du ribosome

La phase d'élongation est composée de quatre étapes: (1) fixation de l'aminocyl-ARNt sur le site A du ribosome par eEF-1A (formation d'un complexe ternaire: eEF-1-aminocyl-ARNt-ribosome) et hydrolyse de GTP lié à eEF-1A; (2) recyclage de GDP/GTP au niveau de

eEF-1A; (3) formation du pont peptidique et (4) translocation du peptidyl-ARNt sur le site P du ribosome par eEF-2. Le site A du ribosome est alors libre pour accueillir un nouvel aminoacyl-ARNt. L'ARNt est transféré au site E du ribosome puis est libéré (revues dans Riis et al., 1990; Proud, 1994; Merrick et Hershey, 1996). La première étape est assurée par le facteur d'élongation eEF-1A tandis que le facteur d'élongation eEF-2 catalyse l'étape 4. Curieusement, les levures possèdent un facteur supplémentaire: eEF-3 (revue dans Belfield et Tuite, 1993) qui stimule la liaison du complexe ternaire au site A du ribosome en facilitant le relargage de l'ARNt déacylé du site E du ribosome (revue dans Chakraborty, 1999). Le facteur eEF-3 est nécessaire pour la synthèse protéique avec les ribosomes de levure mais pas avec les ribosomes mammaliens (revue dans Chakraborty, 1999).

Le fonctionnement du facteur eEF-1A nécessite la fixation de GTP et son hydrolyse en GDP. Il doit être rechargé en GTP pour assurer un nouveau cycle d'élongation. Le complexe eEF-1B est le facteur d'échange de GTP au niveau de son partenaire eEF-1A (revues dans Riis et al., 1990; Merrick et Hershey, 1996).

La terminaison est catalysée par des facteurs de type "releasing factors" (eRFs), ils provoquent l'hydrolyse du peptidyl-ARNt dans le site P du ribosome. Les bactéries possèdent quatre facteurs: RF1 à RF4. Chez les eucaryotes, eRF1 équivaut à RF1/2 et eRF3 stimule l'activité de eRF1 (revues dans Tuite et Stansfield, 1994; Kisselev et Frolova, 1999). La levure possède deux facteurs impliqués dans la terminaison: SUP35 et SUP45 correspondant respectivement à eRF3 et eRF1 (Zhouravleva et al., 1995).

B- Structure et phosphorylation du facteur eEF-1

Le facteur eEF-1 est composé de deux éléments: la protéine G: eEF-1A qui catalyse le transfert de l'aminoacyl-ARNt sur le ribosome et le complexe eEF-1B responsable de l'échange de GDP/GTP au niveau de eEF-1A. Selon les espèces, eEF-1B présente plusieurs structures selon sa composition en sous-unités: eEF-1₁ chez les végétaux, eEF-1₂ ou eEF-1₃ - ValRS chez les animaux et eEF-1₄ chez les levures (Figure 3).

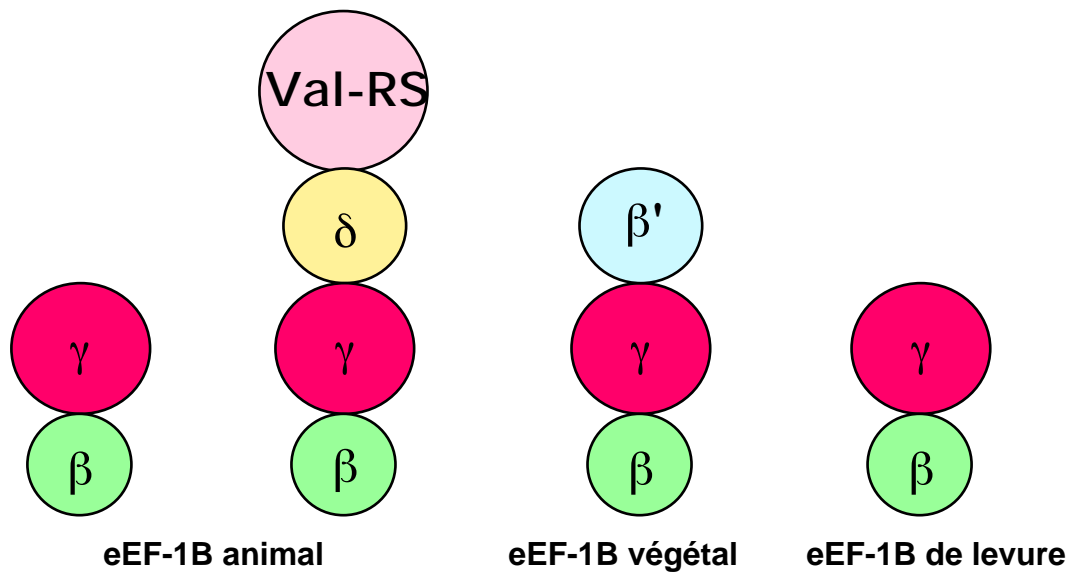


Figure 3: Composition de eEF-1B.

Représentation schématique de la composition des facteurs eEF-1B déterminée à partir des différents organismes (voir texte). Val-RS: Valyl-ARNt synthétase.

Nous utiliserons dans ce texte la nomenclature ‘A et B’ proposée pour les facteurs d'élongation (revue dans Merrick et Hershey, 1996). En revanche, la nomenclature proposée par ces auteurs, pour les sous-unités du complexe d'échange augmente la confusion dans leur appellation, notamment entre les protéines correspondantes de végétaux et d'animaux (Tableau I), nous conserverons donc les noms usuels de la littérature.

Facteur (nom usuel)	Correspondance*
Protéine G : eEF-1	eEF-1A
Complexe d'échange GTP/GDP: (eEF-1 / ' / -ValRS) animal animal ' végétal végétal	eEF-1B
eEF-2	eEF-2

Tableau I: Nomenclature des facteurs d'élongation chez les eucaryotes (* d'après: Merrick et Hershey, 1996).

1) La protéine G : eEF-1A

Le facteur eEF-1A est une protéine de 50 à 55 kDa initialement caractérisée comme un élément catalysant la phase d'élongation de la synthèse protéique (revues dans Moldave, 1985; Riis et al., 1990; Merrick et Hershey, 1996; Negrutskii et El'skaya, 1998). C'est une des protéines les plus abondantes dans la cellule (1 à 3% des protéines solubles) qui apparaît maintenant multifonctionnelle. En effet, elle est impliquée dans la prolifération cellulaire, l'organisation du cytosquelette et le métabolisme des acides nucléiques (revues dans Riis et al., 1990; Hershey, 1991; Bellé et al., 1995; Merrick et Hershey, 1996). Elle intervient aussi, en dehors de l'élongation, à d'autres étapes de la synthèse protéique: l'initiation (Herrera et al., 1991); le transport orienté de l'aminocyl-ARNt (revue dans Negrutskii et El'skaya, 1998) et la fidélité de la traduction (Thompson, 1988; Song et al., 1989; Dinman et Kinzy, 1997). Il est intéressant de noter que plusieurs formes protéiques de eEF-1A existent dans une même cellule pouvant être impliquées dans ces différentes fonctions.

Au cours de la phase d'élongation de la synthèse protéique, eEF-1A catalyse le transfert de l'aminocyl-ARNt sur le ribosome (revues dans Riis et al., 1990; Nygard et Nilsson, 1990; Merrick et Hershey, 1996). L'hydrolyse du GTP fournit l'énergie nécessaire à l'élongation. La protéine eEF-1A possède une activité GTPase intrinsèque. C'est une protéine G (liant le GTP) membre de la superfamille des GTPases (revues dans Bourne et al., 1991; Sprinzl, 1994). La protéine eEF-1A possède la même affinité pour les deux nucléotides (GDP ou GTP) (revue dans Negrutskii et El'skaya, 1998) et nécessite pour son recyclage un système d'échange des nucléotides (GDP/GTP). L'échangeur est le complexe eEF-1B. La protéine eEF-1A interagit avec eEF-1B par son domaine C-terminal (Van Damme et al., 1992). Elle est présente sous deux formes: une forme libre (majoritaire) et une forme complexée à eEF-1B (10 à 30%) (Nagata et al., 1976).

La protéine eEF-1A a été isolée et séquencée dans de nombreuses espèces animales et végétales (revues dans Merrick et Hershey, 1996; Browning, 1996) et représente à l'heure actuelle un outil de choix pour la construction d'arbres phylogénétiques (Nordnes et al., 1994; Kidou et Ejiri, 1998). Le grand degré de conservation de la protéine suggère un rôle essentiel pour la protéine eEF-1A (revues dans Riis et al., 1990; Browning, 1996). Cette conservation se retrouve aussi entre procaryotes et eucaryotes. L'équivalent structural et fonctionnel de eEF-1A chez les procaryotes, est EF-Tu (thermounstable) (Nagata et al., 1976). L'analyse cristallographique de EF-Tu, seule disponible, montre que la protéine est composée de trois modules globulaires. Le domaine de liaison des nucléotides est localisé dans le module globulaire du côté N-terminal de la protéine. Le domaine de liaison de l'aminocyl-ARNt fait

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

Des modifications post-traductionnelles ont été décrites pour eEF-1A. La méthylation est capable d'activer eEF-1A (Fonzi et al., 1985) l'incorporation d'éthanolamine permet l'ancrage au reticulum endoplasmique (Hayashi et al., 1989). La protéine eEF-1A peut aussi être phosphorylée. Elle est substrat de la PKC delta (protéine kinase C delta) sur un résidu thréonine 431 (Venema et al., 1991b; Peters et al., 1995; Kielbassa et al., 1995) et de la protéine kinase S6 kinase multipotentielle (Chang et Traugh, 1997). En réponse au PMA (le phorbol 12-myristate 13-acetate) (Venema et al., 1991a) ou à l'insuline (Chang et Traugh, 1998), des activateurs de chacune de ces kinases, une stimulation des activités d'échange de nucléotides et d'élongation est observée. Cette stimulation est corrélée dans les deux cas, à la phosphorylation non seulement de eEF-1A mais aussi de eEF-1B.

2) Le facteur d'échange de GDP/GTP: eEF-1B

Les complexes eEF-1B issus de différents organismes (Figure 3) contiennent jusqu'à quatre types de sous-unités: les protéines eEF-1 α , les protéines du type eEF-1 β ou β' , les protéines eEF-1 γ et la valyl-ARNt synthétase.

a) La protéine eEF-1 γ

La sous-unité eEF-1 γ a été clonée pour la première fois chez l'artémie (Maessen et al., 1987) puis chez plusieurs espèces (Tableau II). Elle existe chez les eucaryotes inférieurs et supérieurs: animaux et végétaux. L'alignement (Altschul et al., 1997) des séquences montre une grande similitude entre elles, sur toute la longueur de la séquence. La protéine eEF-1 γ est apparue avec les eucaryotes et avant la spéciation végétaux-animaux.

La protéine eEF-1 γ a un poids moléculaire compris entre 47 kDa et 50 kDa, c'est une protéine hydrophobe contenant une petite région hydrophile riche en lysines (Figure 4). Elle possède en N-terminal un domaine ayant une similitude avec un domaine GST (glutathione S-transférase) (Koonin et al., 1994). Ce domaine, connu pour intervenir dans la régulation de l'assemblage de complexes multimériques (Koonin et al., 1994), pourrait jouer ce rôle dans eEF-1B. De plus, la capacité du domaine GST de lier les composés lipophiles permettrait à eEF-1 γ de participer à la détoxification cellulaire (Billaut-Mulot et al., 1997).

organisme	référence
Arabidopsis thaliana (AAB60721)	Vysotskaia et al., 1997*
Artemia salina (P12261/S00162)	Maessen et al., 1987
Caenorhabditis elegans (Z72507)	Murray, 1996*
Homo sapiens (X63526)	Kumabe et al., 1992
Homo sapiens (P26641/Z11531)	Sanders et al., 1992
Oryctolagus cuniculus (X68142/P29694/S26649)	Sheu et Traugh, 1992
Oryza sativa (D89802)	Kidou et al., 1998
Saccharomyces cerevisiae (S29345/X67917)	Kambouris et al., 1993
Saccharomyces cerevisiae (P36008/P29547/S37906)	Kinzy et al., 1994
Schizosaccharomyces pombe (Z97210)	Brown et al., 1997*
Schizosaccharomyces pombe (P40921/D14606)	Momoi et al., 1993
Sus scrofa (Q29387)	Wintero et al., 1996
Trypanosoma cruzi (P34715/S41648)	Billaut-Mulot et al., 1993
Xenopus laevis (X62508/P26642/S69726/S69724)	Cormier et al., 1991

Tableau II: Les différentes protéines eEF-1 γ séquencées.

Les séquences sont rangées par ordre alphabétique. Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros d'accès aux banques de données. Les références correspondent aux articles publiés ou, le cas échéant, aux références des séquences dans les banques(*).

Après purification, eEF-1 est toujours retrouvée associée à eEF-1 β , leur dissociation n'est possible qu'en milieu dénaturant (Motoyoshi et Iwasaki, 1977; Bec et al., 1989). L'association forte entre eEF-1 et eEF-1 β suggère que cette association ne joue pas de rôle régulateur (Van Damme et al., 1991) bien que eEF-1 puisse *in vitro* stimuler l'activité d'échange de GTP/GDP de eEF-1 β (Janssen et Möller, 1988a). Le domaine N-terminal de eEF-1 β interagit par son domaine N-terminal avec eEF-1 γ (Van Damme et al., 1991; Figure 4).

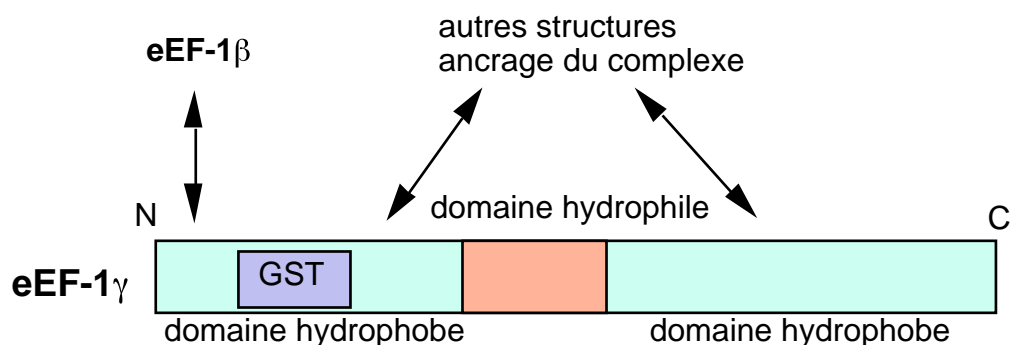


Figure 4: Structure de la protéine eEF-1 γ .

Les flèches représentent les interactions physiques.

Au cours de la purification, eEF-1 s'associe avec la tubuline probablement du fait de sa région riche en lysines (Janssen et Möller, 1988a). Cette propriété peut expliquer, dans les ovocytes en petit accroissement, la présence de eEF-1A et eEF-1B dans les corps de Balbiani qui sont des amas de mitochondries riches en tubuline (Viel et al., 1990). La grande majorité du complexe eEF-1B est localisée dans les cellules en culture au niveau du reticulum endoplasmique (Minella et al., 1996a; Sanders et al., 1996). Cette localisation est compatible avec la présence de domaines hydrophobes dans eEF-1. La protéine eEF-1 serait donc une protéine d'ancrage. Traugh et collaborateurs ont défini eEF-1 comme une "glue" dont le rôle est de maintenir les deux autres protéines du complexe eEF-1 et eEF-1 dans une position stable, cette stabilisation des sous-unités d'échange pourrait avoir comme fonction d'augmenter l'efficacité d'élongation (Sheu et Traugh, 1999). Bien que les mutations des gènes codant pour eEF-1 chez la levure n'aient pas d'effet létal (Kambouris et al., 1993; Kinzy et al., 1994), la forte conservation des séquences suggère un rôle essentiel.

La protéine eEF-1 de xénope est un substrat *in vivo* de CDK1/cycline B (Bellé et al., 1989; Mulner-Lorillon et al., 1989; Janssen et al., 1991), kinase contrôlant la transition G2-M du cycle cellulaire. Cette phosphorylation constitue le premier lien entre la machinerie de traduction et le cycle cellulaire. Le site de phosphorylation de eEF-1 par CDK1/cycline B a été identifié, il correspond au résidu thréonine 230 (Mulner-Lorillon et al., 1992). Il se trouve dans la région hydrophile de la protéine. Ce site consensus de phosphorylation est conservé chez l'humain et le lapin. Chez ce dernier, la protéine est effectivement phosphorylée par CDK1/cycline B (revue dans Minella et al., 1998). La phosphorylation de eEF-1 par CDK1/cycline B est un acquis au cours de l'évolution dans la mesure où le site consensus de phosphorylation est absent des séquences de l'artémie, du nématode, du riz et des levures. Corrélativement, eEF-1 purifié d'artémie n'est pas phosphorylable *in vitro* par CDK1/cycline B (Janssen et al., 1991). Le(s) rôle(s) de la phosphorylation de eEF-1 reste(nt) à déterminer. La phosphorylation de eEF-1 de xénope ne modifie pas l'activité d'échange de GDP/GTP *in vitro* (Mulner-Lorillon et al., 1992).

b) Les protéines de type eEF-1 β ou β'

La sous-unité β a été clonée pour la première fois chez l'artémie (Maessen et al., 1986), elle ne possède pas de similitude de séquence primaire avec l'homologue fonctionnel procaryotique EF-Ts (thermostable) (Maessen et al., 1986; Janssen et Möller, 1988a; Matsumoto et al., 1994). En revanche, l'analyse par résonance magnétique nucléaire montre une ressemblance de structure tridimensionnelle entre eEF-Ts et eEF-1 β (Perez et al., 1999). Les différentes séquences connues codant pour les sous-unités β ou β' sont indiquées dans le Tableau III.

β	Aeropyrum parnix (partielle) (BAA81496) Arabidopsis Thaliana (X74733/X74734/S37102/P48006) Artemia salina (M35636/P12262) Beta vulgaris (Z97067) Caenorhabditis elegans (L25599) Candida albicans (X96517/P78590) Dictyostelium discoideum (AB007025/BAA25924) Gallus gallus (AF103726/AAD16874) Homo sapiens (X60656/S25432) Homo sapiens (X60489/P24534) Mus musculus (AAC13264/AF029844) Oryctolagus cuniculus (P34826/X74728) Oryza sativa (D23674/S41086) Plasmodium falciparum (AL034559) Pimpinella brachycarpa (U87222) Saccharomyces cerevisiae (D14080/P32471/S43445) Schyzosaccharomyces pombe (D82574) Sulfolobus solfataricus (X76768/S57286/S57268) Sus scrofa (P29412/A61442) Trypanosoma cruzi (L12584/P34827) Xenopus laevis (X69764/P30151/S30223)	Kawarabayasi et al., 1999* Gidekel et al., 1996 Maessen et al., 1986 Viereck, 1997* Sulston et al., 1992 Maneu et al., 1996 Chae et Maeda, 1998 Ghatpande et Siddiqui, 1998* von der Kammer et al., 1991 Sanders et al., 1991 Tu et al., 1997* Chen et Traugh, 1995 Matsumoto et al., 1994 Bowman et al., 1999* Moon et al., 1997* Hiraga et al., 1993 Mita et al., 1997 Arcari et al., 1995 Amons et al., 1992* Plumas-Marty et al., 1994 Cormier et al., 1993 Taira et al, 1992 Murphy et al, 1998*
β'	Oryza sativa (P29545/D12821/S29224) Triticum aestivum (D13147/S35501/P29546)	Matsumoto et al, 1992 Oizumi et al, 1992
beta2	Oryza sativa (D83727/D83726)	Terui et al, 1998

Tableau III: Les différentes protéines de type eEF-1 β , eEF-1 β' et eEF-1beta2 séquencées.

Les séquences sont rangées par ordre alphabétique. Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros d'accès aux banques de données. Les références correspondent aux articles publiés ou le cas échéant aux références des séquences dans les banques (*).

La protéine de type eEF-1 (Figure 5) est la plus petite sous-unité du complexe, son poids moléculaire est compris entre 26 kDa et 30 kDa. Elle possède l'activité d'échange de GDP/GTP au niveau de eEF-1A et ainsi stimule la liaison de l'aminocyl-ARNt sur le ribosome (Murakami et al., 1978; Slobin et Möller, 1978; Ejiri et al., 1983; Carvalho et al., 1984). La similitude entre les séquences de eEF-1 est plus forte dans les domaines C-terminaux, ce qui est corrélé à l'activité catalytique qui réside dans ce domaine (Van Damme et al., 1990; Van Damme et al., 1991; Carr-Schmid et al., 1999). La partie C-terminale seule assure la fonction d'échange de GDP/GTP de eEF-1 (Carr-Schmid et al., 1999). La protéine eEF-1 possède une région hydrophile en position centrale, elle n'est pas directement impliquée dans l'activité mais son absence provoque une diminution de celle-ci (Van Damme et al., 1990). La région C-terminale de eEF-1 interagit avec eEF-1A alors que la partie N-terminale interagit avec eEF-1 (Van Damme et al., 1991; Figure 5).

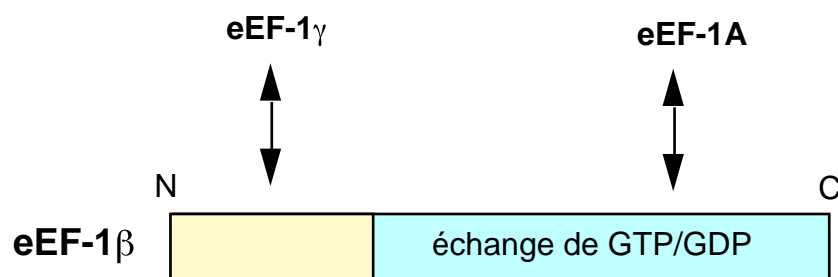


Figure 5: Structure de la protéine de type eEF-1β.

Les flèches représentent les interactions physiques.

Les expériences de délétion fonctionnelle de eEF-1 indiquent que ce facteur est essentiel pour la levure (Hiraga et al., 1993; Carr-Schmid et al., 1999). Les expériences de mutations montrent que eEF-1 intervient dans l'activité du facteur eEF-1A non seulement pour stimuler l'élongation, mais aussi pour assurer la fidélité de la traduction (Kinzy et Woodford, 1995; Carr-Schmid et al., 1999).

Chez les plantes, une deuxième protéine légèrement plus petite que $eEF-1\beta$, nommée eEF-1', a été trouvée au cours des purifications (Ejiri et al., 1983). Elle a été clonée chez le riz (Matsumoto et al., 1992) et le blé (Oizumi et al., 1992). Les deux protéines ont des séquences similaires (60 %) avec une plus grande conservation dans le domaine C-terminal (Matsumoto et al., 1994), elles ont la même activité d'échange de GDP/GTP et de stimulation de l'activité de liaison de l'aminocyl-ARNt au ribosome (Ejiri et al., 1983). Le complexe eEF-1B isolé à partir de plantes, contient les deux protéines eEF-1 et eEF-1' en quantités équimolaires (Ejiri et al., 1983).

Un nouveau type de gène codant pour une sous-unité nommée beta2, ayant des similitudes avec β et β' , a été découverte récemment chez le riz (Terui et al., 1998).

L'analyse des séquences permet de regrouper toutes les protéines β/β' animales ou végétales (article1). Les complexes eEF-1B de plantes contiennent les deux protéines issues de gènes paralogues β et β' dont les fonctions respectives ne sont pas connues. Les complexes eEF-1B d'animaux contiennent une seule protéine de ce type β . Les complexes de ver à soie (Taira et al., 1992) et de drosophile (Murphy et al., 1998*) ne font pas exception bien que l'unique protéine ait été nommée " β' ".

En 1986, Maessen et collaborateurs ont observé que eEF-1 β était phosphorylable *in vitro* (Maessen et al., 1986). La phosphorylation de eEF-1 β est réalisée par une protéine kinase de type CK2 (Janssen et al., 1988). La CK2 phosphoryle, *in vitro*, les sous-unités eEF-1 β de l'artémie, de germe de blé, des réticulocytes de lapin et des ovocytes de xénope (Janssen et al., 1988; Bellé et al., 1989; Palen et al., 1990; Palen et al., 1994). Le site de phosphorylation a été identifié chez l'artémie à la sérine 89 (Janssen et al., 1988) et chez le lapin aux sérines 106 et 112 (Chen et Traugh, 1995) qui se trouvent dans des sites consensus de phosphorylation par la CK2 (revue dans Pinna et Meggio, 1997). La figure 6 représente l'alignement des séquences des protéines eEF-1 β/β' dans la région des sites consensus de phosphorylation par la CK2.

	<u>site III</u>	<u>site I</u>	<u>site II</u>
beta S.cerevisiae	SAAAAEEE	EDDDV	DLFGSDDEEADAEAEKW
beta C.albicans	AAAAAEEE	DDEDV	DLFGSDDE-VDEEAEKL
beta S.pombe	GAAAAEE	--DEI	DLFGSDEE-EDPEAERI
beta T.cruzi	PAKQADE	--DEE	IDLFGGEATEEEETAALAK
beta D.discoideum	IAAPAAPK	ADDDV	DLFGSDDEDEEYDRQL
beta C.elegans	-APAAAA	ADGDDF	DLFGSDDEEEDAEEKAKI
beta A.salina	PTSASKEED	-DDVD	DLFGS--DEEDEEAEKI
beta B.mori	PAPAAKDD	DDDDV	DLFGSGDEEEDAEAEERI
beta D.melanogaster	AAAKPAAD	DDDDV	DLFGSDDEE-DEEAEERI
beta X.laevis	AAKETKEE	DDDDI	DLFGSDDEEESSEDAKRV
beta H.sapiens	GATDSK	--DDDD	IDLFGSDDEEESSEAKRL
beta O.cuniculus	GATDSK	--DDDD	IDLFGSDDEEESSEAKRL
beta G.gallus	GATDSK	--DDDD	IDLFGSDDEEESSEAKRL
beta M.musculus	GAADAK	--DDDD	IDLFGSDDEEESSEAEKL
beta P.brachycarpa	KASAAEDD	DDDDV	DLFGGEETEEKKASEE-
beta B.vulgaris	KASAAEDD	DDDDV	DLFGGEETEEKKAAEE-
beta O.sativa	KAPAAEDD	DDDDV	DLFGGEETEEKKAAEE-
beta A.thaliana	KDAAPDEE	DDDDV	DLFGQETEEKKAAEE-
beta2 O.sativa	KAPAADEE	DDDDV	DLFGGEETEEKKAAEE-
beta' O.sativa	PAAKDAED	DDDDL	DLFGDETEEDKKAAD--
beta' T.sativum	PAAKDEED	DDDDM	DLFGDETEEDKAAA--

Figure 6: Alignement des séquences protéiques de eEF-1 β , eEF-1 β' et de eEF-1beta2 dans la région contenant le ou les sites de phosphorylation par la CK2 .

les résidus thréonine phosphorylables par la CK2 sont en vert
les résidus sérine phosphorylables par la CK2 sont en rouge.

Les sites consensus sont localisés dans la région contenant des successions (au moins 12) d'acides aminés acides D (aspartate) et E (glutamate), région charnière entre les domaines N et C-terminaux. L'observation des alignements fait ressortir trois positions consensus (Figure 6). Toutes les séquences animales contiennent le site I (correspondant à la sérine 89 de l'artémie) sous forme de sérine ou pour le trypanosome sous forme de thréonine. Les plantes possèdent une thréonine dans l'environnement voisin du site I. Cependant, eEF-1^α de blé et de riz (Ejiri et Honda, 1985; Matsumoto et al., 1994) n'étant pas phosphorylées par la CK2 *in vitro* cette thréonine ne serait pas un site pour la CK2. Il faut noter que eEF-1^α de blé et de riz sont phosphorylées par la CK2 *in vitro*, sur un résidu sérine non identifié (Matsumoto et al., 1993), et donc hors du site I. Les séquences des vertébrés possèdent le site II (correspond à la sérine 112 du lapin). Le site III est aléatoirement présent. Toutes les séquences animales possèdent donc dans la région charnière riche en DE au moins un, et jusqu'à trois sites de phosphorylation par la CK2. Certaines des séquences végétales possèdent un site non identifié pour la CK2.

La phosphorylation de eEF1^α par la CK2 pourrait avoir lieu à un moment précis du cycle d'élongation lorsque eEF-1A-GDP est associée à eEF-1B puisque la phosphorylation est fortement stimulée en présence de GDP (Palen et al., 1994).

Le rôle de la phosphorylation de eEF-1^α par la CK2 est controversé. Janssen et collaborateurs ont rapporté que la phosphorylation de eEF-1^α par la CK2 provoque une diminution de l'activité d'échange de eEF-1^α sur eEF-1A (Janssen et al., 1988). En revanche, Sheu et Traugh (1997) n'observent pas de modification de l'activité d'élongation de la sous-unité eEF-1A lorsque eEF-1^α est phosphorylée par la CK2 (Sheu et Traugh, 1997). Les conditions expérimentales sont difficilement comparables (substrat: protéine native ou recombinante, enzyme, réaction etc...) et les résultats devraient être réévalués.

La protéine eEF-1^α de lapin est phosphorylable *in vitro* par la protéine kinase C sur un résidu sérine non défini. La phosphorylation de eEF-1^α provoque une stimulation de l'échange de nucléotides et de l'activité d'élongation (Venema et al., 1991a; Venema et al., 1991b; Peters et al., 1995), cette stimulation d'activité est retrouvée *in vivo* dans les réticulocytes en réponse au PMA (Venema et al., 1991b).

La protéine eEF-1^α est également phosphorylable par la S6 kinase multipotentielle sur un résidu sérine *in vitro* et en réponse à l'insuline. Cette phosphorylation provoque aussi une stimulation de l'activité d'élongation (Chang et Traugh, 1997; Chang et Traugh, 1998).

En conclusion, les complexes eEF-1B animaux contiennent une protéine de type eEF-1^α et les complexes de plantes, deux protéines du même type. La protéine kinase C et la S6 kinase peuvent réguler l'élongation par l'intermédiaire de la phosphorylation de eEF-1^α, tout

au moins chez les animaux. Le rôle de la phosphorylation par la CK2 pourrait être au niveau de la régulation des interactions entre les constituants de eEF-1B.

c) La protéine spécifique de eEF-1B des animaux: eEF-1 δ

La protéine eEF-1 δ est la plus récente des sous-unités du complexe eEF-1 à avoir été identifiée (Bellé et al., 1989). La séquence est déterminée chez quelques eucaryotes (Tableau IV).

Artemia salina (P32192)	Amons et al., 1994
Homo sapiens (P29692/NP001951)	Sanders et al., 1993
Oryctolagus cuniculus (U47663/U42769/P53787)	Sheu et Traugh, 1997
Sphaerechinus granularis (Y14235/Y14236)	article 1
Xenopus laevis δ 1 (X66387/P29693)	Morales et al., 1992
Xenopus laevis δ 2 (X85096)	Minella et al., 1996b

Tableau IV: Les différentes protéines eEF-1 δ séquencées.

Les séquences sont rangées par ordre alphabétique. Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros d'accès aux banques de données. Les références correspondent aux articles publiés.

La protéine eEF-1 δ (PM entre 28 et 36 kDa) possède un domaine d'échange de nucléotides analogue à celui des protéines de type eEF-1 α , situé dans le domaine C-terminal (Morales et al., 1992; Amons et al., 1994; figure 7). Elle stimule l'échange de nucléotides *in vitro* (Van Damme et al., 1990; Bec et al., 1994). En revanche, la protéine eEF-1 δ n'est pas similaire aux protéines de type eEF-1 α , si l'on en juge par le domaine N-terminal totalement différent (article 1). En particulier, elle ne correspond ni à eEF-1 α ou β des plantes (Matsumoto et al., 1994; article 1).

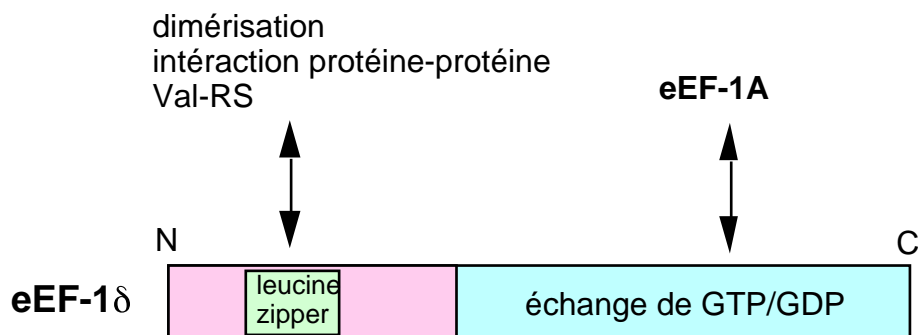


Figure 7: Structure de la protéine eEF-1 δ .

Les flèches représentent les interactions physiques.

La protéine eEF-1 est absente des complexes de plantes ainsi que des séquences déduites des génomes de plantes partiellement ou entièrement séquencés. Elle est absente également des levures (voir article 1 et banques de séquences). Initialement découverte chez le xénope (Bellé et al, 1989), elle a été identifiée chez d'autres vertébrés et invertébrés dont l'oursin (article 2). Cependant la protéine eEF-1 pourrait ne pas être universelle dans le règne animal (article 1). La protéine provient d'un ancêtre commun aux protéines de type eEF-1 auquel s'est adjoint un domaine N-terminal particulier. La partie N-terminale ne montre pas d'homologie significative avec d'autres protéines (Van Damme et al., 1990). Elle contient un motif de type leucine zipper (Morales et al., 1992; Sanders et al., 1993; Amons et al., 1994; Figure 7 et 8) qui permet les interactions de type protéine-protéine ou de dimérisation (Abel et Maniatis, 1989).

Les ovocytes de xénope possèdent deux sous-unités 1 et 2 traduites à partir de deux messagers différents. Elles sont présentes toutes les deux dans un rapport quantitatif de 1 pour 10 (p34/p36) dans un complexe de haut poids moléculaire (Minella et al., 1996b). Chacune des protéines existe sous plusieurs isoformes (Minella et al., 1994). Il existe aussi trois isoformes de eEF-1 dans les réticulocytes de lapin: p34, p36 et p38. La protéine p36 est la forme prédominante, p34 est présente en plus faible quantité et p38 est seulement observable par immunodétection, les formes multiples sont en partie dûes aux modifications post-traductionnelles (Chang et Traugh, 1998).

La protéine eEF-1 possède le même taux d'activité d'échange de GDP/GTP que eEF-1 (Van Damme et al., 1990; Sheu et Traugh, 1997). Cependant, alors que le domaine C-terminal de eEF-1 humain complémente un mutant déficient en eEF-1 chez la levure, eEF-1 humain (entier ou sa partie C-terminale) en est incapable (Carr-Schmid et al., 1999). Ceci suggère que eEF-1 et eEF-1 ont des spécificités de fonction y compris dans leurs parties C-terminales similaires.

Le motif leucine-zipper du domaine N-terminal de eEF-1 peut être impliqué dans la structure supramoléculaire de eEF-1B ou dans l'association avec d'autres composés cellulaires (Figures 7 et 8). Le motif est particulièrement long, et pourrait être responsable de multimérisation (revue dans Minella et al, 1998) en relation avec la propriété de la protéine de s'aggréger *in vitro* (Bec et al., 1994; Sheu et Traugh, 1997).

```

delta1 X.laevis -----MGSASNKP
delta2 X.laevis -----GSSPNNP
delta O.cuniculus MTTNFLVHEKIWFDFKFKYDDAERSFYERMNGPVPGPSRQENGASVILRDIARARENIQKS
delta H.sapiens MATNFLAHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVRGASRQENGATVILRDIARARENIQKS
delta S.granularis -MAHPLMHENIWFDRNRFQEA EAKYQEHVAS-----QHSG--
delta A.salina ----MRGDNFLYQEKFYEDAERTFQEHLAG-----TYKPKPTAVTE

delta1 X.laevis HNSPQSAASALSNSGDGSELAARVANLEQENQSLHKVVKDLQSAISKLESRLSTLEKSSK
delta2 X.laevis HNSPQ--SAAPSNSGDGSELAARVANLEQENQSLHKVVKDLQSAISKLEIRLSTLEKSSN
delta O.cuniculus LAGSSGPGASSGPGGDHSELAVRIASLEVENQNLRGVVQDLQRAVSKLEARLSALEKSSP
delta H.sapiens LAGSSGPGASSGTSGDHGE LVVRIASLEVENQSLRGVVQELQQAISKLEARLNVLEKSSP
delta S.granularis -LVVQGVGLSVGVGVNDNPEILARLSAVEKENADLRKI TTDLQAAVAKLTERLSALDTS--
delta A.salina TLSGVLPSNTLQLESVALSNKVEALSSENKELKKCIDGLQGLLLGLRQRIETLEGKTT

delta1 X.laevis SQKPAASQPAIEVAARVQKVQVTPAAKEENGTEGEDDDDDDDIDLFGSDNNEEEDA EAAR
delta2 X.laevis SQKPAAPQPVIVKVAAPVQKVQVTPAKEE-NGTGE--DDDDIDLFGSDDEEEDAESAR
delta O.cuniculus THRASAPQTQHVS PMR-----QVEPPAKKAAAPAEDEDEDD-IDLFGSD-EEDK EAAR
delta H.sapiens GHRATAPQTQHVS PMR-----QVEPPAKK PATPAEDEDEDD-IDLFGSDNNEEEDKEAAQ
delta S.granularis -AAPPASQPAQSKP-----VQ-----NGKADEDEDDDDFPFAESDEDEESEEK
delta A.salina GAKLAAPPQKE-----EEDDD--VDLFGSD--EESEEAE

delta1 X.laevis I-REERLKQYAEKSKKPGVIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRTVQMDGLVWGSSK
delta2 X.laevis L-REERLKQYAEKSKKPGVIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRTVQMDGLVWGSSK
delta O.cuniculus L-REERLRQYAEKKARKPALVAKSSILLDVKPWDEETDMARLEACVRSVQLDGLVWGASK
delta H.sapiens L-REERLRQYAEKKAKK PALVAKSSILLDVKPWDEETDMAQLEACVRSIQLDGLVWGASK
delta S.granularis RQTEERLAEYRAKKAKKPGPIAKSNI ILLDVKPWDEETDMAEVEKAVRSVEKDGLLWGASK
delta A.salina KVKAERIAAYQAKKSHKPTVIAKSSILLDIKPWDEETDMGAMEREVRSIAMDGLIWGASK

delta1 X.laevis LVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEITKFEDYVQSV DIAAFNKI
delta2 X.laevis LVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEITKFEDYVQSV DIAAFNKI
delta O.cuniculus LVPVGYGIRKLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEITKFEHVQSV DIAAFNKI
delta H.sapiens LVPVGYGIRKLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEITKFEHVQSV DIAAFNKI
delta S.granularis LVPLAFGIKKLQITCVVEDDKVGTEDIEEALDAFEDLIQSV DVAAFNKV
delta A.salina LVPVAFGVKKLQISCVVEDDKVSVDELVEKIEAFEDYVQSV DIAAFNKI

```

Figure 8: Alignement des séquences protéiques de eEF-1δ.

Les séquences sont alignées par clustal W. Les leucines en rouge représentent la région de la leucine zipper très conservée dans les différentes séquences eEF-1 .

En rose, site de phosphorylation par la CK2

En jaune, site de phosphorylation par CDK1/cycline B

La protéine eEF-1 interagit avec eEF-1A via son domaine C-terminal pour assurer son rôle d'échangeur de GDP/GTP (Sheu et Traugh, 1997; Carr-Schmid et al., 1999, Figure 7).

La protéine eEF-1 est capable d'interagir avec eEF-1 mais pas avec eEF-1 (Sheu et Traugh, 1997). L'ancrage de eEF-1 dans eEF-1B peut donc être assuré par eEF-1. Il ne peut s'expliquer par l'interaction avec eEF-1A facilement dissocié de eEF-1B (Morales et al., 1991; revue dans Bellé et al., 1995). Au cours de la purification de eEF-1B, eEF-1 se dissocie aisément de eEF-1B alors que eEF-1 reste associée ce qui suggère que le domaine de fixation de eEF-1 à eEF-1 est différent de celui de eEF-1. Le rôle du motif leucine zipper dans cette interaction est peu probable car eEF-1 ne possède pas de motif analogue.

La protéine eEF-1 est responsable de l'ancrage de la valyl-ARNt synthétase dans eEF-1B (voir chapitre 1 paragraphe 2d) (Bec et al., 1994). Il n'est pas défini si le motif leucine zipper joue un rôle dans cet ancrage.

La protéine eEF-1 sert-elle à associer le complexe eEF-1B à d'autres partenaires? L'interaction de eEF-1 avec des protéines exogènes a été montrée dans deux cas d'infection virale. La protéine eEF-1 est capable d'interagir avec ICPO (Infected cell protein 0) du virus *Herpes simplex virus*. Cette interaction est responsable de changements d'activité de synthèse protéique résultant de l'infection virale (Kawaguchi et al., 1997). Elle peut aussi interagir avec la protéine Tat du virus HIV-1 et affecter la traduction des messagers de la cellule hôte (Xiao et al., 1998). Ces protéines pourraient détourner eEF-1 de ses partenaires naturels endogènes.

En résumé, la protéine eEF-1 est spécifique des animaux. Elle est présente dans eEF-1B corrélativement à la valyl-ARNt synthétase. Elle joue un rôle d'échangeur de GDP/GTP et possède dans son domaine C-terminal une spécificité par rapport à eEF-1. Elle joue un rôle dans la structure supramoléculaire de eEF-1B et probablement une fonction propre en relation avec son motif leucine zipper.

Chez le xénope, eEF-1 (1 et 2) est phosphorylée *in vivo* par la kinase CDK1/cycline B lors de la maturation méiotique des ovocytes (Mulner-Lorillon et al., 1994; Minella et al., 1996b). Deux sites de phosphorylation ont été mis en évidence dans chacune des protéines. L'un correspond à la thréonine dans la séquence TPA(A)K, l'autre à une sérine non identifiée (Mulner-Lorillon et al., 1994; Minella et al., 1996b, Figure 8). La protéine eEF-1 de lapin est aussi substrat de CDK1/ cycline B. Le site de phosphorylation correspond au site sérine de la protéine eEF-1 du xénope (revue dans Minella et al, 1998). L'analyse des séquences de mammifères montre qu'un acide glutamique occupe la place de la thréonine dans

le site de phosphorylation (TPA(A)K) de la séquence de eEF-1 de xénope. La protéine eEF-1 d'artémie ne possède pas le site TPA(A)K et n'est pas phosphorylée par CDK1. La protéine eEF-1 de l'oursin ne contient pas non plus le site TPA(A)K et n'est pas phosphorylée par CDK1 (article 4, Figure 8). Le rôle de la phosphorylation de eEF-1 par une CDK, chez les eucaryotes supérieurs doit être recherché en tenant compte de l'aspect évolutif.

La protéine eEF-1 est substrat *in vitro* de la CK2 chez le Xénope (Bellé et al., 1989; Figure 8). Elle est phosphorylée sur des acides aminés sérine et thréonine dans un rapport 1/2 chez le xénope (revue dans Bellé et al., 1995). Il a été montré que la sérine 162 est phosphorylée par la CK2 chez le lapin (Sheu et Traugh, 1999). La protéine eEF-1 d'oursin est aussi substrat de la CK2 sur un acide aminé sérine (article 4). La sérine 162 de eEF-1 de lapin est présente dans un site consensus de phosphorylation par CK2 qui se retrouve dans les six séquences connues de eEF-1 (Figure 8). Ce site est homologue au site I de eEF-1 (comparer Figures 6 et 8). Le site II décrit dans les séquences de eEF-1 est présent aussi dans les séquences eEF-1 d'artémie et d'oursin.

La protéine eEF-1 de lapin est phosphorylable par la PKC (Venema et al., 1991a; Venema et al., 1991b) et par la S6 kinase multipotentielle *in vitro* ainsi que *in vivo* en réponse à l'insuline (Chang et Traugh, 1997, Chang et Traugh, 1998). Comme dans le cas de eEF-1A et eEF-1, ces phosphorylations sont corrélées à une stimulation de l'activité d'élongation du complexe.

Nous avons observé une phosphorylation de eEF-1 d'oursin par la PKA *in vitro* (article 4). Une autre phosphorylation a été décrite sur eEF-1 par une protéine kinase U(L)13 lors de l'infection par le virus de l'Herpes. Dans ce cas, eEF-1 est multiphosphorylée sur des sites indéterminés (Kawaguchi et al., 1998; Kawaguchi et al., 1999).

La protéine eEF-1 est substrat de plusieurs kinases, CDK1/cyclineB, CK2, PKC, S6 kinase, PKA, U(L)13 selon son origine. La phosphorylation par CK2 est la plus conservée. Dans le complexe eEF-1B, eEF-1 est la protéine qui présente le plus de régulations potentielles par des protéines kinases multiples suggérant une fonction régulatrice essentielle pour eEF-1.

d) La valyl-ARNt synthétase, la seule aminoacyl-ARNt synthétase associée à eEF-1B

Parmi toutes les aminoacyl-ARNt synthétases, la valyl-ARNt synthétase est la seule associée à eEF-1B chez le xénope (revue dans Bellé et al., 1995), dans les cellules de mammifères (Bec et al., 1989; Motorin et al., 1991) et chez l'artémie (Brandsma et al., 1995). Elle n'a jamais été retrouvée dans les complexes eEF-1B de plantes ou de levures, ce qui est en accord avec le fait que c'est eEF-1 qui est responsable de l'ancrage de l'enzyme dans eEF-1B (revue dans Minella et al., 1998 et voir eEF-1). Chez le xénope et le lapin, la totalité de l'enzyme est dans le complexe eEF-1B alors que chez l'artémie, il existe aussi une forme de l'enzyme non associée (Brandsma et al., 1995). Chez le lapin (Bec et al., 1989), de même que chez le xénope (Minella et al., 1998), une fraction de eEF-1 est dépourvue de la valyl-ARNt synthétase. Le domaine de fixation de la valyl-ARNt synthétase à la protéine eEF-1 se situe dans la partie N-terminale (Brandsma et al., 1995). Ce domaine possède une homologie structurale avec la partie N-terminale de eEF-1 , il pourrait être responsable de l'association.

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

3) Rôles des phosphorylations de eEF-1

Les différentes sous-unités du complexe eEF-1 sont phosphorylables par différentes kinases (Figure 9). Ces phosphorylations peuvent être régulatrices à plusieurs niveaux:

- dans la structure du complexe eEF-1
- dans l'activité d'échange de GDP/GTP
- dans une autre activité liée à l'élongation (fidélité, spécificité...)
- ou dans l'une des multiples activités de eEF-1A.

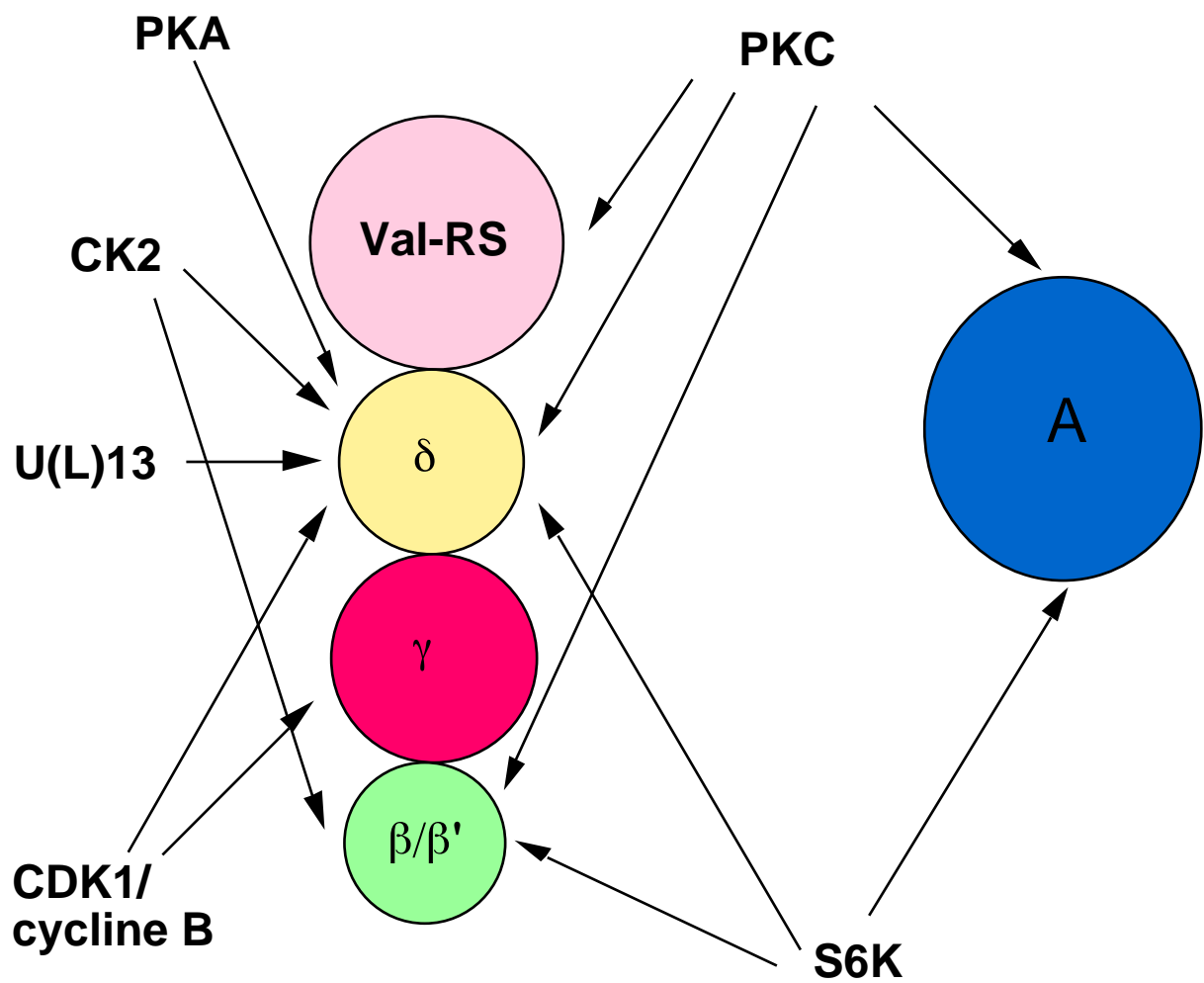


Figure 9: Les phosphorylations des différentes protéines de eEF-1.

Le schéma représente la forme la plus complexe de eEF-1 et rassemble les données sur les phosphorylations mises en évidence à partir des différentes espèces.

La CK2 phosphoryle les sous-unités échangeuses de GDP/GTP. Les effets de la phosphorylation sur l'activité d'échange de nucléotides sont controversés (voir chapitre 1 paragraphe 2b).

La CDK1/cycline B peut phosphoryler les protéines eEF-1 et eEF-1'. Ces phosphorylations sont corrélées à l'augmentation de la synthèse protéique lors de la maturation méiotique chez le xénope par un mécanisme à élucider.

Les phosphorylations de eEF-1 par la PKC ainsi que par la S6 kinase provoque une stimulation de la synthèse protéique et implique quatre des protéines du complexe: eEF-1A, eEF-1', eEF-1 et la valyl-ARNt synthétase.

Il est intéressant de noter que des sites de phosphorylation de CDK1 et de CK2 sont à la charnière des domaines de leurs substrats respectifs, indiquant une grande possibilité de modification de la plasticité des molécules. La protéine eEF-1 par la multiplicité des protéines kinases qui peuvent la phosphoryler, apparaît comme un régulateur central.

4) Structure quaternaire de eEF-1

Le complexe eEF-1 a été purifié à partir de plusieurs espèces animales et végétales. Les protocoles utilisés diffèrent par leurs critères de purification: la protéine eEF-1 chez le xénope, la valyl-ARNt synthétase chez le lapin et l'activité d'élongation chez les autres (Tableau V).

Il a été isolé des formes dites lourdes, appelées eEF-1H qui contiennent eEF-1B et eEF-1A chez les animaux (Hattori et Iwasaki, 1983; Slobin et Möller, 1975; Slobin et Möller, 1976; Carvalho et al., 1984) ainsi que chez les végétaux (Bollini et al., 1974; Ejiri et al., 1983). Les formes légères ne contiennent que eEF-1A. Le facteur eEF-1B présente une structure différente selon les organismes. Il est composé de quatre protéines: eEF-1', eEF-1, eEF-1 et valyl-ARNt synthétase chez les animaux et eEF-1', eEF-1' et eEF-1 chez les végétaux. Chez les plantes, les protéines sont en quantité équimolaire (Ejiri, 1986; Ejiri et al., 1994). La

quantité relative des composants de eEF-1B animaux pose des problèmes pour la construction d'un modèle de structure quaternaire.

espèce	structure	référence
artémie (cystes)	eEF-1abc (PM 200 000) eEF-1a (PM=53000)	Slobin et Möller, 1976
artémie (cystes)	eEF-1 1:1	Janssen et Möller, 1988a
blé (embryon)	eEF-1abc (PM=187000) eEF-1a (PM=51000)	Bollini et al., 1974
blé (embryon)	eEF-1abb'c 1,3:1:1:0,9	Ejiri et al., 1983
cochon (foie)	eEF-1A eEF-1A 1:1:1 (PM=136kDa)	Hattori et Iwasaki, 1980
lapin (réticulocytes)	eEF-1A; eEF-1 ; eEF-1 eEF-1A 1:0,5:1:0,5	Carvalho et al., 1984
lapin/rat/boeuf(foie) lapin (réticulocytes)	eEF-1H/Val-RS eEF-1A	Motorin et al., 1991
lapin (foie)	eEF-1A Val-RS 1:1:1:1:1 (PM= 700 kDa)	Bec et al., 1989 Bec et Waller, 1989
lapin (réticulocytes)	eEF1A Val-RS 1:1:1:1:1	Venema et al., 1991a Venema et al, 1991b
lapin (réticulocytes)	eEF-1A /aminoacyl-tRNA synthétase	Sarisky et Yang, 1991
riz (embryon)	eEF-1 A	Ejiri, 1986
xénope (ovocytes)	dodécamère: 3 tétramères eEF-1 Val-RS 1:1:1:1 (PM=760 kDa) dodécamère: 6dimères 1:1 (PM=550 kDa)	Mulner-Lorillon et al., 1989; Minella et al., 1998
ver à soie (glande)	eEF-1 (= eEF-1A)	Ejiri et al., 1977

Tableau V: Purification et structure de eEF-1.

eEF-1a=eEF-1A; eEF-1b=eEF-1 et eEF-1c=eEF-1

Des modèles de structure quaternaire de eEF-1 d'animaux ont pourtant été proposés à partir des purifications et des expériences de reconstitutions (Janssen et al., 1994; Bec et al., 1994; Minella et al, 1998; Sheu et Traugh, 1999; Figure 10).

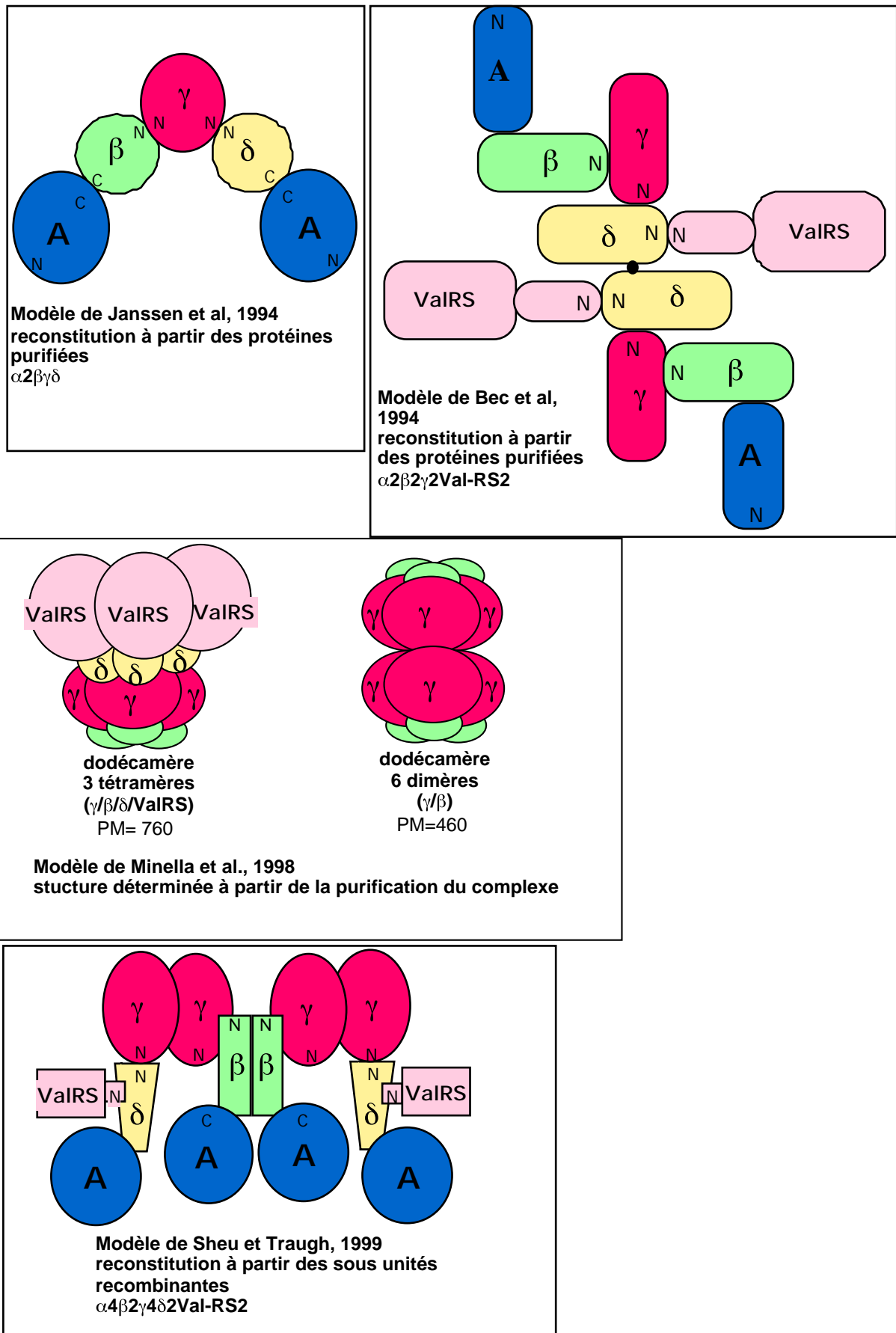


Figure 10: Modèles structuraux de eEF-1.

N et C correspondent respectivement aux domaines N-terminaux et C-terminaux

Le modèle d'artémie propose une association A, β et γ en proportion 2:1:1:1; la valyl-ARNt synthétase n'est pas prise en compte (Janssen et al., 1994). Le modèle de Bec et collaborateurs comprend A, β , γ valyl ARNt synthétase dans les rapports 1:1:1:1:1 dans un dimère (Bec et al., 1994). Le groupe de Traugh propose le complexe sous forme A, β , γ et valyl-ARNt synthétase dans les rapports 2:2:1:1:1 dimérisé (Sheu et Traugh, 1999). Notre groupe propose le modèle contenant d'une part β , γ et valyl-ARNt synthétase dans un rapport 1:1:1:1 dans un trimère et d'autre part α et δ dans un rapport 1:1 en hexamère (trimère de dimères) (revue dans Minella et al, 1998).

Il apparaît un certain nombre de contradictions entre les différents modèles proposés. Le nombre de molécules eEF-1A est présent dans un rapport 0,5 à 1 par rapport à eEF1 β et eEF-1 γ . Les différents modèles représentent tous eEF-1 β en ratio équimolaire sauf celui de Sheu et Traugh (1:2). Après purification, les protéines eEF-1 β et eEF-1 γ sont toujours retrouvées équimolaires et il existe une entité eEF-1 β naturellement présente dans les cellules (Motoyoshi et al., 1977; Janssen et al., 1988; Minella et al., 1998). Les modèles présentent également eEF-1 β et la valyl-ARNt synthétase équimolaires ce qui est cohérent avec le rôle d'ancrage de valyl-ARNt synthétase par eEF-1 β .

Nous préférons écarter le modèle de Traugh dont les expériences de reconstitution (Sheu et Traugh, 1999) ne s'accordent pas avec les résultats précédents de purification du même groupe (Venema et al., 1991b). Notre groupe est le seul à proposer un modèle en trimère plutôt qu'en dimère, pour la cohérence avec les poids moléculaires des formes natives plutôt que des formes reconstituées.

La structure supramoléculaire de eEF-1 sera définitivement résolue par l'analyse en spectrométrie de masse. Le complexe eEF-1B est dans tous les cas un édifice supramoléculaire élaboré.

5) Interactions cellulaires de eEF-1

Des protéines homologues à eEF-1A (ABP-50) ont été retrouvées au niveau de l'actine du cytosquelette chez *Dictyostelium discoideum* (Yang et al., 1990) et associées aux filaments d'actine dans les fibroblastes humains (Bassell et al., 1994). La protéine eEF-1A s'associe à l'actine dans des cellules métastatiques (Edmonds et al., 1996). Une forme de eEF-1A se lie à l'actine et facilite sa polymérisation *in vitro* (Yang et al., 1993). Il existe donc des formes de eEF-1A qui s'associent avec l'actine filamenteuse *in vitro* ou *in vivo*.

D'autre part, il a été montré des associations de eEF-1A avec la tubuline et/ou les microtubules. La protéine eEF-1A de carotte s'associe sur colonne d'affinité avec de la tubuline (Durso et Cyr, 1994). Une protéine responsable de la fragmentation des microtubules de cellules mammaliennes a été identifiée à eEF-1A (Shiina et al., 1994). Des expériences d'immunocytochimie, *in situ*, en présence de détergents, ont montré qu'un homologue de eEF-1A (ABP50) colocalise avec les microtubules chez des protoplastes de carotte (Durso et al., 1996).

Des formes de eEF-1A peuvent donc interagir avec des éléments du cytosquelette, filaments d'actine et microtubules. La présence de eEF-1B dans ces structures n'a pas été recherchée.

Les localisations de eEF-1A et de eEF-1B ont été étudiées dans les cellules en culture, cellules A6 de xénope (Minella et al., 1996a) et dans les fibroblastes humains (Sanders et al., 1996). Les composants de eEF-1 sont au niveau du réticulum endoplasmique dans les cellules A6 (Minella et al., 1996a). Une partie de eEF-1B est associée aussi au niveau des centrosomes. Sanders et collaborateurs observent également la localisation de eEF-1B au niveau du réticulum endoplasmique (Sanders et al., 1996). Ils observent une localisation plus diffuse de eEF-1A dans la même région et trouvent de plus, une localisation nucléaire de ce facteur. Les formes quantitativement majoritaires de eEF-1 sont donc essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui est corrélé avec sa fonction de synthèse protéique et qui probablement implique les domaines hydrophobes de eEF-1 (Bellé et al., 1995).

La contradiction apparente de ces derniers résultats avec l'interaction montrée avec le cytosquelette peut résulter de l'existence des isoformes de eEF-1A dont les rôles seraient spécifiques et de la présence ou non de eEF-1B et surtout des différences de quantités relatives en protéine.

Le complexe eEF-1B peut interagir avec l'ADN lorsque celui-ci a été endommagé par le chrome ou le transplatine, suggérant une localisation nucléaire potentielle du complexe dans des conditions physiologiques particulières (Wang et al., 1997). Ceci pourrait être lié à une fonction spécifique de eEF-1 dans la réparation de l'ADN. L'interaction eEF-1B/acides nucléiques est compatible avec l'homologie structurale étonnante entre eEF-1B et les facteurs de transcription, qui présentent à la fois des motifs leucine zipper et des motifs riches en lysines (Amons et al, 1994).

6) Régulation de l'expression de eEF-1

Les niveaux des messagers et/ou des protéines constitutives de eEF-1 peuvent dépendre d'effecteurs externes, de régulations développementales, de la croissance et de la différenciation cellulaire.

L'expression des messagers de eEF-1A est régulée par des effecteurs externes. Les études chez les plantes indiquent une régulation rapide de l'expression des messagers de eEF-1A en réponse à des signaux de développement ou aux conditions environnementales pour modifier le taux de synthèse protéique (revue dans Browning, 1996; Kidou et Ejiri, 1998).

Chez les animaux, trois types de messagers eEF-1A fonctionnels ont été observés chacun ayant une expression spécifique associée aux cellules embryonnaires, aux cellules adultes musculaires et non musculaires (revue dans Merrick et Hershey, 1996). Chez le xénope, il a été montré une expression différentielle dans l'ovogénèse et le développement précoce de trois messagers, thésaurine (forme de stockage de eEF-1A), eEF-1A ovocytaire et eEF-1A somatique (Picard et al., 1980; Djé et al., 1990).

Dans les cellules animales en culture, les taux d'ARNm codant pour eEF-1A, eEF-1 et eEF-1 sont plus élevés en comparaison avec leur tissu d'origine. De plus, les trois messagers augmentent de façon coordonnée suggérant une régulation concertée (Sanders et al., 1992). En revanche, l'expression de eEF-1 et eEF-1 est découplée qualitativement et quantitativement de celle de eEF-1A au cours du développement précoce du xénope (Morales et al., 1993). Nous avons montré un découplage du même type entre eEF-1A et eEF-1 au cours du développement précoce chez l'oursin (article 3). Ces résultats indiquent une régulation non concertée entre eEF-1A et eEF-1B. Chez l'oursin, deux ADNc codant pour la même protéine eEF-1 ont été mis en évidence (article 2). Le profil d'expression des deux messagers n'est pas le même au cours du développement de l'oursin (article 2).

Bien qu'il existe des régulations au niveau transcriptionnel, les quantités protéiques de eEF-1, eEF-1 et eEF-1 du xénope (Morales et al., 1993; Minella et al., 1994) ou eEF-1 de l'oursin (Delalande et al., non publié) restent constantes au cours du développement précoce. La répartition cellulaire ainsi que les régulations de dégradation et synthèse de la protéine ne sont pas connues.

Au cours du développement d'artémie ou de germe de blé, eEF-1A devient totalement dissocié de eEF-1B (Slobin et Moller, 1975; Sacchi et al., 1984). La fonction de cette régulation n'est pas connue.

Des dérégulations de l'expression des composants de eEF-1 ont été décrites (revue dans Cormier, 2000). La surexpression de eEF-1 a été observée dans différents types de cancer: colorectaux, pancréatiques et oesophagiens (Lew et al., 1992; Chi et al., 1992; Ender et al., 1993; Mimori et al., 1996; Mathur et al., 1998). L'expression de eEF-1 peut être un marqueur de l'agressivité de tumeurs (Ender et al., 1993; Frigerio et al., 1995; Mimori et al., 1996). La surexpression de eEF-1 est un évènement très précoce dans le développement de cancers (Ender et al., 1993). La surexpression de eEF-1 pourrait rendre compte par le domaine GST (voir chapitre 1 paragraphe 2a) de la résistance des tumeurs aux traitements (Billaut-Mulot et al., 1997). Il reste une question non résolue: la surexpression de eEF-1 est-elle une conséquence ou la cause du développement de la tumeur ?

L'ARNm codant pour eEF-1 est fortement exprimé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes et mammaires (Jacob et al., 1996; Kolettas et al., 1998). De plus, eEF-1 est un gène inductible par les radiations ionisantes qui arrêtent la prolifération à la transition G2/M. Puisque l'expression de eEF-1 précède l'arrêt en G2, il aurait un rôle dans la transition G2/M du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN (Jung et al., 1994; voir aussi chapitre 1 paragraphe 5).

L'analyse d'une banque d'ADNc de cellules cancéreuses colorectales humaines a montré que non seulement l'expression de eEF-1, mais aussi de eEF-1 et surtout de eEF-1A était augmentée (Frigerio et al., 1995). L'expression élevée de eEF-1A est aussi corrélée à la prolifération cellulaire (Grant et al., 1992; Jefferies et al., 1994). Or, il existe une protéine appelée PTI-1 (prostatic carcinoma tumor inducing gene) correspondant à une forme tronquée et mutée de eEF-1A (Shen et al., 1995) exprimée dans les tissus cancéreux de la prostate, du colon, du poumon et du sein (Sun et al., 1997). La surexpression de PTI-1 dans des cellules fibroblastiques d'embryons de rats sains provoque un phénotype tumoral agressif. De plus, le blocage de l'expression de PTI-1 avec des oligonucléotides antisens entraîne un retour à une morphologie cellulaire normale (Su et al., 1998). PTI-1 est donc un réel oncogène (Shen et al., 1995). La protéine eEF-1A est-elle le proto-oncogène de PTI-1?

En conclusion, les données obtenues sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des différentes protéines du facteur eEF-1 permettent de considérer le complexe eEF-1 comme un acteur essentiel dans la régulation de la traduction, maillon de la régulation de l'expression des gènes. Le facteur eEF1 est une cible multiple de plusieurs protéines kinases. Le rôle de ces phosphorylations est loin d'être élucidé. Cette compréhension nécessite de tenir compte des fonctions spécifiques de chaque constituant, de

la structure même de chaque type de complexe eEF-1B et aussi des différences évolutives dans les compositions et les sites de phosphorylation. Les phosphorylations et les changements dans l'expression des constituants de eEF-1 sont associés à de grandes modifications de l'activité cellulaire dans lesquelles de nombreux mécanismes biologiques sont impliqués, dont ceux responsables de la synthèse protéique.

Le rôle de eEF-1 dans la régulation de la synthèse protéique associée à des grandes fonctions biologiques peut être abordé grâce à plusieurs modèles biologiques: les actions des virus, les cellules en culture, les lysats de réticulocytes et les oeufs d'amphibiens ou d'échinodermes (Mathews et al, 1996). Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi le développement précoce des oeufs de l'oursin *Sphaerechinus granularis*.

II- Le développement des embryons d'oursin

A- Choix du modèle biologique

Les résultats concernant le facteur eEF-1 ont été principalement obtenus grâce aux études effectuées dans les ovocytes du xénope, dans les réticulocytes de lapin et les embryons de l'artémie. Les études de complémentation de gènes chez les levures n'ont pas permis pour l'instant de comprendre le rôle régulateur de eEF-1. Elles ne peuvent apporter de réponse sur la fonction de eEF-1, absent chez les levures (Kinzy et Woodford, 1995; Carr-Schmid et al., 1999). Aucune autre approche génétique, notamment chez la drosophile, n'a pour l'instant été débutée.

L'oursin nous apparaît comme le modèle de choix pour tenter de comprendre le rôle de la phosphorylation de eEF-1 dans la régulation de ses fonctions. La fécondation provoque une augmentation de la synthèse protéique et le synchronisme des oeufs permet d'étudier la régulation de celle-ci au cours du cycle cellulaire et du développement précoce. Les ovocytes d'oursin ont d'autres atouts intéressants. La grande quantité d'oeufs disponible permet les études quantitatives et biochimiques. Les oeufs peuvent être fécondés facilement, les phénomènes liés à la fécondation peuvent être suivis clairement (élévation de la membrane de fécondation) et le développement est rapide (stade pluteus en 3 jours). La transparence des

embryons permet de faire une observation microscopique du développement. La multiplication cellulaire n'est pas accompagnée par une augmentation de la masse. L'enveloppe ne présente pas de résistance à l'homogénéisation et est perméable aux précurseurs métaboliques (Giudice, 1973).

De nombreuses études ont été consacrées au développement des échinodermes et en particulier celui de l'oursin, modèle de référence dans ce domaine (Hörstadius, 1973; Giudice, 1973).

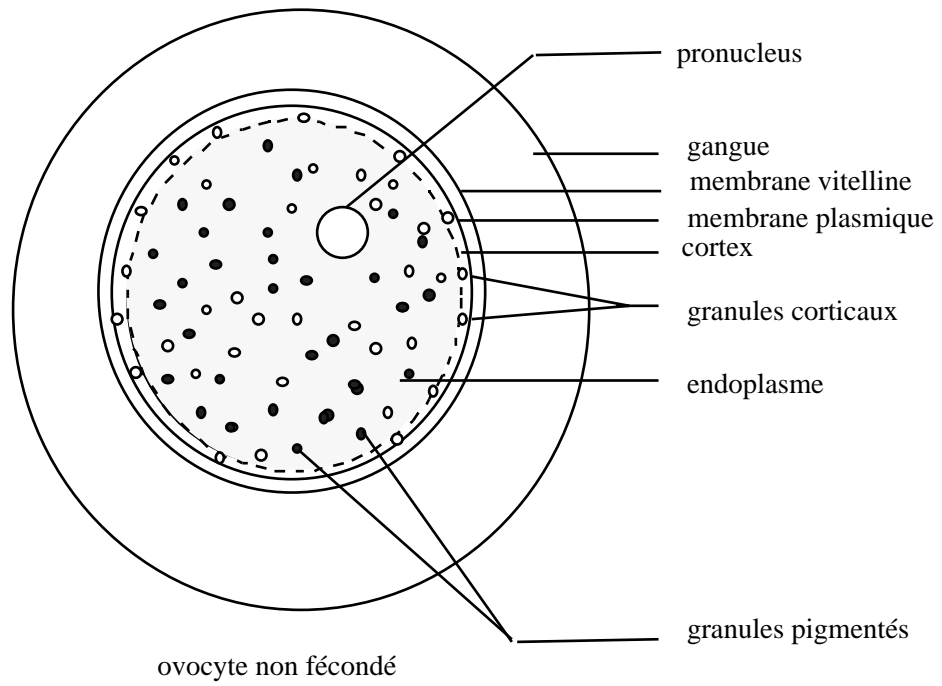
Les espèces généralement utilisées sont *Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus pictus* et *Arbacia punctulata*. Les principales espèces présentes au large de Brest sont *Sphaerechinus granularis*, *Paracentrotus lividus* et *Echinus esculentus*. Nous avons choisi dans le cadre de notre étude *Sphaerechinus granularis* pour des raisons de disponibilité des gamètes fécondables toute l'année et de facilités expérimentales.

B- Fécondation et développement de l'oeuf d'oursin *Sphaerechinus granularis*

Les oursins sont des membres du large groupe des invertébrés marins, ils appartiennent au phylum des Echinodermes (animaux recouverts d'épines) qui inclue aussi les étoiles de mer, les concombres de mer, les lis de mer, et les ophiures (Kato and Schroeter, 1985)

Les oursins sont gonochoriques et la fécondation est externe. En laboratoire, la ponte est induite par injection de KCl ou d'acétylcholine à travers le péristome ou encore par choc électrique (Hinegardner, 1969; revue dans Giudice, 1973). L'ajout de glycine avant la fécondation facilite la levée de la membrane de fécondation. La fécondation d'ovocyte d'oursin est visualisée par la levée de cette membrane, facilement observable au microscope (Figure 11, revues dans Epel, 1977; Schuel, 1978; Epel, 1978).

La fécondation de l'oeuf d'oursin entraîne une réactivation du métabolisme cellulaire (revues dans Epel, 1978; Swann et Whitaker, 1990) et constitue le point de départ du programme de développement de l'embryon (revue dans Epel, 1990). La vitesse de développement dépend de la température (revue dans Giudice, 1973), en général, les cultures se font entre 16°C et 18°C, conditions dans lesquelles le stade pluteus est obtenu en trois jours.



↓ + spermatozoïde

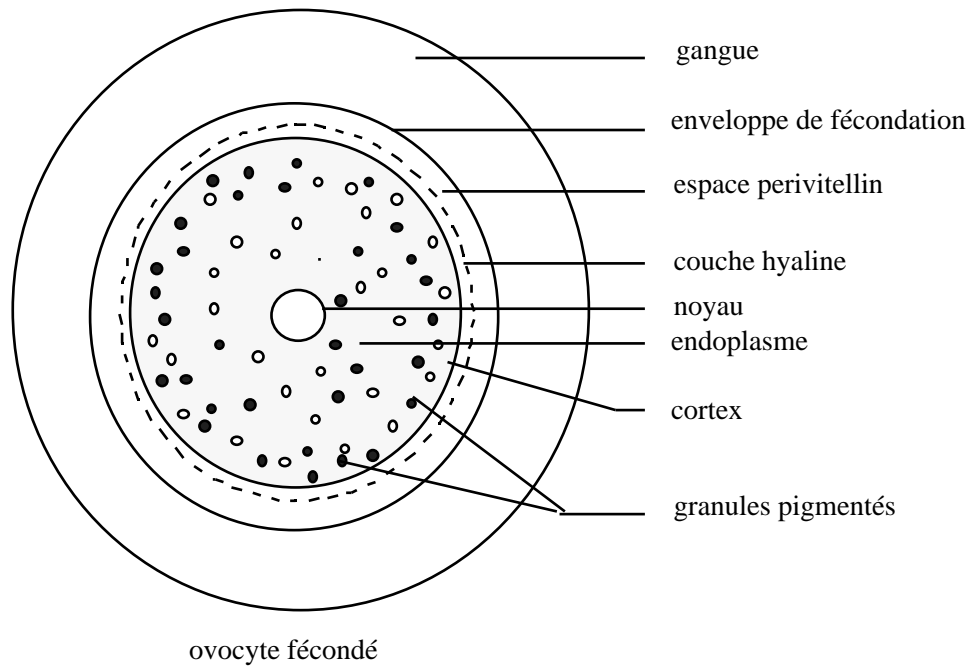


Figure 11: Schéma de l'oeuf d'oursin à la fécondation.

La maturation chez l'oursin, qui correspond à la levée du blocage prophase 1, s'effectue dans la cavité générale sous l'influence d'un stimulus encore inconnu. L'oeuf mature a un diamètre de 80 à 180 μm (*Sphaerechinus granularis*: 90-100 μm) et est bloqué en phase G1 du cycle cellulaire après avoir terminé sa méiose (stade ovule). Le spermatozoïde fécondant, non seulement fournit son ADN pour restaurer la diploïdie mais aussi active l'oeuf en le libérant de son blocage en phase G1 (environ 1 heure) Après la fusion des gamètes, les embryons progressent en phase S (phase de synthèse de l'ADN, durée 20 minutes) puis c'est le début des divisions mitotiques (Figure 12).

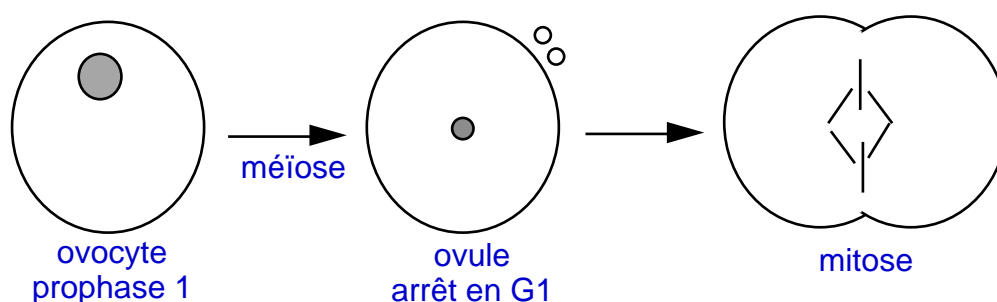


Figure 12: Déroulement de la maturation méiotique et de la fécondation chez l'oursin. L'ovocyte d'oursin après avoir effectué la maturation méiotique est bloqué en phase G1, la fécondation lui permet de répliquer son ADN puis de reprendre les divisions mitotiques.

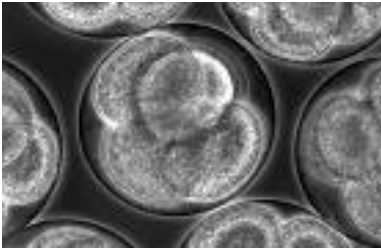
La première partie du développement consiste en une succession de phases S/M de divisions rapides, avec un taux de division dix fois plus élevé qu'au moment de la blastula (Parisi et al., 1978). La première division s'effectue en 2 à 2h 30, la deuxième en 1h 30 et les suivantes en 30 minutes. Le retour à des divisions plus lentes à partir de la blastula (environ 12h après fécondation) correspond à l'acquisition de phases d'intervalle G1 et G2. Au stade blastula (400 cellules), les embryons sécrètent une protéase qui dissout la membrane de fécondation pour permettre l'éclosion. L'archentéron (intestin embryonnaire) va se développer à partir du blastopore qui donnera l'anus. L'archentéron se forme aux environs de 46h (stade gastrula) puis la morphogénèse a lieu. A 72 heures après la fécondation, la larve plutéus (1500 cellules) est suffisamment développée pour se nourrir et exister sous forme pelagique libre (Figure 13).



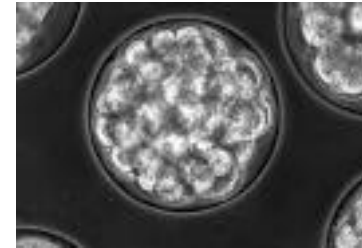
ovocyte fécondé



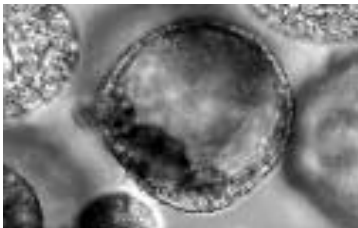
stade 2 cellules (2h30)



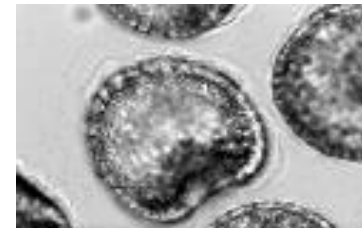
Stade 4 cellules (4 h)



Stade morula (6 h)



Blastula nageante (22 h)



Gastrula précoce (26 h)



Gastrula tardive (28 h)



Prisme précoce (40 h)



Plutés (70 h)

Figure 13: Quelques stades de développement précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis*

Les temps correspondent aux heures auxquelles les photos ont été prises.

Jusqu'à la prise de nourriture la masse de protéines et d'ARN reste constante. Les messagers maternels et les protéines accumulés pendant l'ovogénèse permettent le développement rapide ultérieur (Davidson et al., 1982). Avant la prise de nourriture, l'embryogénèse fait intervenir un processus de division cellulaire, de réorganisation des composés maternels, d'apparition de nouveaux transcrits et de leurs produits.

C- La synthèse protéique au cours du développement précoce: transcription et démasquage

La fécondation provoque une augmentation de la synthèse protéique. Celle-ci peut résulter de l'augmentation du nombre de messagers transcrits (transcription et traduction) et/ou de l'augmentation de la traduction de messagers déjà présents (démasquage et traduction).

1) Disponibilité des ARN messagers

Les ARN messagers traduits pendant le développement proviennent de deux sources, les ARNm maternels accumulés au cours de l'ovogénèse et ceux qui sont nouvellement transcrits dans l'embryon.

La régulation de la transcription a été largement étudiée au cours du développement, notamment chez l'oursin (revues dans Giudice, 1973; Davidson, 1986). Il est clairement établi que la transcription continue dans le zygote et au cours des divisions (Nemer et Infante, 1965; Rinaldi et Monroy, 1969; Kedes et Gross, 1969; revues dans Giudice, 1973; Davidson, 1986). Contrairement au xénope ou à la drosophile, il n'y a pas d'arrêt de la transcription (revue dans Davidson, 1986). La reprise de la transcription dans ces espèces s'effectue à la blastula, on parle alors de MBT (mid-blastula-transition) (revues dans Etkin, 1988; Yasuda et Schubiger, 1992). Afin de déterminer le rôle de la transcription au cours des premières divisions chez l'oursin, des études ont été réalisées en présence d'un inhibiteur spécifique de la transcription: l'actinomycine D (Gross et Cousineau, 1963; Gross et Cousineau, 1964; revue dans Giudice, 1973). En présence d'actinomycine D, les divisions sont ralenties et les embryons sont incapables de dépasser le stade blastula. Les transcrits précoces sont donc nécessaires pour la chronologie des divisions et pour permettre la transition blastula/gastrula. L'un de ces premiers transcrits correspond à l'histone 2A (Palla et al., 1999).

Quelques ARN messagers (ARNm) transcrits au moment de la blastula précoce ont été caractérisés. Ces messagers appelés transcrits VEB (Very Early Blastula) sont en nombre

restreint, parmi eux le messenger codant pour l'enzyme d'éclosion SpHE (*Strongylocentrotus purpuratus* hatching enzyme), et sont progressivement spatialement distribués le long de l'axe animal-végétal (Reynolds et al., 1992).

Les ARNm stockés dans l'ovocyte non fécondé sont présents sous forme masquée dans des complexes mRNP (messenger ribonucleoprotein: ARN complexé avec des protéines ou ribonucléoparticules) ou sous forme de messagers incomplètement matures représentant jusqu'à 70% de la masse des poly(A). Ces messagers, de grande taille (de 5 à 15 kb), contiennent une queue poly(A) de 50 à 120 nucléotides et des séquences caractéristiques appelées "interspersed repeat sequences" (revue dans Davidson et al, 1982). Ces séquences, généralement présentes dans les ARNm nucléaires (Posakony et al., 1983) consistent généralement en des motifs répétés de 150 à 200 nucléotides (Constantini et al, 1980). Elles peuvent être soit localisées dans la partie 3' non codante soit intercalées entre les séquences codantes (Posakony et al., 1983). Ce type de messagers représente encore 15% des messagers au stade gastrula. Les séquences répétitives sont absentes dans les ARNm polysomiaux (revue dans Davidson et al, 1982). Ces séquences existent aussi chez le xénope (Anderson et al., 1982). La conservation de ces séquences au cours de l'évolution de l'oursin indique qu'elles ont une importance fonctionnelle (Moore et al, 1980). Ces séquences constitueraient une réserve pour le développement et seraient régulatrices de la traduction.

Le profil d'expression des ARNm change au cours de la transition blastula-gastrula précoce avec l'apparition massive de messagers zygotiques synthétisés (Brandhorst et Humphreys, 1971; Galau et al., 1977). Le point de développement auquel les messagers maternels sont remplacés par les messagers zygotiques est variable selon les ARN (Cabrera et al., 1984).

Les messagers majoritaires ont été analysés à trois stades différents du développement: oeuf non fécondé, stade gastrula et stade pluteus. Ils sont qualitativement très comparables aux trois stades (Figure 14). La quantité des messagers est fortement diminuée à la gastrula (Lasky et al., 1980; Flytzanis et al., 1982). Les transcrits maternels disparaissent et sont remplacés par de nouveaux transcrits. Cependant, 10% des transcrits qui sont abondants au stade gastrula ou pluteus sont absents ou rares dans l'oeuf (Flytzanis et al., 1982). Quelques rares ARN spécifiques ne sont exprimés qu'aux stades précoces (Lev et al., 1980).

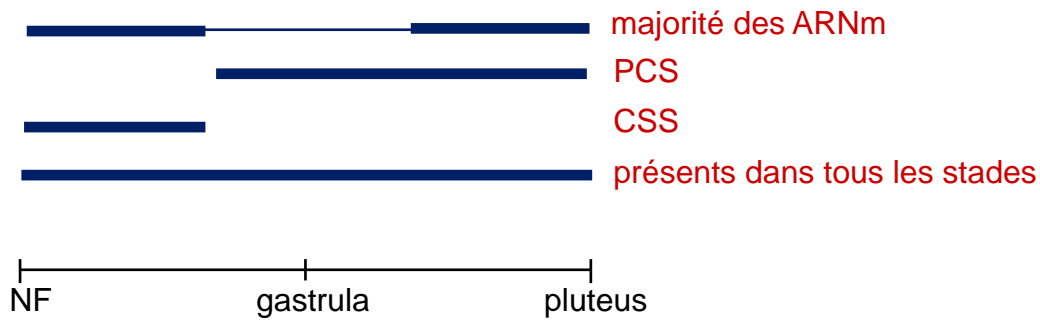


Figure 14: Profil des principales classes de messagers.

L'épaisseur fine du trait signifie que les messagers sont présents mais en plus faible quantité

CSS: cleavage stage specific

PCS: post cleavage stage specific

Kelso-Winemiller et collaborateurs ont défini deux classes de messagers selon leur profil d'expression (Figure 14). Les ARNs CSS (cleavage stage-specific) spécifiques des stades de division rapide et les ARNs PCS (post cleavage specific), spécifiques des stades ultérieurs (Kelso-Winemiller et al., 1990). Cette étude a été réalisée avec des ADNc obtenus à partir des ARNm recrutés dans les polysomes au stade 2 cellules. Les CSS, abondants dans les stades de division rapides, déclinent en début de la blastula. Les PCS sont présents à des concentrations relativement faibles au cours des divisions rapides et ensuite augmentent au stade blastula avec l'accumulation de nouveaux transcrits. Tous les CSS ont une taille supérieure à 3 kb et contiennent une longue région 3' non codante, les PCS ont une taille inférieure à 3 kb (Kelso-Winemiller et al., 1990). Les régions 3' non codantes très longues sont caractéristiques des messagers maternels de l'oursin (Pines et Hunt, 1987). Ces régions 3' non codantes doivent contenir des séquences régulatrices responsables des profils d'expression des CSS. Leur recrutement dans les polysomes est différent, les CSS sont recrutés plus vite que les PCS et sont traduits plus efficacement (Kelso-Winemiller et al., 1990; Kelso-Winemiller et al., 1993). Les PCS font partie des messagers qui apparaissent après le stade gastrula et qui représentent 10% des messagers majoritaires (voir ci-dessus).

Nous avons étudié les messagers codant pour les protéines eEF-1 et eEF-1A. Les messagers de 2,7kb codant pour eEF-1A et pour eEF-1 se comportent comme les messagers majoritaires (articles 2 et 3). Les messagers eEF-1A (2,7kb) et eEF-1 (2,0 et 2,7 kb) peuvent appartenir à la classe des PCS.

Les mécanismes d'élimination des séquences répétées ou de démasquage des messagers ne sont pas élucidés. La polyadénylation, nécessaire à la traduction a été étudiée et augmente à la fécondation (Slater et al., 1973; Slater et al., 1974; Wilt, 1977; Peters et Jeffery, 1978).

L'acquisition de la coiffe en 5' est nécessaire pour la traduction des messagers (Winkler et al., 1983; Caldwell et Emerson, 1985). L'oursin n'est pas utilisé comme modèle pour les mécanismes de démasquage et d'entrée dans les polysomes (revues dans Spirin, 1996; Richter, 1996).

2) Régulation de la traduction

La fécondation des oeufs d'oursin provoque une augmentation de 5 à 15 fois de la synthèse protéique (Gross et Fry, 1966; Epel, 1967; Humphreys, 1969; Brandhorst, 1976; Regier et Kafatos, 1977; Grainger et al., 1979). La synthèse protéique est nécessaire à la division cellulaire (Hultin, 1961; Wilt et al., 1967; Wagenaar et Mazia, 1978; Wagenaar, 1983; Grainger et al., 1986), dont la synthèse de cyclines (Evans et al., 1983), protéines de régulation du cycle cellulaire (Morgan, 1997).

L'augmentation de la synthèse protéique, au cours des divisions rapides, est indépendante de la transcription jusqu'au stade blastula. Elle n'est pas affectée par la présence d'actinomycine D (Gross et Cousineau, 1963; Gross et Cousineau, 1964) ni par l'énucléation des oeufs (Brachet et al., 1963; Denny et Tyler, 1964). L'augmentation observée est principalement quantitative (Bedard et Brandhorst, 1983; Grainger et al., 1986). Cependant, quelques changements qualitatifs ont été décrits (Herlands et al., 1982; Evans et al., 1983; Standart et al., 1985; Grainger et al., 1986).

L'augmentation de la synthèse protéique à la fécondation est un processus complexe, faisant intervenir deux types de mécanismes: le recrutement des messagers dans les polysomes et l'activation de la machinerie de traduction. La quantité d'ARNm dans les polysomes augmente (Rinaldi et Monroy, 1969; Epel et al., 1974; Hille et Alberts, 1979; Brandis et Raff, 1979; Goustin et Wilt, 1981; Raff et al., 1981). La quantité d'ARNm traduits augmente de 10 à 15 fois (Humphreys, 1971). Le nombre de ribosomes dans les polyribosomes augmente de 20 à 25 fois (Infante et Nemer, 1967; Humphreys, 1971; Goustin et Wilt, 1981; Kelso-Winemiller et Winkler, 1991). Ces observations impliquent le recrutement de plus de messagers par leur démasquage et une activation de l'initiation de la traduction. La fécondation provoque le démasquage des ARN maternels par le relargage des protéines associées aux messagers dans les mRNPs (Grainger et Winkler, 1987). La machinerie de la traduction est mobilisée aussi au niveau de l'élongation qui est stimulée de 2 à 3 fois (Brandis et Raff, 1978; Brandis et Raff, 1979; Hille et Alberts, 1979; Raff et al., 1981). La stimulation à la fois de

l'initiation et de l'élongation de la synthèse protéique explique que la taille des polysomes reste constante (revue dans Hille et al., 1990).

Les facteurs limitants de l'initiation ont été recherchés par des expériences de synthèse protéique *in vitro* à partir de lysats. La synthèse de messagers exogènes est stimulée par addition de facteurs d'initiation purifiés (Colin et al, 1987; revue dans Hille et al, 1990). En particulier l'addition de GEF(eIF2B) (Colin et al, 1987), eIF2 (Winkler et al, 1985), eIF4 (Huang et al, 1987) stimulent l'activité *in vitro*. L'addition de eIF4F aux lysats est capable de réverser l'effet inhibiteur contenu dans des extraits d'oeufs non fécondés (Huang et al, 1987; Hansen et al, 1987). Le facteur eIF4 pourrait donc être présent sous une forme inactive dans les oeufs non fécondés et activé par la fécondation (Jagus et al, 1992). Ces expériences n'ont pas été poursuivies après 1992 et mériteraient d'être complétées.

La stimulation de l'élongation n'est pas expliquée. Deux facteurs d'élongation appelés T1 et T2, dont l'activité augmente, ont été décrits (Felicetti et al, 1972). Ces deux facteurs n'ont pas été caractérisés depuis.

L'augmentation du pH intracellulaire et le flux de calcium sont impliqués dans l'activation de la synthèse protéique (Winkler et al., 1980). L'augmentation du pH est indispensable pour induire cette stimulation (Brandis et Raff, 1979), elle active de 25 fois le recrutement des ARNm et des ribosomes (Johnson et Epel, 1976; Winkler et al., 1980). Elle est capable d'induire une augmentation de la synthèse protéique dans les oeufs non fécondés (Grainger et al., 1979). Le calcium serait nécessaire à l'activation de l'élongation (Brandis et Raff, 1979; Winkler et al., 1980).

Il y a deux phases dans l'augmentation de la synthèse protéique: la première due au recrutement des messagers maternels (cf ci-dessus) et la deuxième qui est due à la traduction des nouveaux messagers transcripts, à partir de la transition morula/blastula. Après la première stimulation de la synthèse protéique qui résulte directement de la fécondation, l'augmentation se poursuit avec le développement (Regier et Kafatos, 1977; Goustin et Wilt, 1981). Elle passe de 120 pg/heure par embryon au premier clivage à plus de 500pg/heure par embryon au stade blastula (Régier et Kafatos, 1977; Goustin et Wilt, 1981). La synthèse protéique augmente proportionnellement à l'augmentation de ribosomes dans les polysomes entre le stade non fécondé et gastrula, le nombre de ribosomes dans les polysomes pouvant atteindre 60% des ribosomes (Infante et Nemer, 1967; Mackintosh et Bell, 1969; Denny et Reback, 1970; Humphreys, 1971). Les messagers PCS (Post-Cleavage Specific) sont recrutés dans les polysomes après la blastula (Kelso-Winemiller et al., 1993).

En conclusion, la première phase d'augmentation de la synthèse protéique est réalisée à partir des ARN maternels, sans modification sensible du profil des protéines. La deuxième correspond à un changement à la fois quantitatif et qualitatif et s'effectue à partir de la traduction de nouveaux transcrits. Si la deuxième phase permet aux embryons de croître et de se différencier, le rôle de l'augmentation dans la première phase ne s'explique pas. Les seules protéines, dont la traduction est indispensable au déroulement des divisions rapides, sont quantitativement minoritaires.

Les mécanismes moléculaires précis impliqués dans l'augmentation de synthèse protéique sont encore inconnus, ils pourraient notamment impliquer des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation des protéines des mRNP et des facteurs de traduction.

D- Régulation des activités de phosphorylation/déphosphorylation

La phosphorylation (par les protéines kinases) et la déphosphorylation (par les protéines phosphatases) des protéines sont impliquées dans tous les événements de la vie cellulaire. Les deux grandes familles de protéines kinases phosphorylent soit les acides aminés sérine/thréonine soit la tyrosine dans leurs substrats protéiques (revue dans Hunter, 1995, Fischer, 1997).

La fécondation chez l'oursin, provoque une modification du niveau de phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine de nombreuses protéines (Keller et al, 1980; Pelech et al., 1988). Nous avons, dans ce paragraphe, exposé les changements d'activité des protéines kinases pouvant être impliquées directement ou indirectement dans la régulation de la fonction de eEF-1 (chapitre 1) ainsi que dans le développement précoce de l'embryon d'oursin (chapitre 2).

1) Activités tyrosine kinases

Ce sont les activités kinasiques les plus étudiées au cours du développement. La fécondation provoque une activation des tyrosine kinases (Dasgupta et Garbers, 1983; Ciapa et Epel, 1991; Figure 15). Elles jouent un rôle important dans l'initiation du développement et son bon déroulement. Les changements de phosphorylation sur tyrosine ont lieu très tôt en réponse à la liaison du spermatozoïde (Kinsey, 1984; Peaucellier et al, 1988; Ciapa et Epel, 1991). Leur implication dans les mécanismes de transduction est discutée, en effet, si la

stimulation des tyrosine kinases est capable d'activer les oeufs, l'inhibition des activités ne bloque pas la reprise de l'activité métabolique de l'oeuf (revue dans Kinsey, 1997; Shen et al., 1999).

Les activités tyrosine kinase interviennent aussi dans le développement de l'embryon (revue dans Kinsey, 1997). Les inhibiteurs de tyrosine kinases inhibent le développement (Moore et Kinsey, 1995). Les activités tyrosine kinase jouent un rôle dans l'initiation des mouvements pronucléaires, l'entrée en phase S du cycle cellulaire et l'entrée en phase M (Moore et Kinsey, 1995).

Une activité tyrosine kinase est requise 30 à 45 minutes après fécondation pour la gastrulation de l'embryon (Kinsey, 1995) et plus spécifiquement pour l'invagination de l'intestin primitif (archentéron), la fusion des cellules du mésenchyme primaire et l'élaboration des spicules du squelette (Livingston et al., 1998).

Parmi les tyrosine kinases impliquées dans le développement, deux ont été identifiées. La protéine kinase p220^{abl} (Moore et Kinsey, 1994) et la protéine kinase p59^{fyn} (Kinsey, 1996). L'identification des kinases et de leurs substrats permettront d'expliquer leurs rôles.

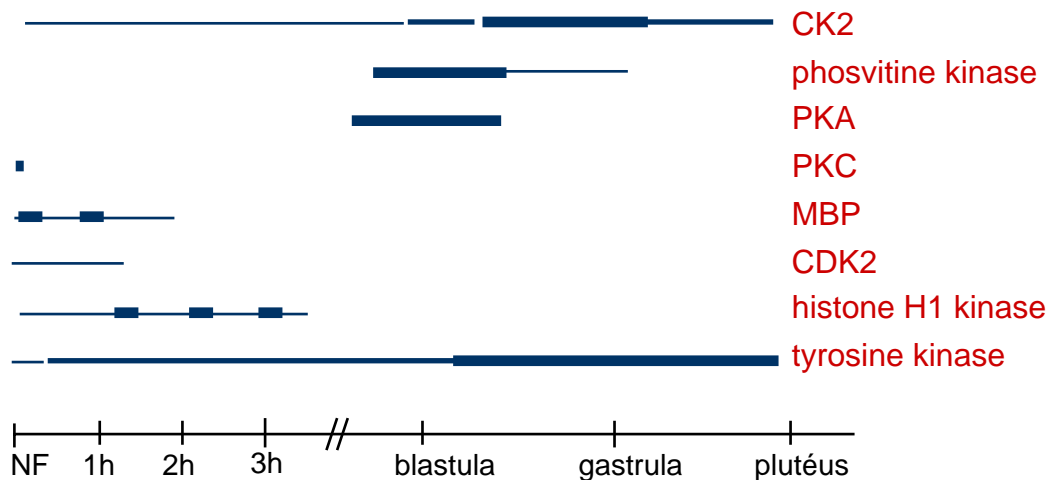


Figure 15: Profil des activités kinases mesurées au cours du développement précoce.

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

2) Activités sérine/thréonine kinases

Des activités sérine/thréonine kinases sont aussi impliquées au cours de l'embryogénèse précoce et pour certaines, le rôle a été déterminé.

La phosphorylation sur les acides aminés sérine/thréonine est très documentée, dans d'autres espèces que l'oursin, en ce qui concerne le contrôle de la division cellulaire (revue dans Ohi et Gould, 1999). L'activité CDK1/cycline B, kinase contrôlant la transition G2/M du cycle cellulaire, a été étudiée au cours des premiers cycles de division. Elle est activée (Histone H1 kinase) transitoirement 20 min avant chaque division (Schatt et al., 1983; Meijer et Pondaven, 1988, Figure 15). CDK1/cycline B est composé de deux sous-unités: une sous unité catalytique: p34cdc2 et une sous unité régulatrice: la cycline B, protéine initialement découverte chez l'oursin (Evans et al., 1983). Comme chez toutes les espèces étudiées (Ohi et Gould, 1999), l'activation de CDK1/cycline B est dépendante de la synthèse de la cycline et des processus de phosphorylation et de déphosphorylation de p34cdc2 (Arion et Meijer, 1989). La transition G2/M nécessite la fin de la réplication de l'ADN (Meijer et al., 1991; Genevriere-Garrigues et al., 1995) et l'inactivation de CDK1/cycline B est nécessaire pour la sortie de mitose (Meijer et al, 1989; Suprynowicz et al., 1994). Chez l'oursin, un mécanisme d'activation de CDK1 a été montré par l'intermédiaire de la PI3 kinase. La PI3 kinase, enzyme impliquée dans le métabolisme des polyphosphoinositides joue un rôle dans la transduction du signal (Toker et Cantley, 1997). En présence de wortmamine, inhibiteur de la PI3 kinase, l'activation de la CDK1/cycline B est inhibée et il n'y a pas de formation du fuseau mitotique bipolaire (De Nadai et al., 1998).

En revanche, de façon étonnante, la CDK2 (Cyclin dependent kinase 2) possède une activité faible et stable au cours du cycle cellulaire chez l'oursin (Moreau et al., 1998; Figure 15) alors qu'elle est clairement impliquée dans la division des autres cellules (Ohi et Gould, 1999). CDK2 n'est pas indispensable à la réplication de l'ADN chez l'oursin (Moreau et al., 1998).

Les autres sérine/thréonine kinases impliquées dans le développement de l'oursin sont la GSK3, protéine kinase C (PKC), MAP kinase, protéine kinase A (PKA) et la CK2.

La GSK3 (glycogen synthase kinase) est une enzyme sensible au lithium jouant un rôle très important dans le développement de l'embryon, elle est impliquée dans la voie de transduction Wnt (revue dans Arias et al, 1999). En effet, la surexpression d'un dominant négatif de la GSK3 entraîne une végétalisation de l'embryon tandis que la surexpression de GSK3 provoque une animalisation de l'embryon (Emily-Fenouil et al., 1998).

L'activation de la protéine kinase C est détectée deux minutes après fécondation, elle est dépendante du calcium et restreinte à la zone corticale (Olds et al., 1995; DeBarry et al., 1997; Figure 15). Elle joue un rôle dans l'augmentation du pH en activant l'échangeur Na/H (Heinecke et Shapiro, 1990; revue dans Swann et Whitaker, 1990). De plus, elle est impliquée

dans l'activation du métabolisme oxydatif en régulant l'activité de la NADPH/O₂ oxydoréductase (Heinecke et Shapiro, 1989).

Une activité MAP kinase (revue dans Whitmarsh et Davis, 1998), initialement détectée comme MBP kinase (Pelech et al., 1988), augmente immédiatement après fécondation et présente une activité cyclique au cours des deux premières divisions (Philipova et Whitaker, 1998; Figure 15). La forme Erk1 (Extracellular regulated kinase) correspond à la MAP kinase régulée (Chiri et al., 1998).

Des changements d'activité de protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ont été décrits. L'inhibition des protéines kinases dépendantes de l'AMPc empêche la première division mitotique (Browne et al, 1990). L'activité présente un pic transitoire au moment de la blastula nageante (Fujino et Yasumasu, 1983a; Figure 15).

Une activité phosphatase varie aussi au cours du développement. Cette activité est forte au stade blastula tardive puis redevient faible au stade gastrula. L'activation est associée à un changement de répartition entre une forme soluble et sédimentable (Fujino et Yasumasu., 1983b; Figure 15). L'activité ne phosphorylant pas la caséine (Fujino et Yasumasu., 1983b), elle ne peut être attribuée à la CK2. Une activité CK2 a été partiellement purifiée d'oeufs non fécondés et serait activée par les protamines du spermatozoïde à la fécondation (Ohtsuki et al., 1993). Nous avons démontré l'existence d'une activité eEF-1 kinase, identifiée à la CK2 qui présente un pic transitoire d'activité atteignant son maximum entre 24-30h après fécondation et impliquée dans la transition blastula/gastrula (article 4; Figure 15).

Le développement précoce de l'oursin fait intervenir trois grands processus biologiques: la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire et les mécanismes moléculaires du développement. Notre revue met l'accent sur l'importance de l'étude chez l'oursin du rôle de la phosphorylation/déphosphorylation des protéines dans chacun de ces grands domaines de la biologie.

III- L'activité et la régulation de la CK2

La CK2, protéine kinase pléiotropique ubiquitaire, est une enzyme impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme la régulation de la transcription, la signalisation, la prolifération et différentes étapes du développement (revue dans Guerra et Issinger, 1999). Bien que décrite pour la première fois il y a 45 ans, elle demeure l'enzyme la plus énigmatique pour ses fonctions ainsi que sa régulation cellulaire (Pinna et Meggio, 1997). La CK2 phosphoryle le facteur eEF-1 (chapitre 1) et intervient dans le développement de l'oursin (chapitre 2). Sans faire une revue exhaustive, nous présentons les propriétés marquantes de l'enzyme et ses implications les plus significatives.

A- Structure et activité de la CK2

1) Structure et localisation de la CK2

La CK2, d'un poids moléculaire de 130 kDa, possède une structure quaternaire de composition $2\alpha_2$, $\alpha_2\beta_2$ ou $\alpha_2\gamma_2$ (Chester et al., 1995). Les sous-unités catalytiques α et β et régulatrice γ font respectivement entre 36-44 kDa et 25-28 kDa. La sous-unité α possède un domaine C-terminal un peu plus court que β . Le rôle spécifique pour chacune des sous-unités α et β reste indéterminé. La structure et la composition de la CK2 ont fait l'objet de plusieurs revues (revues dans Pinna, 1990; Tuazon et Traugh, 1991; Pinna et Meggio, 1997; Guerra et Issinger, 1999).

L'activité CK2 a été retrouvée dans tous les tissus examinés (Nakajo et al., 1986). Elle est préférentiellement active dans certains tissus comme le cerveau et les testicules (revue dans Issinger, 1993). Les résultats concernant sa localisation sont contradictoires: parfois présente principalement dans le cytoplasme, parfois principalement dans le noyau et parfois répartie entre le noyau et le cytoplasme (revue dans Issinger, 1993).

2) Activité de l'enzyme *in vitro*

L'activité CK2 est indépendante des nucléotides cycliques et est insensible au calcium (Edelman et al., 1987; Guerra et Issinger, 1999). Elle est dépendante des concentrations

ioniques en KCl et NaCl (Grankowski et al., 1991). Les ions Mg²⁺ indispensables à l'activité peuvent être remplacés par le Mn²⁺ (Plana et al., 1985; Meggio et al., 1992a; Gatica et al., 1993). La CK2 utilise le GTP comme donneur de phosphate aussi efficacement que l'ATP (revue dans Hathaway et Traugh, 1982; Pinna et Meggio, 1997).

La caractérisation de l'enzyme dépend de sa réponse à des effecteurs, activateurs ou inhibiteurs définis (revues dans Hathaway et Traugh, 1982; Hathaway et Traugh, 1983; Pinna, 1990; Tuazon et Traugh, 1991). Le tableau VI indique les régulateurs potentiels de la CK2 ainsi que leurs constantes.

INHIBITEURS	K_i (M)	Référence
Héparine	1,4 10 ⁻⁹	Hathaway et al, 1980
DiCl-RB	2,3 10 ⁻⁵	Meggio et al, 1990
DiBr-RB	6,0 10 ⁻⁶	Meggio et al, 1990
DiCl-Bz	3,5 10 ⁻⁵	Meggio et al, 1990
Tétrahalogéno-2-azabenzimidazoles	0,2-0,6 10 ⁻⁶	Szyska et al, 1995
2,3-bisphosphoglycerate	1,0 10 ⁻³	Gonzatti-Haces et Traugh, 1982
inositol hexasulfate	2,0 10 ⁻⁵	Hathaway et Traugh, 1982

STIMULATEURS	K_a (M)	Référence
spermidine	7,0 10 ⁻⁴	Hathaway et Traugh, 1984c
spermine	2,8 10 ⁻⁴	Hathaway et Traugh, 1984c
polypeptides basiques	6 10 ⁻⁵	Meggio et al, 1983

Tableau VI: Effecteurs de la CK2

Dans ce tableau, sont indiqués les effecteurs de la CK2: inhibiteurs et stimulateurs ainsi que leurs constantes d'inhibition (K_i) et leurs constantes d'activation (K_a), les plus couramment utilisés pour caractériser une activité CK2 *in vitro*.

a) Les inhibiteurs de la CK2

La CK2 n'est pas sensible à la staurosporine, inhibiteur compétitif très puissant d'autres protéines kinases (Meggio et al., 1995).

Certains acides nucléiques spécifiques peuvent inhiber l'activité CK2 comme l'ADN simple brin du phage M13, certains ARNs comme le polyU et certains ARNt (Mäenpää, 1977; Gatica et al., 1989; Kandror et Stepanov, 1990). Lors de la purification de protéines liant l'ARN à partir de réticulocytes de lapin, d'embryons d'artémies et d'ovocytes de

grenouille verte, des complexes stables CK2-ARN ont été observés (Rittschof et Traugh, 1982; Kandrор et Stepanov, 1984; Thoen et al., 1986)

L'héparine est l'inhibiteur le plus efficace et spécifique de la CK2 (revues dans Hathaway et Traugh, 1983; Tuazon et Traugh, 1990). L'inhibition est compétitive du substrat (Hathaway et al., 1980; Meggio et al., 1982; Hathaway et Traugh, 1983). La CK2 est inhibée par de faibles concentrations ($IC_{50}=1 \mu\text{g/ml}$) d'héparine (Hathaway et al., 1980). La constante d'inhibition (K_i) est fortement dépendante du substrat (Singh et al., 1983; Linnala-Kankkunen et al., 1984; Taylor et al., 1987). Des dérivés de l'héparine, l'héparane sulfate ou d'autres glycosaminoglycanes inhibent aussi la CK2 (revue dans Tuazon et Traugh, 1991).

Le 2,3 bisphosphoglycerate est un inhibiteur compétitif du substrat. Le taux d'inhibition est dépendant de la concentration en Mg^{2+} dans le milieu (Hathaway et Traugh, 1984a).

L'inositol hexasulfate et le myoinositol 2-phosphate sont aussi des inhibiteurs de la CK2. L'inositol hexasulfate est le plus inhibiteur. L'inhibition est compétitive. D'autres composés à base d'inositol testés par Tuazon et Traugh sont sans effet (revue dans Tuazon et Traugh, 1991).

La CK2 est plus sensible aux dérivés halogénés de benzimidazole et benzotriazole que la plupart des autres kinases (Meggio et al., 1990; Dobrowolska et al., 1991; Szyszka et al., 1995). L'inhibition par le dichloro-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) et par ses analogues est compétitive avec l'ATP et le GTP (Meggio et al., 1990). Deux autres analogues les tétrahalogéno-2-azabenzimidazoles, inhibiteurs de la CK2, ont été décrits (Szyszka et al., 1995).

L'hémine est aussi un inhibiteur de l'enzyme CK2 (revue dans Hathaway et Traugh, 1982).

b) Les stimulateurs de la CK2

Les stimulateurs de l'activité CK2 sont des composés basiques, ils comprennent les polyamines dont les plus efficaces sont la spermine et la spermidine (Mäenpää, 1977; Cochet et al., 1980; revue dans Cochet et Chambaz, 1983a; Hathaway et Traugh, 1984b; Hathaway et Traugh, 1984c), les polypeptides basiques comme les polylysines et les polyarginines, les histones et les protamines (Meggio et al., 1983; Meggio et Pinna, 1984; Ahmed et al., 1986).

La réponse aux composés polybasiques dépend de la conformation du substrat et la composition de l'enzyme (Ahmed et al., 1986; Meggio et al., 1992a). L'effet des polypeptides

basiques dépend de la présence de la sous-unité (Meggio et al., 1983; Ahmed et al., 1985; Traugh et al, 1990; Lin et al, 1991).

Le mode d'action des polyamines est discuté, cependant, il a été montré que la CK2 possède un site de liaison à la spermine (Hathaway et Traugh, 1984b). La stimulation par les polyamines est dépendante de la concentration en sels et en magnésium (revues dans Hathaway et Traugh, 1983; Tuazon et Traugh, 1991). Généralement, la spermine est plus efficace que la spermidine (revue dans Tuazon et Traugh, 1991). La spermine, la spermidine et l'histone sont capables de réverser les effets de l'héparine (Mäenpää, 1977; Feige et al., 1980; Hara et al., 1981) ou du 2,3 bisphosphoglycérate (Hathaway et Traugh, 1984c).

Ces composés basiques sont nécessaires pour la phosphorylation de certaines protéines: la calmoduline (Meggio et al., 1987; Sacks et Mc Donald., 1992) ou eEF-1 (Palen et al., 1990).

Les mécanismes moléculaires des inhibiteurs et stimulateurs ne sont pas définitivement élucidés. De façon générale, les inhibiteurs, composés acides, inhibent directement l'activité catalytique alors que les stimulateurs, composés basiques, agissent par l'intermédiaire de la sous-unité .

B- Régulation de l'activité CK2

Des régulations physiologiques font intervenir soit directement l'enzyme, soit des changements dans les effecteurs. Nous insisterons dans ce paragraphe sur les régulations réelles ou potentielles les plus pertinentes.

1) Rôle de la sous-unité β régulatrice

La sous-unité ne peut être dissociée de qu'en milieu dénaturant (Cochet et Chambaz, 1983b) indiquant qu'il n'existerait pas de régulation de l'activité catalytique de par association/dissociation de . Il faut noter également qu'il peut exister une forme monomérique de fonctionnelle puisque des expériences de complémentation de et ' réalisées chez *S.cerevisiae* ont montré que la sous-unité catalytique de drosophile était capable de restaurer un phénotype normal alors qu'elle n'est pas capable d'interagir avec les sous-unités et ' endogènes (Padmanabha et al, 1990). De plus, des formes dépourvues de sous-unité régulatrice ont été isolées chez *Dyctyostelium discoideum* et *Zea mays* et une forme de l'enzyme observée

dans les noyaux n'est pas associée à la sous-unité régulatrice (revues dans Allende et Allende, 1995; Guerra et Issinger, 1999).

Pourtant, il existe des données indiquant que la sous-unité β intervient dans la régulation de l'activité *in vitro* (revue dans Pinna et Meggio, 1997). Trois fonctions distinctes peuvent être attribuées à la sous-unité régulatrice : stabilité, spécificité et intermédiaire de certains effecteurs. La sous-unité β stabilise l'activité de la sous-unité catalytique α puisque l'activité basale de α est nettement augmentée en présence de la sous-unité β (Cochet et Chambaz, 1983b; Grankowski et al., 1991; Meggio et al, 1992b; Birnbaum et al, 1992). La sous-unité β participe à la reconnaissance du substrat (Lin et al., 1991; Bidwai et al, 1993). Elle module la spécificité de liaison du substrat sur la sous-unité α (Meggio et al, 1992b ; revue dans Pinna et Meggio, 1997). La sous-unité β est nécessaire pour la réponse à certains effecteurs, comme les composés basiques (voir plus haut).

De nombreuses protéines peuvent interagir avec la sous-unité régulatrice, identifiées essentiellement par criblage en double hybride (Guerra et Issinger, 1999). Ces protéines, en dehors des substrats, sont toutes des régulateurs potentiels de l'activité enzymatique.

2) Régulation par phosphorylation

Des corrélations entre la phosphorylation de l'enzyme et son activité ont été mises en évidence (revues dans Pinna, 1990; Pinna et Meggio, 1997).

La CK2 pure est autophosphorylée sur sa sous-unité β (revues dans Hathaway et Traugh, 1982; Meggio et al, 1983) alors que les sous-unités catalytiques ne sont généralement pas autophosphorylables. Les effets de l'autophosphorylation dépendent des conditions expérimentales et des substrats utilisés, et sont contradictoires (revue dans Hathaway et Traugh, 1982; Delpech et al, 1986; Damuni et Reed, 1988). L'autophosphorylation dépend des effecteurs incubés en présence de l'enzyme. Les polypeptides basiques (polylysines et polyarginines) et les protéines basiques (histone, spermine et protamine) permettent la phosphorylation de la sous-unité β (Meggio et al., 1983; Meggio et Pinna; 1984; Traugh et al., 1990; Palen et Traugh, 1991). L'héparine inhibe l'autophosphorylation de la sous-unité β (Meggio et al., 1983; Traugh et al., 1990).

Les protéines kinases sont généralement impliquées dans des cascades régulatrices. Les données concernant la phosphorylation de la CK2 sont fragmentaires. Les sous-unités α (Litchfield et al., 1992; Bosc et al., 1995) et β (Mulner-Lorillon et al., 1990; Litchfield et al., 1991; Litchfield et al, 1992) sont phosphorylées par les CDKs *in vitro*. Le site de

phosphorylation dans est cependant controversé. La phosphorylation de la CK2 de xénope par CDK1 purifiée provoque une augmentation de son activité (Mulner-Lorillon et al., 1990). Des phosphorylations inhibitrices de l'activité ont été mises en évidence (Agostinis et al, 1987) sans que les protéines kinases aient été identifiées. La CK2 est aussi phosphorylable par la PKC au niveau de sa sous-unité régulatrice. Dans ce cas, l'activité de la CK2 est stimulée (Sanghera et al., 1992). La sous-unité peut être phosphorylée *in vitro* par une tyrosine kinase (Heriche et Chambaz, 1998). Cependant, cette phosphorylation n'a pas été trouvée dans l'enzyme purifiée (revue dans Pinna et Meggio, 1997).

L'existence de phosphorylations modifiant l'activité de la CK2 permet de proposer un rôle régulateur physiologique de cette enzyme.

3) Effecteurs naturels de la CK2.

Un certain nombre d'effecteurs de la CK2 sont caractérisés *in vitro* (voir plus haut). La question est: sont ils des régulateurs physiologiques de la CK2 *in vivo*?

L'héparine et l'héparane sulfate, présents en faibles quantités dans des conditions normales, peuvent être des régulateurs de la CK2 dans le foie (revue dans Tuazon et Traugh, 1991). De plus, Pirollet et collaborateurs ont isolé un inhibiteur naturel de la CK2 qui est le glycosaminoglycane, un analogue de l'héparine (Pirollet et al., 1981).

Le 2,3 bisphosphoglycérate peut être un régulateur physiologique de la CK2 dans les globules rouges (Gonzatti et Traugh, 1988), son taux est largement influencé par la quantité d'hémoglobine oxygénée (revue dans Hathaway et Traugh, 1982). La concentration nécessaire pour inhiber 50% d'activité correspond à la concentration physiologique de 2,3 bisphosphoglycérate dans les érythrocytes (Kumar et Tao, 1975; revue dans Hathaway et Traugh, 1982). Les changements d'activité CK2 dans les globules rouges sont corrélés avec le changement de statut métabolique du globule rouge. Dans les érythrocytes, l'inhibition de la CK2 est due à une concentration plus faible de polyamines et une quantité plus élevée de 2,3 bisphosphoglycérate tandis que la stimulation de la CK2 dans les réticulocytes est due à une augmentation des polyamines et une diminution de 2,3 bisphosphoglycérate (Jakobi et al, 1994). Le 2,3 bisphosphoglycérate pourrait réguler la synthèse protéique dans ces cellules, puisqu' il est capable d'agir *in vitro* sur la synthèse protéique (Narita et al., 1979). Dans ce cas, il provoque une inhibition de la synthèse protéique due à l'inhibition directe de la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2B par la CK2 (Gonzatti et Traugh, 1988).

Les protéines K-ras (Gatica et al., 1987) peuvent être des effecteurs de la CK2 *in vivo* de par leur nature de composés basiques.

Les polyamines sont des constituants naturels de toutes cellules. Les concentrations physiologiques sont de l'ordre de celles qui régulent *in vitro* la CK2. Elles sont donc potentiellement régulatrices de la CK2 *in vivo*. De nombreuses situations physiologiques sont associées à des changements des concentrations en polyamines et/ou de l'ornithine décarboxylase, impliquée dans leur synthèse (Wallace, 1998). C'est le cas par exemple des cellules en division (Cochet et al., 1980) ou du développement précoce (Osborne et al., 1989). Les protamines apportées par le spermatozoïde à la fécondation pourraient jouer un rôle identique (Ohtsuki et al, 1993).

L'absence de spécificité stricte des effecteurs potentiels de la CK2, ainsi que la multiplicité des cibles de la CK2 expliquent sans doute le peu de régulations démontrées *in vivo* pour cet enzyme.

C- Substrats et rôles de la CK2

La CK2 est une des kinases les plus pléiotropiques connues actuellement, en effet, elle phosphoryle plus de 160 protéines (revue dans Pinna et Meggio, 1997). Ses substrats préférentiels, *in vitro*, sont la caséine, la phosphovitine et des peptides acides (revues dans Hathaway et Traugh, 1982; Pinna, 1990). La caséine étant le premier substrat caractérisé, on lui a donné le nom de caséine kinase 2 bien qu'elle ne soit pas physiologiquement une caséine kinase.

La CK2 est une sérine/thréonine protéine kinase phosphorylant ses substrats sur le site consensus minimum (S/T)-X-X-(E/D/Sp/Yp). Des résidus acides supplémentaires favorisent l'efficacité de phosphorylation (revues dans Pinna, 1990; Tuazon et Traugh, 1991). Étonnement, il a été montré qu'elle pouvait aussi phosphoryler un résidu tyrosine de la protéine nucléaire Frp3 de levure après phosphorylation du résidu sérine de la protéine par la CK2. Ces phosphorylations existent *in vitro* et *in vivo* (Wilson et al., 1997).

Une grande majorité des substrats de la CK2 est impliquée dans l'expression des gènes. Certains sont des acteurs de la transcription: les ARN polymérases, les ribonucléoprotéines, des proto-oncogènes, des anti-oncogènes et des oncogènes. D'autres sont des éléments de la machinerie de traduction: protéines ribosomales, facteurs d'initiation et d'élongation. Parmi les

autres substrats, certains sont impliqués dans les voies de transduction: récepteurs, protéines membranaires, kinases; dans le métabolisme intermédiaire: glycogène synthase, inhibiteur de la phosphatase 1, ornithine décarboxylase; dans le métabolisme du calcium et dans fonctions particulières: protéines nucléaires, protéines du cytosquelette, protéine liant le spermatozoïde, protéines virales... (revue dans Pinna et Meggio, 1997). Dans un certain nombre de cas, il a été montré un changement d'activité du substrat sous l'effet de la phosphorylation par la CK2 (Issinger, 1993; Allende et Allende, 1995).

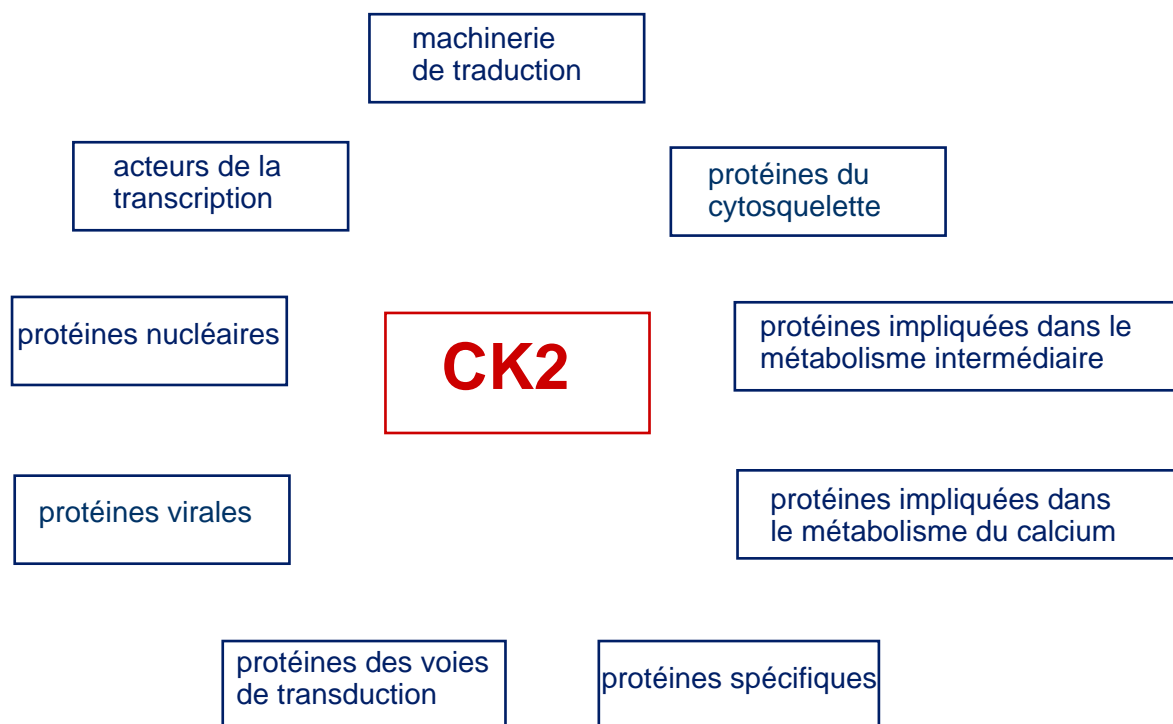


Figure 16: Familles des substrats de la CK2.

La CK2 possède un grand nombre de substrats (revue dans Pinna et Meggio, 1997), dans cette figure, ils sont regroupés en plusieurs familles.

Ces grandes familles de substrats indiquent que la CK2 peut être impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires.

Des expériences de mutations des gènes codant pour les sous-unités catalytiques chez *S. cerevisiae* démontrent que la CK2 est nécessaire pour la division cellulaire (Padmanabha et al., 1990; revue dans Glover, 1998). La CK2 est active et nécessaire pendant la phase G1 (Carroll et Marshak, 1989; DeBenedette et Snow, 1991; Lorenz et al., 1994; Pepperkok et al.

1994; Hanna et al., 1995) ainsi qu'à la transition G2/M (Hanna et al., 1995). Bien qu'un groupe ait détecté une chute d'activité de l'enzyme après la phase G1 (Marshak et Russo, 1994), il ne semble pas y avoir de fluctuations majeures de l'activité de la CK2 au cours du cycle cellulaire (Bosc et al., 1999). En revanche, la concentration de la sous-unité augmente dans les cellules en division (Bosc et al., 1999) et l'injection d'anticorps anti- provoque l'arrêt de la progression du cycle cellulaire (Pepperkok et al., 1994). Les sous-unités et sont phosphorylées dans les cellules mitotiques sur des sites phosphorylables *in vitro* par CDK1 (Bosc et al., 1999; et voir paragraphe 2b). De plus, la reprise des divisions est associée à une localisation prédominante de la CK2 dans le noyau et une partie de la CK2 peut être associée au fuseau mitotique (revue dans Litchfield et Lüscher, 1993).

La CK2 joue un rôle dans la maturation méiotique, assimilée à une transition G2/M du cycle (Jesus et Ozon, 1993). En effet, son activité augmente lors de la maturation dans les ovocytes de la grenouille verte (Kandror et al., 1989), du xénope (Cicirelli et al., 1988) et d'étoile de mer (revue dans Pelech et al., 1990; Pelech et al., 1991). La microinjection de CK2 dans des ovocytes de xénope facilite la maturation (Mulner-Lorillon et al., 1988).

Certains substrats de la CK2 sont des acteurs de la division cellulaire (p53, CDK1, cdc37, DNAligase1, topoisomérase2, l'inhibiteur de la phosphatase 1 (revue dans Pinna et Meggio, 1997), et cdc25 (Ducommun, communication personnelle). Curieusement, plusieurs substrats de la CDK1 sont aussi substrats de la CK2 (revues dans Meisner et Czech, 1991; Pinna et Meggio, 1997). De plus, la CK2 est capable *in vitro* de phosphoryler la CDK1 (Russo et al., 1992).

Il est donc clair que la CK2 peut jouer un rôle dans le cycle cellulaire en association étroite avec une CDK, une kinase majeure du contrôle du cycle.

La CK2 est une sérine/thréonine kinase classée dans la famille des protéines kinases régulées au cours de la croissance ("growth related protein kinases") (Ralph et al., 1990). Des études de génétique moléculaire ont montré que la CK2 est essentielle pour la viabilité de *S.cerevisiae* (Padmanabha et al., 1990), qu'elle est essentielle pour la croissance de *D.discoideum* (Kikkawa et al., 1992) et qu'elle joue un rôle dans la transduction de la polarité cellulaire lors de la croissance de *S.pombe* (Snell et Nurse, 1994). L'activité de l'enzyme est élevée dans les cellules en divisions rapides: normales ou transformées. En effet, son activité est plus élevée dans les tissus en prolifération (Geahlen et Harrison, 1984; Perez et al., 1988; Pancetti et al, 1996) et elle diminue quand les cellules sont à confluence (Schneider et Issinger, 1989). La croissance de fibroblastes en culture est inhibée par injection d'antisens et (Pepperkok et al, 1991). L'enzyme est, en effet, activée par différentes stimuli: serum,

insuline, IGF1 (insulin growth factor 1), EGF (epidermal growth factor), les facteurs de nécrose tumorale et les esters de phorbol (revue dans Litchfield et Lüscher, 1993). Dans différentes cellules, cette augmentation rapide est régulée au niveau post-traductionnel par les facteurs de croissance et le serum (Sommercorn et al., 1987; Carroll et Marshak, 1989; Ackerman et Osheroff, 1989). Lors d'un traitement à l'EGF, l'activation de la CK2 est corrélée à une hyperphosphorylation de la sous-unité β (Ackerman et Osheroff, 1989; Ackerman et al., 1990). L'activité de la CK2 est aussi élevée dans les cellules transformées ou tumeurs (Prowald et al., 1984; Seitz et al., 1989; Boldyreff et al., 1989; Münstermann et al., 1990; Pistorius et al., 1991). L'augmentation d'activité est dans certains cas due à une augmentation de l'expression de l'enzyme (Boldyreff et al., 1989; Seitz et al., 1989). Elle peut aussi être due à une dérégulation de la synthèse ou de la dégradation de ses sous-unités (revue dans Guerra et Issinger, 1999). La surexpression de la sous-unité catalytique augmente la propension à développer un lymphome (revue dans Pinna et Meggio, 1997).

Ces augmentations de la CK2 posent une question intéressante, en effet, il n'est pas défini si elles sont une conséquence de la prolifération cellulaire ou une cause de certains développements de tumeurs. Il est simplement établi une corrélation entre le degré de transformation et l'augmentation de la CK2 (revue dans Pinna et Meggio, 1997). La CK2 peut être considérée comme un marqueur de prolifération.

L'implication de la CK2 dans la prolifération est également confortée par la nature de certains de ces substrats comme ceux intervenant dans la transcription (revues dans Meisner et Czech, 1991; Pinna et Meggio, 1997).

La CK2 modifie l'expression des gènes en phosphorylant des facteurs de transcription ou d'autres protéines nucléaires. Ainsi, la phosphorylation de c-jun, composant majeur du facteur de transcription de AP-1, inhibe la liaison à l'ADN et provoque une diminution de l'activité AP-1 (Lin et al., 1992). La phosphorylation de la nucléoline augmente son affinité pour les histones et provoque leurs dissociations de l'ADN et facilite aussi la transcription (Boldyreff et al., 1989). Dans la majorité des infections virales étudiées, les cibles de la CK2 sont des facteurs de transcription impliquant l'enzyme dans l'expression du génome viral (revue dans Guerra et Issinger, 1999). Ces substrats cibles incluent Fos, Myb, p53, E1A d'adénovirus, E7 de papillomavirus et l'antigène T de SV40 (revue dans Meisner et Czech, 1991).

Parmi les facteurs de transcription phosphorylés par la CK2, il existe des proto-oncogènes. Il a été montré que les oncogènes viraux correspondant ne contenaient plus le site de phosphorylation par la CK2. Ceci suggère que la conversion de ces protéines en oncogènes est associée avec la délétion ou la substitution d'un site phosphorylable par la CK2,

engendrant une dérégulation de ces protéines normalement associées à la kinase (revue dans Meisner et Czech, 1991).

Le taux de synthèse protéique dans les globules rouges (érythrocytes et réticulocytes) est corrélé à l'activité CK2 (Jakobi et al, 1994; voir paragraphe 3). La CK2 a comme substrats des facteurs d'élongation: eEF-1 et eEF-1 (cf chapitre eEF-1) et des facteurs d'initiation (revue dans Pinna et Meggio, 1997) de la synthèse protéique, ce qui expliquerait son action sur la synthèse protéique. Les effets de la phosphorylation des facteurs d'élongation par la CK2 ne sont pas encore élucidés. En revanche, la CK2 régule directement l'activité de eIF2B: une inhibition de la phosphorylation de eIF-2B par la CK2 entraîne une inhibition de la synthèse protéique *in vitro* (Gonzatti et Traugh, 1988). Parallèlement, la phosphorylation de GEF par la CK2 stimule l'échange de GDP/GTP *in vitro* (Dholakia et Wahba, 1988) ce qui augmente le taux de régénération et la disponibilité de eIF-2-GTP (revue dans Tuazon et Traugh, 1991).

Enfin, des changements de l'activité de la CK2 ont été observés au cours du développement embryonnaire (Schneider et al., 1986; Perez et al., 1987; Boldyreff et al., 1989; Girault et al., 1990; Young et al., 1996; article 4) et larvaire (Hu et Rubin, 1990; Fialho et al., 1999). Son expression peut être aussi modifiée au cours du développement (Maridor et al., 1991). Pour l'instant, le rôle de ces changements d'activité n'est pas connu.

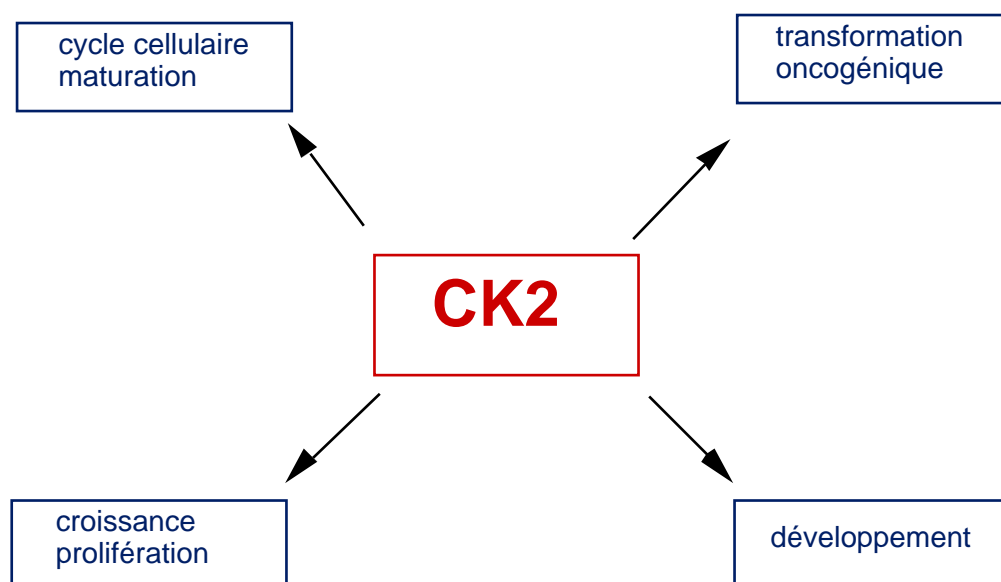


Figure 17: Rôles de la CK2.

En conclusion, la CK2, kinase ubiquitaire, est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires et doit être considérée comme un acteur essentiel des mécanismes de prolifération cellulaire, même s'il paraît de plus en plus clair que la CK2 n'est pas régulée de la même manière que les enzymes impliquées directement dans les grandes voies de transduction, comme les récepteurs-tyrosine kinase, les MAP kinases, la PKA ou la PKC.

RESULTATS

Nos résultats sont présentés sous la forme d'un recueil d'articles. Une première partie est consacrée à l'analyse phylogénétique des séquences codant pour eEF-1 α et eEF-1 β (article 1). La deuxième partie est consacrée au clonage et à l'expression de eEF-1 α et eEF-1 β (=eEF-1A) au cours du développement précoce d'oursin (article 2 et 3) et la troisième porte sur la caractérisation et les régulations d'une activité eEF-1 kinase identifiée à la CK2 au cours du développement (article 4).

I- Analyse phylogénétique

Article 1

M-A. Guerrucci, A. Monnier, **C. Delalande**, R. Bellé (1999).

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

Cet article présente l'analyse de l'évolution moléculaire des protéines de type eEF-1 α / β et de eEF-1 β à partir des méthodes conventionnelles de phylogénie.

Le complexe eEF-1B contient deux types de facteurs d'échange de nucléotides: eEF-1 α / β et eEF-1 β . L'alignement des domaines C-terminaux des séquences montrent que eEF-1 α et eEF-1 β des végétaux sont monophylétiques de même que eEF-1 α et eEF-1 β des animaux. Les domaines N-terminaux, des protéines eEF-1 α , possédant le motif leucine-zipper sont spécifiques de eEF-1 α et ne se retrouvent dans aucune séquence connue. Nous pouvons conclure que la protéine eEF-1 α résulte de la fusion d'un domaine leucine zipper avec le domaine C-terminal d'un gène ancestral de type eEF-1 α . La protéine eEF-1 α n'a été retrouvée que chez les animaux supérieurs. La duplication de l'ancêtre eEF-1 α a eu lieu avant l'émergence des arthropodes. Les deux gènes eEF-1 α et eEF-1 β ont cependant évolué de façon conjointe, probablement en relation avec leur association avec le même facteur eEF-1A.

II- Clonage et expression de eEF-1 δ et eEF-1A au cours du développement précoce d'oursin

Article 2

C. Delalande, A. Monnier, O. Minella, A-M. Genevière, O. Mulner-Lorillon, R. Bellé and P. Cormier (1998).

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

Nous avons isolé et séquencé, par criblage d'une banque d'ADNc de *Sphaerechinus granularis*, deux ADNc de 2,0 et 2,7 kb codant pour eEF-1 (n° accession: Y14235 et Y14236). Les deux ADNc isolés sont identiques dans leurs régions 5' non traduites, séquences codantes et séquences 3' non traduites jusqu'à la position AATAAA(1892). L'ADNc de 2,7 kb possède une séquence supplémentaire de 722 pb en région 3'UTR. Ils proviennent de la sélection alternative d'un site de polyadénylation à partir d'un même précurseur. Ils codent pour une protéine de 35 kDa identifiée à eEF-1 selon 3 critères.

- Présence d'un motif leucine zipper dans le domaine N-terminal.
- Domaine d'échange de GDP/GTP dans la partie C-terminale.
- Intégration dans un complexe EF-1 hétérologue.

Nous avons montré que eEF-1 était exprimé sous la forme de deux messagers de 2,0 et 2,7 kb au cours du développement précoce d'oursin et que leurs expressions étaient régulées au cours du développement (article 2). L'apparition du messenger de 2,0 kb à partir du stade gastrula suggère qu'un mécanisme de sélection alternative du site de polyadénylation est mis en place à la gastrulation.

Article 3

C.Delalande, A.Monnier, P.Cormier, O. Mulner-Lorillon and R. Bellé (1998).

Changes in elongation factor-1 transcripts are uncoupled to changes in EF-1 during sea urchin development, *Biol. Cell*, 90, 661-663.

Nous avons analysé la régulation de l'expression de eEF-1 par rapport à celle de eEF-1A. Cette analyse a été possible grâce au clonage et séquençage d'un fragment d'ADNc codant pour eEF-1A de *Sphaerechinus granularis* (n° accession AJ010972). L'expression de deux composants de eEF-1 est découplée au cours du développement précoce. L'expression de eEF-1A est faible pendant les divisions précoces et augmente très fortement à la transition blastula-gastrula. Celle de eEF-1 chute pendant les divisions précoces et réaugmente plus tardivement et plus progressivement que l'expression de eEF-1A.

Le découplage de l'expression entre eEF-1A et eEF-1 conforte l'idée que l'une et/ou l'autre puisse avoir des fonctions spécifiques indépendantes.

III- Caractérisation et changement d'une activité eEF-1 δ kinase identifiée à la CKII

Christelle Delalande, Robert. Bellé, Patrick Cormier, and Odile Mulner-Lorillon (1999).

Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 425-431

Nous avons produit et purifié une protéine recombinante bactérienne GST-eEF-1 par introduction de la partie codante de eEF-1 dans un vecteur de surexpression pGEX-2T. Nous avons étudié la phosphorylation de cette protéine par différentes kinases *in vitro*. La PKA et la CK2 phosphorylent GST-eEF-1 alors que la PKC et CDK1 sont inefficaces.

Nous avons utilisé cette protéine comme substrat afin d'étudier les activités protéines kinases endogènes d'embryons d'oursin au cours du développement précoce. Une activité eEF-1 kinase a été mise en évidence. L'activité eEF-1 kinase augmente transitoirement, atteignant son maximum entre 24 et 30h après fécondation. Nous avons identifié, sur plusieurs critères, la kinase responsable de cette activité à la CK2.

Avec l'objectif de déterminer le rôle de cette activité au cours du développement précoce, nous avons étudié les effets des inhibiteurs de la CK2 (2,3 bisphosphoglycérate et DRB) *in vivo*. Nous avons observé qu'ils affectaient le développement des embryons lors de la transition blastula-gastrula.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

L'ensemble des données bibliographiques ainsi que nos résultats conduisent à de nouvelles questions. Quel est le rôle de eEF-1 δ , est-il restreint à l'élongation de la synthèse protéique ? La connaissance de ses partenaires peut-elle aider à élucider cette question? Quand est-elle exprimée, sous quelle forme? Quels sont les rôles de l'activité eEF-1 kinase?

I- Fonction de eEF-1 δ et rôle de sa phosphorylation

La protéine eEF-1 δ est spécifique des animaux supérieurs et intervient dans l'élongation comme échangeur de GDP/GTP sur eEF-1A. Présente dans eEF-1B, elle ancre la valyl-ARNt synthétase dans le complexe. L'implication de la protéine eEF-1 δ est-elle restreinte à l'élongation de la synthèse protéique? Quel est le rôle spécifique de eEF-1 δ par rapport à eEF-1 α ? Quelle(s) fonction(s) supplémentaire(s) apporte le domaine N-terminal qui contient le motif leucine zipper ?

L'étude de chaque domaine doit être abordée séparément, en effet, les expériences de complémentation de levure indiquent une différence fonctionnelle entre les domaines C-terminaux, pourtant très similaires de eEF-1 δ par rapport à eEF-1 α (voir chapitre 1).

La protéine eEF-1 δ est la protéine du complexe eEF-1 phosphorylable par le plus grand nombre de protéine kinases différentes. Le rôle de ces différentes phosphorylations se pose à plusieurs niveaux: la composition de(s) complexe(s) contenant eEF-1 δ , l'interaction entre les différents partenaires, les activités de chacun des éléments, les rôles cellulaires de chacun, et toute régulation physiologique qui peut en résulter. Pour guider la recherche du rôle de ces phosphorylations, il faut tenir compte du fait que la phosphorylation par CDK1/cycline B est acquise au cours de l'évolution, que celles dues à la CK2 sont universelles. Le potentiel de régulation par phosphorylation est très important si l'on considère que celle effectuée par la protéine virale U(L)13 est associée à une modification radicale de la synthèse protéique.

Les phosphorylations spécifiques de eEF-1 δ , par rapport à l'autre facteur d'échange de nucléotides eEF-1 α , ferait de eEF-1 δ l'élément central d'intégration d'une multitude d'effecteurs cellulaires chez les eucaryotes supérieurs. Si eEF-1 δ a une fonction spécifique par rapport à eEF-1 α , qu'est ce qui assure cette fonction chez les plantes et les levures? Les plantes possèdent aussi un deuxième facteur d'échange de GDP/GTP mais il est plus proche de eEF-1 α , on peut donc penser que ces deux facteurs n'auront pas les mêmes fonctions. De plus, chez la levure, il n'existe que eEF-1 α .

Les embryons d'oursin, parallèlement avec les modèles permettant l'approche génétique (mutation, complémentation fonctionnelle, recombinaison homologue), devraient contribuer à répondre à ces questions par:

- la mise au point d'extraits cellulaires actifs, comme il en existe déjà pour les études de la synthèse protéique. Ces extraits permettraient d'aborder le rôle de la protéine eEF-1 dans la synthèse des protéines, le cycle cellulaire et ses anomalies, ainsi que la réparation de l'ADN.

- les approches de localisation intracellulaire, par anticorps ou protéine fluorescente verte (GFP) au cours des divisions précoces et du développement.

II- La protéine eEF-1 δ et ses partenaires

La compréhension de la fonction de eEF-1 nécessite l'identification de tous ses partenaires. Cette étude a pu débuter dans le laboratoire grâce à l'obtention d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine eEF-1 recombinante. La purification de composés sur le critère de la présence de eEF-1 n'a jamais été réalisée. L'existence de protéines virales (ICP0) capables de s'associer avec eEF-1 laisse présager que des protéines cellulaires sont capables d'interagir.

La technique de criblage par double hybride constitue une méthode de choix pour l'identification de protéines qui interagissent *in vivo* avec la protéine d'intérêt. Elle peut notamment permettre la détermination d'éventuels partenaires cellulaires de eEF-1. Cette approche est envisageable à court terme car les ADNc de la banque de *S.granularis* sont dans des vecteurs navette bactérie-levure dont l'expression est inductible.

L'identification de nouveaux partenaires de eEF-1 permettra d'avancer dans la compréhension du rôle de la protéine, soit dans l'élongation de la synthèse protéique soit dans les autres fonctions suspectées comme la réparation de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire.

III- Expression de eEF-1 δ

L'étude de l'expression des ARNm codant pour eEF-1 au cours du développement précoce a montré une régulation transcriptionnelle très intéressante et la mise en place d'une sélection alternative du site de polyadénylation à la gastrulation. La seule différence entre ces deux séquences réside dans la longueur de la région 3' non codante. Cette

différence suggère une régulation différente pour ces deux ARNm. En effet, la région 3'UTR peut être impliquée dans la stabilité du messager, sa localisation, son efficacité de traduction. La détermination du rôle de ces séquences peut être abordée de plusieurs façons: l'étude du recrutement des ARNm dans les polysomes et la microinjection de protéines de fusion des séquences 3' non codantes avec une étiquette GFP (green fluorescent protein). La mesure de la stabilité des messagers et la recherche des protéines susceptibles d'interagir avec la région 3'UTR est également possible. Ces approches sont toutes réalisables chez l'oursin. En particulier, les techniques de GFP constituent chez l'oursin, de nouvelles approches pour l'étude de la régulation transcriptionnelle (Arnone et al, 1997).

Le découplage de l'expression entre eEF-1A et eEF-1 δ conforte l'idée que l'une et/ou l'autre puisse avoir des fonctions spécifiques indépendantes, en particulier, eEF-1A est considéré comme un facteur multifonctionnel (chapitre 1) sans nécessairement qu'il soit régulé dans chacune de ses fonctions par eEF-1B. L'expression de eEF-1 δ est aussi découplée de celle de eEF-1A chez le xénope (Morales et al, 1993), cependant une étude conjointe de l'expression des cinq constituants de eEF-1 devrait être réalisée. Un découplage de l'expression de eEF-1 δ par rapport à celle de EF-1 δ , et/ou la valyl-ARNt synthétase renforcerait l'idée que eEF-1 δ puisse être une entité physiologique avec des fonctions propres.

Alors que les deux messagers codant pour eEF-1 sont régulés au cours du développement précoce, la protéine reste constante pendant la même période. Des mesures de stabilité et de compartimentalisation de la protéine éclairciraient cet apparent paradoxe. Nos résultats concernant eEF-1 δ font de l'oursin un modèle pour comprendre le découplage entre transcription et traduction.

IV- La eEF-1 δ kinase

En utilisant, la protéine recombinante eEF-1 δ comme substrat, nous avons montré une régulation d'une activité eEF-1 δ kinase identifiée à la CK2 au cours du développement précoce. Le lien entre cette activité et la phosphorylation de eEF-1 δ n'est pas établi. Il faudrait étudier d'une part, les éventuels changements de phosphorylation de la protéine eEF-1 δ endogène afin de préciser si elle intervient dans les effets de la CK2 au cours du développement et d'autre part, s'il existe une corrélation entre sa phosphorylation et la régulation de son activité d'échange de GDP/GTP et donc de l'activité d'élongation.

Nos résultats indiquent un rôle de la CK2 dans le développement de l'oursin à la transition blastula-gastrula. Le développement précoce de l'oursin constitue un des meilleurs exemples physiologiques d'activation de la CK2 dont il faut trouver maintenant le mécanisme. Les cibles impliquées dans le blocage de la transition blastula-gastrula sont probablement nombreuses, du fait de la pléiotropie de la CK2. Elles se situent au moins au niveau de l'éclosion, soit par l'intermédiaire de la transcription du message de l'enzyme d'éclosion qui est l'un des premiers transcrits de la blastula (chapitre II), soit par l'activation même de l'enzyme d'éclosion (modifications post-traductionnelles). Ces deux voies sont abordables expérimentalement.

Cependant le rôle de la kinase ne peut se limiter à cette étape du développement puisque son activité continue d'augmenter et reste élevée jusqu'au stade plutéus. Parmi les substrats de la kinase, il est important de déterminer quel est le rôle de la phosphorylation de eEF-1 lui-même dans les différentes étapes du développement dans lesquelles la kinase intervient.

En conclusion, nous pouvons suggérer que eEF-1 serait un intégrateur de différents signaux (plusieurs phosphorylations possibles, ancrage de la Val-RS...) et donc un élément fondamental de la régulation de l'activité du facteur d'échange de nucléotides eEF-1B. L'ensemble des approches proposées chez l'oursin devrait permettre de mieux comprendre la spécificité de eEF-1 par rapport à eEF-1A. Parallèlement, l'étude du rôle de l'activité CK2 au cours du développement et de la phosphorylation de eEF-1 par la CK2 devraient aboutir à la détermination du rôle de la phosphorylation par la CK2 au cours du développement précoce.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, T. et Maniatis, T. (1989). Action of leucine zippers. *Nature* **341**, 24-25.
- Ackerman, P. et Osheroff, N. (1989). Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 11958-1196.
- Ackerman, P., Glover, C.V.C. et Osheroff, N. (1990). Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor : relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its beta subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 821-825.
- Agostinis, P., Goris, J., Pinna, L.A. et Merlevede, W. (1987). Regulation of casein kinase 2 by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem. J.* **248**, 785-789.
- Ahmed, K., Goueli, S.A. et Williams-Ashman, H.G. (1985). Characteristics of polyamine stimulation of cyclic nucleotide-independent protein kinase reactions. *Biochem. J.* **232**, 767-771.
- Ahmed, K., Goueli, S.A. et Williams-Ashman, H.G. (1986). Mechanisms and significance of polyamine stimulation of various protein kinase reactions. *Adv. Enzyme Regul.* **25**, 401-421.
- Allende, J.E. et Allende, C.C. (1995). Protein kinases 4: Protein kinase CK2: An enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *Faseb J.* **9**, 313-323.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Amons, R., Guerrucci, M.A., Karssies, R.H., Morales, J., Cormier, P., Moller, W. et Belle, R. (1994). The leucine-zipper in elongation factor EF-1 delta, a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 346-350.
- Anderson, D.M., Richter, J.D., Chamberlin, M.E., Price, D.H., Britten, R.J., Smith, L.D. et Davidson, E.H. (1982). Sequence organization of the poly(A) RNA synthesized and accumulated in lampbrush chromosome stage *Xenopus laevis* oocytes. *J. Mol. Biol.* **155**, 281-309.
- Arcari, P., Raimo, G., Ianniciello, G., Gallo, M. et Bocchini, V. (1995). The first nucleotide sequence of an archaeal elongation factor 1 beta gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 86-88.
- Arias, A.M., Brown, A. M.C. et Brennan, K. (1999). Wnt signalling: pathway or network? *Curr. Op. Genet. Dev.* **9**, 447-454.
- Arion, D. et Meijer, L. (1989). M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs : cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp. Cell Res.* **183**, 361-375.
- Arnone, M.I., Bogarad, L.D., Collazo, A., Kirchamer, C.V., Cameron, R.A., Rast, J.P., Gregorians, A et Davidson, E.H. (1997). Green fluorescent protein in the sea urchin: new experimental approaches to transcriptional regulatory analysis in embryo and larvae. *Development* **124**, 4649-4659
- Bassell, G.J., Powers, C.M., Taneja, K.L. et Singer, R.H. (1994). Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **126**, 863-876.
- Bec, G., Kerjean, P., Zha, X.D. et Waller, J.P. (1989). Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *J. Biol. Chem.* **264**, 21131-21137.
- Bec G. et Waller JP. (1989). Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* **264**, 21138-21143.
- Bec, G., Kerjean, P. et Waller, J.P. (1994). Reconstitution *in vitro* of the Valyl-Transfer RNA Synthetase-Elongation Factor (EF) 1 beta gamma delta Complex - Essential Roles of the NH₂-Terminal Extension of Valyl-Transfer RNA Synthetase and of the EF-1 delta Subunit in Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **269**, 2086-2092.
- Bedard, P.A. et Brandhorst, B.P. (1983). Patterns of protein synthesis and metabolism during sea urchin embryogenesis. *Dev. Biol.* **96**, 74-83.
- Belfield, G.P. et Tuite, M.F. (1993). Translation elongation factor 3: a fungus specific translation factor? *Mol. Microbiol.* **9**, 411-418.

- Belle, R., Derancourt, J., Poulhe, R., Capony, J.P., Ozon, R. et Mulner-Lorillon, O. (1989). A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an in vivo substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 γ and EF-1 β . *Febs Lett.* **255**, 101-104.
- Belle, R., Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R. et Mulner-Lorillon, O. (1995). Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. In "Progress in Cell Cycle Research" (L. Meijer, S. Guidet and H.Y.L. Tung, Eds.), Vol.1, pp. 265-270. Plenum Press, New York.
- Bidwai, A.P., Reed, J.C. et Glover, C.V.C. (1993). Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase-II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 265-270.
- Billaut-Mulot, O., Pommier, V., Shoneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A. et Ouaiissi, MA. (1993). Nucleotide sequence of a trypanosoma cruzi cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 γ . *Nucl. Acid. Res.* **21**, 3901.
- Billaut-Mulot, O., Fernandez-Gomez, R. et Ouaiissi, A. (1997). Phenotype of recombinant *Trypanosoma cruzi* which overexpress elongation factor 1- γ : possible involvement of EF-1 γ GST-like domain in the resistance to clomipramine. *Gene* **198**, 259-267.
- Birnbaum, M.J., Wu, J., O'Reilly, D.R., Rivera-Marrero, C.A., Hanna, D.E., Miller, L.K. et Glover, C.V. (1992). Expression and purification of the alpha and beta subunits of *Drosophila* casein kinase II using a baculovirus vector. *Protein. Expr. Purif.* **3**, 142-150.
- Boldyreff, B., Schneider, H.R., Fritz, G., Traffa, K., Seitz, G. et Issinger, O.G. (1989). CKII, a pleiotropic mediator of proliferation and oncogenesis. *Adv. Mol. Gen.* **2**, 91-98.
- Bollini, R., Soffientini, A.N., Bertani, A. et Lanzani, G.A. (1974). Some molecular properties of the elongation factor EF1 from wheat embryos. *Biochemistry* **13**, 5421-5425.
- Bosc, D.G., Slominski, E., Sichler, C. et Litchfield, D.W. (1995). Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2. Identification of phosphorylation sites using phosphorylation site mutants in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**, 25872-25878.
- Bosc, D.G., Luscher, B. et Litchfield, D.W. (1999). Expression and regulation of protein kinase CK2 during the cell cycle. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 213-222.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. et McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Brachet, J., Ficq, A. et Tencer, R. (1963). Amino acid incorporation into proteins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs: effect of parthenogenetic activation. *Exp. Cell Res.* **32**, 168-170.
- Brandhorst, B.P. et Humphreys, T. (1971). Synthesis and decay rates of major classes of deoxyribonucleic acid-like ribonucleic acid in sea urchin embryos. *Biochemistry* **10**, 877-881.
- Brandhorst, B.P. (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **52**, 310-317.
- Brandis, J.W. et Raff, R.A. (1978). Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. *Dev. Biol.* **67**, 99-113.
- Brandis, J.W. et Raff, R.A. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilization. *Nature* **278**, 467-469.
- Brandsma, M., Kerjan, P., Dijk, J., Janssen, M.C. et Moller, W. (1995). Valyl-tRNA synthetase from *Artemia*. Purification and association with elongation factor 1. *Eur. J. Biochem.* **233**, 277-282.
- Browne, C.L., Bower, W.A., Palazzo, R.E. et Rebhun, L.I. (1990). Inhibition of mitosis in fertilized sea urchin eggs by inhibition of the cyclic AMP-dependant protein kinase. *Exp. Cell Res.* **188**, 122-128.
- Browning, K.S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**, 107-144.
- Cabrera, C.V., Lee, J.J., Ellison, J.W., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1984). Regulation of cytoplasmic mRNA prevalence in sea urchin embryos. Rate of appearance and turnover for specific sequences. *J. Mol. Biol.* **174**, 85-111.
- Caldwell, D.C. et Emerson Cp, J.R. (1985). The role of cap methylation in the translational activation of stored maternal histone mRNA in sea urchin embryos. *Cell* **42**, 691-700.

- Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V.I., Williams, T., Startita, L.M. et Kinzy, T.G. (1999). Mutations in elongation factor 1 beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5257-5266.
- Carroll, D. et Marshak, D.R. (1989). Serum-stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 7345-7348.
- Carvalho, J.F., Carvalho, M.G.C. et Merrick, W.C. (1984). Purification of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 591-602.
- Chae, S. et Maeda, Y. (1998). Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the elongation factor-1 beta of *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1383**, 1-3.
- Chakraborty, K. (1999). Functional interaction of yeast elongation factor 3 with yeast ribosomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 163-173.
- Chang, Y.W. et Traugh, J.A. (1997). Phosphorylation of elongation factor 1 and ribosomal protein S6 by multipotential S6 kinase and insulin stimulation of translational elongation. *J. Biol. Chem.* **272**, 28252-28257.
- Chang, Y.W. et Traugh, J.A. (1998). Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity. *Eur. J. Biochem.* **251**, 201-207.
- Chen, C.J. et Traugh, J.A. (1995). Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**, 303-311.
- Chester, N., Yu, I.G. et Marshak, D.R. (1995). Identification and characterization of protein kinase CKII isoforms in HeLa cells. Isoform-specific differences in rates of assembly from catalytic and regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 7501-7514.
- Chi, K., Jones, D.V. et Frazier, M.L. (1992). Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. *Gastroenterology* **103**, 98-102.
- Chiri, S., De Nadai, C. et Ciapa, B. (1998). Evidence for MAP kinase activation during mitotic division. *J. Cell Sci.* **111**, 2519-2527.
- Ciapa, B. et Epel, D. (1991). A rapid change in phosphorylation on tyrosine accompanies fertilization of sea urchin eggs. *Febs Lett.* **295**, 167-170.
- Cicirelli, M.F., Pelech, S.L. et Krebs, E.G. (1988). Activation of multiple protein kinases during the burst in protein phosphorylation that precedes the first meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 2009-2019.
- Clemens, M.J. et Bommer, U.A. (1999). Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1-23.
- Cochet, C., Job, D., Pirollet, F. et Chambaz, E.M. (1980). Adenosine 3', 5'-monophosphate-independent protein kinase activities in the bovine adrenal cortex cytosol. *Endocrinology* **106**, 750-757.
- Cochet, C. et Chambaz, E.M. (1983a). Polyamine-mediated protein phosphorylations: a possible target for intracellular polyamine action. *Mol. Cell. Endocrinol.* **30**, 247-266.
- Cochet, C. et Chambaz, E.M. (1983b). Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments. *J. Biol. Chem.* **258**, 1403-1406.
- Colin, A.M., Brown, B.D., Dholakia, J.N., Woodley, C.L., Wahba, A.J. et Hille, M.B. (1987). Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **123**, 354-363.
- Constantini, F.D., Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1980). Message sequences and short repetitive sequences are interspersed in sea urchin egg poly(A)⁺ RNAs. *Nature* **287**, 111-117.
- Cormier, P., Osborne, H.B., Morales, J., Bassez, T., Poughle, R., Mazabraud, A., Mulner-Lorillon, O. et Belle, R. (1991). Molecular cloning of *Xenopus* elongation factor 1 gamma, major M-phase promoting factor substrate. *Nucl. Acid. Res.* **19**, 6644.
- Cormier, P., Osborne, H.B., Morales, J., Bassez, T., Minella, O., Poulhe, R., Belle, R. et Mulner-Lorillon, O. (1993). Elongation factor-1 contains 2 homologous guanine-nucleotide exchange proteins as shown from the molecular cloning of beta and delta subunits. *Nucl. Acids Res.* **21**, 743.

- Cormier, P. (2000). Facteurs de traduction. Du contrôle de la synthèse des protéines au cycle cellulaire et à la tumorigénèse. Accepté dans Médecine Sciences.
- Damuni, Z. et Reed, L.J. (1988). Purification and properties of a protamine kinase and a type II casein kinase from bovine kidney mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 574-584.
- Dasgupta, J.D. et Garbers, D.L. (1983). Tyrosine protein kinase activity during embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **258**, 6174-6178.
- Davidson, E.H. (1986). Gene activity in early development (E.H. Davidson, Eds.),. Academic Press, Orlando.
- Davidson, E.H., Hough-Evans, B.R. et Britten, R.J. (1982). Molecular biology of the sea urchin embryo. *Science* **217**, 17-26.
- De Nadai, C., Huitorel, P., Chiri, S. et Ciapa, B. (1998). Effect of wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on the first mitotic divisions of the fertilized sea urchin egg. *J. Cell Sci.* **111**, 2507-2518.
- Debarry, J., Kawahara, S., Takamura, K., Janoshazi, A., Kirino, Y., Olds, J.L., Lester, D.S., Alkon, D.L. et Yoshioka, T. (1997). Time-resolved imaging of protein kinase C activation during sea urchin egg fertilization. *Exp. Cell Res.* **234**, 115-124.
- DeBenedette, M. et Snow, E.C. (1991). Induction and regulation of casein kinase II during B lymphocyte activation. *J. Immunol.* **147**, 2839-2845.
- Delpech, M., Levy-Favatier, F., Moisand, F. et Kruh, J. (1986). Rat liver nuclear protein kinases NI and NII. Purification, subunit composition, substrate specificity, possible levels of regulation. *Eur. J. Biochem.* **160**, 333-341.
- Denny, P.C. et Tyler, A. (1964). Activation of protein biosynthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 245-249.
- Denny, P.C. et Reback, P. (1970). Active polysomes in sea urchin eggs and zygotes: evidence for an increase in translatable messenger RNA after fertilization. *J. exp. Zool.* **175**, 133-140.
- Dholakia, J.N. et Wahba, A.J. (1988). Phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor from rabbit reticulocytes regulates its activity in polypeptide chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 51-54.
- Dinman, J.D. et Kinzy, T.G. (1997). Translational misreading: Mutations in translation elongation factor 1 alpha differentially affect programmed ribosomal frameshifting and drug sensitivity. *RNA* **3**, 870-881.
- Dje, M.K., Mazabraud, A., Viel, A., Le Maire, M., Denis, H., Crawford, E. et Brown, D.D. (1990). Three genes under different developmental control encode elongation factor 1-alpha in *Xenopus laevis*. *Nucl. Acid. Res.* **18**, 3489-3493.
- Dobrowolska, G., Muszynska, G. et Shugar, D. (1991). Benzimidazole nucleoside analogues as inhibitors of plant (maize seedling) casein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1080**, 221-226.
- Durso, N.A. et Cyr, R.J. (1994). A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *Plant Cell* **6**, 893-905.
- Durso, N.A., Leslie, J.D. et Cyr, R.J. (1996). In situ immunocytochemical evidence that a homolog of protein translation elongation factor EF-1 alpha is associated with microtubules in carrot cells. *Protoplasma* **190**, 141-150.
- Edelman, A.M., Blumental, D.K. et Krebs, E.G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 567-613.
- Edmonds, B.T., Wyckoff, J., Yeung, Y.G., Wang, Y., Stanley, E.R., Jones, J., Segall, J. et Condeelis, J. (1996). Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J. Cell Sci.* **109**, 2705-2714.
- Ejiri, S.I., Murakami, K. et Katsumata T. (1977). Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Purification and some properties of its gamma subunit having EF-1b activity. *Febs lett.* **82**, 111-114.
- Ejiri, S.I., Ebata, N., Kawamura, R. et Katsumata, T. (1983). Occurrence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain elongation factor 1 from wheat embryo. *J. Biochem.* **94**, 319-322.

- Ejiri, S.I. et Honda, H. (1985). Effect of cyclic AMP and cyclic GMP on the autophosphorylation of elongation factor 1 from wheat embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 53-60.
- Ejiri, S.I. (1986). Purification and characterization of polypeptide elongation chain elongation factor 1 from plants. *Methods Enzymol.* **118**, 140-153.
- Ejiri, S.I., Kawamura, R. et Katsumata, T. (1994). Interactions among four subunits of elongation factor 1 from rice embryo. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**, 266-272.
- Emily-Fenouil, F., Ghiglione, C., Lhomond, G., Lepage, T. et Gache, C. (1998). GSK3 beta/shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo. *Development* **125**, 2489-2498.
- Ender, B., Lynch, P., Kim, Y.H., Inamdar, N.V., Cleary, K.R. et Frazier, M.L. (1993). Overexpression of an elongation factor-1 gamma-hybridizing RNA in colorectal adenomas. *Mol. Carcinogen.* **7**, 18-20.
- Epel, D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 899-906.
- Epel, D., Steinhardt, R., Humphreys, T. et Mazia, D. (1974). An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia : The existence of independent pathway. *Dev. Biol.* **40**, 245-255.
- Epel, D. (1977). The program of fertilization. *Scient. Am.* **237**, 128-138.
- Epel, D. (1978). Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Curr. Top. Dev. Biol.* **12**, 185-246.
- Epel, D. (1990). The initiation of development at fertilization. *Cell Differ. Dev.* **29**, 1-12.
- Etkin, L.D. (1988). Regulation of the mid-blastula transition in amphibians. *Dev. Biol.* **5**, 209-225.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. et Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.
- Feige, J.J., Pirollet, F., Cochet, C. et Chambaz, E.M. (1980). Selective inhibition of a cyclic nucleotide-independent protein kinase (G-type casein kinase) by naturally occurring glycosaminoglycans. *Febs Lett.* **121**, 139-142.
- Felicetti, L., Metafora, S., Gambino, R. et Di Matteo, G. (1972). Characterization and activity of the elongation factors T1 and T2 in the unfertilized egg and in the early development of sea urchin. *Cell Differ.* **1**, 265-277.
- Fialho, E., Masuda, H. et Silva-Neto, M.A.C. (1999). Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis: protein kinase casein kinase II activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 215-223.
- Fischer, E.H. (1997) Cellular regulation by protein phosphorylation: a historical review. *Biofactors* **6**, 367-374
- Flytzanis C, N., Brandhorst B, P., Britten R, J. et Davidson E, H. (1982). Developmental patterns of cytoplasmic transcript prevalence in sea urchin embryos. *Dev. Biol.* **91**, 27-35.
- Fonzi, W.A., Katayama, C., Leathers, T. et Shyperd, P.S. (1985). Regulation of protein synthesis factor EF-1alpha in *Mucor racemosus*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1100-1103.
- Frigerio, J.M., Berthezene, P., Garrido, P., Ortiz, E., Barthellemy, S., Vasseur, S., Sastre, B., Seleznieff, I., Dagorn, J.C. et Iovanna, J.L. (1995). Analysis of 2166 clones from a human colorectal cancer cDNA library by partial sequencing. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 37-43.
- Fujino, Y. et Yasumasu, I. (1983a). Changes in cAMP-dependent protein kinase activity in the 10,000g sediment of sea urchin embryos during early development. *Gamete Res.* **7**, 241-248.
- Fujino, Y. et Yasumasu, I. (1983b). Change in phosphatase kinase activity during early development of the sea urchin. *Gamete Res.* **7**, 249-257.
- Galau, G.A., Lipson, E.D., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1977). Synthesis and turnover of polysomal mRNAs in sea urchin embryos. *Cell* **10**, 415-432.
- Gatica, M., Allende, C.C., Antonelli, M. et Allende, J.E. (1987). Polylysine-containing peptides, including the carboxyl-terminal segment of the human c-Ki-ras 2 protein, affect the activity of some key membrane enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 324-328.

- Gatica, M., Allende, C.C. et Allende, J.E. (1989). Nucleic acids can regulate the activity of casein kinase II. *Febs Lett.* **255**, 414-418.
- Gatica, M., Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Allende, C.C. et Allende, J.E. (1993). Effect of metal ions on the activity of casein kinase-II from *xenopus-laevis*. *Febs Lett.* **315**, 173-177.
- Geahlen, R.L. et Harrison, M.L. (1984). Induction of a substrate for casein kinase II during lymphocyte mitogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **804**, 169-175.
- Genevriere-Garrigues, A.M., Barakat, A., Doree, M., Moreau, J.L. et Picard, A. (1995). Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *J. Cell Sci.* **108**, 2693-2703.
- Gidekel, M., Jimenez, B. et Herrera-Estrella, L. (1996). The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 beta contains an enhancer-like element. *Gene* **170**, 201-206.
- Girault, J.A., Hemmings Hc, J.R., Zorn, S.H., Gustafson, E.L. et Greengard, P. (1990). Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. *J. Neurochem.* **55**, 1772-1783.
- Giudice, G. (1973). *Developmental biology of the sea urchin embryo*, Academic Press, New-York.
- Glover C.V.C., (1998). On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 95-133.
- Gonzatti-Haces, MI. et Traugh, JA. (1982). Kinetics of phosphorylation of eIF-2 by the hemin controlled repressor and casein kinase II; inhibition by hemin and 2,3 diphosphoglyceric acid. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6642-6645.
- Gonzatti, M.I. et Traugh, J.A. (1988). 2,3-bisphosphoglycerate inhibits hemoglobin synthesis and phosphorylation of initiation factor 2 by casein kinase II in reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 134-139.
- Goustin, A.S. et Wilt, F.H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **82**, 32-40.
- Grainger, J.L. et Winkler, M.M. (1987). Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3947-3954.
- Grainger, J.L., Von Brunn, A. et Winkler, M.M. (1986). Transient synthesis of a specific set of proteins during the rapid cleavage phase of sea urchin development. *Dev. Biol.* **114**, 403-415.
- Grainger, J.L., Winkler, M.M., Shen, S.S. et Steinhardt, R.A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. *Dev. Biol.* **68**, 396-406.
- Grankowski, N., Boldyreff, B. et Issinger, O.G. (1991). Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 25-30.
- Grant, A.G., Flomen, R.M., Tizard, M.L. et Grant, D.A. (1992). Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells. *Int. J. Cancer* **50**, 740-745.
- Gross, P.R. et Cousineau, G.H. (1963). Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 321-326.
- Gross, P.R. et Cousineau, G.H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp. Cell Res.* **33**, 368-395.
- Gross, P.R. et Fry, B.J. (1966). Continuity of protein synthesis through cleavage metaphase. *Science* **153**, 749-751.
- Guerra, B. et Issinger, O.G. (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391-408.
- Hanna, D.E., Rethinaswamy, A. et Glover, C.V.C. (1995). Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 25905-25914.
- Hansen, L.J., Huang, W.I. et Jagus, R. (1987). Inhibitor of translational initiation in sea urchin eggs prevents mRNA utilization. *J. Biol. Chem.* **262**, 6114-6120.

- Hara, T., Takahashi, K. et Endo, H. (1981). Reversal of heparin inhibition of nuclear protein kinase NII by polyamines and histones. *Febs. Lett.* **128**, 33-36.
- Hathaway, G.M., Lubben, T.H. et Traugh, J.A. (1980). Inhibition of casein kinase II by heparin. *J. Biol. Chem.* **255**, 8038-8041.
- Hathaway, G.M. et Traugh, J.A. (1982). Casein kinases - multipotential protein kinases. *Curr. Top. Cell Regul.* **21**, 101-127.
- Hathaway, G.M. et Traugh, J.A. (1983). Casein kinase II. *Methods. Enzymol.*, **99**, 317-331.
- Hathaway, G.M. et Traugh, J.A. (1984a). Regulation of casein kinase II by 2,3-bisphosphoglycerate in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 2850-2855.
- Hathaway, G.M. et Traugh, J.A. (1984b). Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 133-138.
- Hathaway, G.M. et Traugh, J.A. (1984c). Kinetics of activation of casein kinase II by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J. Biol. Chem.* **259**, 7011-7015.
- Hattori, S. et Iwasaki, K. (1980). Studies on the high molecular weight form of polypeptide chain elongation factor-1 from pig liver. I. Purification and subunit structure. *J. Biochem. (tokyo)*. **88**, 725-736.
- Hayashi, Y., Urade, R., Utsumi, S. et Kito, M. (1989). Anchoring of peptide elongation factor EF-1alfa by phosphatidylinositol at the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biochem. (tokyo)* **106**, 560-563.
- Heinecke, J.W. et Shapiro, B.M. (1989). Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1259-1263.
- Heinecke, J.W. et Shapiro, B.M. (1990). Protein kinase C activates the respiratory burst of fertilization, but not cortical granule exocytosis, in ionophore-stimulated sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **142**, 216-223.
- Heriche, J.K. et Chambaz, E.M. (1998). Protein kinase CK2 alpha is a target for the Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Oncogene* **17**, 13-18.
- Herlands, L., Allfrey, V.G. et Poccia, D. (1982). Translational regulation of histone synthesis in the sea urchin *strongylocentrotus purpuratus*. *J. Cell. Biol.* **94**, 219-223.
- Herrera, F., Correia, H., Triana, L. et Fraile, G. (1991). Association of ribosomal subunits. A new functional role for yeast EF-1alfa in protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **200**, 321-327.
- Hershey, J.W.B. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 717-755.
- Hille, M.B. et Albers, A.A. (1979). Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature* **278**, 469-471.
- Hille, M.B., Dholakia, J.N., Wahba, A., Fanning, E., Stimler, L., Xu, Z. et Yablonka-Reuveni, Z. (1990). In-vivo and in-vitro evidence supporting co-regulation of translation in sea-urchin eggs by polypeptide initiation factors, pH optimization, and mRNAs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **42**, 235-248.
- Hinegardner, R.T. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* **137**, 465-475.
- Hiraga, K., Suzuki, K., Tsuchiya, E. et Miyakawa, T. (1993). Cloning and characterization of the elongation factor EF-1beta homologue of *Saccharomyces cerevisiae* - EF-1beta is essential for growth. *Febs Lett.* **316**, 165-169.
- Hörstadius, S. (1973). Experimental embryology of echinoderms, Clarendon Press, Oxford.
- Hu, E. et Rubin, C.S. (1990). Casein kinase II from *Caenorhabditis elegans*. Properties and developmental regulation of the enzyme; cloning and sequence analyses of cDNA and the gene for the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, 5072-5080.
- Huang, W.I., Hansen, L.J., Merrick, W.C. et Jagus, R. (1987). Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6359-6363.
- Hultin, T. (1961). The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia.* **15**, 410-411.

- Humphreys, T. (1969). Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Dev. Biol.* **20**, 435-458.
- Humphreys, T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **26**, 201-208.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Infante, A.A. et Nemer, M. (1967). Accumulation of newly synthesized RNA templates in a unique class of polyribosomes during embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 681-688.
- Issinger, O.G. (1993). Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.* **59**, 1-30.
- Jacob, A.N.K., Kandpal, G. et Kandpal, R.P. (1996). Isolation of expressed sequences that include a gene for familial breast cancer (BRCA2) and ather novel transcripts from a five megabase region on chromosome 13q12. *Oncogene* **13**, 213-221.
- Jagus, R., Huang, W.I., Hansen, L.J. et Wilson, M.A. (1992). Changes in rates of protein synthesis and eukaryotic initiation factor-4 inhibitory activity in cell-free translation systems of sea urchin eggs and early cleavage stage embryos. *J. Biol. Chem.* **267**, 15530-15536.
- Jakobi, R., Lin, W.J. et Traugh, J.A. (1994). Modes of regulation of casein kinase II. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 421-429.
- Janssen, G.M.C. et Moller, W. (1988a). Elongation factor 1betagamma from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.* **171**, 119-129.
- Janssen, G.M.C. et Moller, W. (1988b). Kinetic studies on the role of elongation factors 1beta and 1gamma in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **263**, 1773-1778.
- Janssen, G.M.C., Maessen, G.D.F., Amons, R. et Moller, W. (1988). Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 11063-11066.
- Janssen, G.M.C., Morales, J., Schipper, A., Labbe, J.-C., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. et Moller, W. (1991). A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1bgd in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14885-14888.
- Janssen, G.M.C., Vandamme, H.T.F., Kriek, J., Amons, R. et Moller, W. (1994). The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia* - Why two alpha-chains in this complex? *J. Biol. Chem.* **269**, 31410-31417.
- Jefferies, H.B.J., Thomas, G. et Thomas, G. (1994). Elongation Factor-1 alpha mRNA is selectively translated following mitogenic stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 4367-4372.
- Jessus, C. et Ozon, R. (1993). Regulation of cell division during oogenesis of vertebrates: the *xenopus* oocyte paradigm. *Comp. Biochem. Physiol.* **106**, 431-448.
- Johnson, J.D. et Epel, D. (1976). Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature* **262**, 661-664.
- Jung, M., Kondratyev A, D. et Dritschilo, A. (1994). Elongation factor 1delta is enhanced following exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* **54**, 2541-2543.
- Kambouris, N.G., Burke, D.J. et Creutz, C.E. (1993). Cloning and genetic characterization of a calcium-binding and phospholipid-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae* that is homologous to translation elongation factor-1gamma. *Yeast* **9**, 151-163.
- Kandror, K.V. et Stepanov, A.S. (1984). RNA-binding protein kinase from amphibian oocytes is a casein kinase II. *Febs Lett.* **170**, 33-37.
- Kandror, K.V., Benumov, A.O. et Stepanov, A.S. (1989). Casein kinase II from *Rana temporaria* oocytes. Intracellular localization and activity during progesterone-induced maturation. *Eur. J. Biochem.* **180**, 441-448.
- Kandror, K.V. et Stepanov, A.S. (1990). Inhibition of casein kinase 2 activity by the formation of complexes with mRNA in vivo. *Biokhimiya* **55**, 1584-1589.

- Kato, S. et Schroeter, S.C. (1985). Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California. *Marine Fisheries Review* **47**, 1-20.
- Kawaguchi, Y., Bruni, R. et Roizman, B. (1997). Interaction of Herpes simplex virus 1 a regulatory protein ICPO with elongation factor 1 delta : ICPO affects translational machinery. *J. Virol.* **71**, 1019-1024.
- Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B. et Hirai, K. (1998). Eukaryotic elongation factor 1 delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoding by the U(L)13 gene of herpes simplex virus 1. *J. virol.* **72**, 1731-1736.
- Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B. et Hirai, K. (1999). Cellular elongation factor 1 delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.* **73**, 4456-4460.
- Kedes, L.H. et Gross, P.R. (1969). Synthesis and function of messenger RNA during early embryonic development. *J. Mol. Biol.* **42**, 559-575.
- Keller, C., Gundersen, G. et Shapiro, B.M. (1980). Altered *in vitro* phosphorylation of specific proteins accompanies fertilization of *Strongylocentrotus purpuratus* eggs. *Dev. Biol.* **74**, 86-100.
- Kelso-Winemiller, L., Grainger, J.L., Peeler, M.T. et Winkler, M. (1990). Reprogramming protein synthesis for rapid cell cycles: a model to explain major patterns of gene expression during early development. *Dev. Biol.* **4**, 47-59.
- Kelso-Winemiller, L.C. et Winkler, W.M. (1991). "Unmasking" of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development* **111**, 623-633.
- Kelso-Winemiller, L., Yoon, J., Peeler, M.T. et Winkler, M. (1993). Sea urchin maternal mRNA classes with distinct developmental regulation. *Develop. Genet.* **14**, 397-406.
- Kidou, S. et Ejiri S. (1998). Isolation, characterization and mRNA expression of four cDNAs encoding translation elongation factor 1alpha from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant. Mol. Biol.* **36**, 137-148.
- Kidou, S., Tsukamoto, S., Kobayashi, S. et Ejiri, S. (1998). Isolation and characterization of a rice cDNA encoding the gamma-subunit of translation elongation factor 1B (eEF1B gamma). *Febs Lett.* **434**, 382-386.
- Kielbassa, K., Muller, H.J., Meyer, H.E., Marks, F. et Gschwendt, M. (1995). Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-1 alpha and an eEF-1 alpha peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.* **270**, 6156-6162.
- Kikkawa, U., Mann, S.K.O., Firtel, R.A. et Hunter, T. (1992). Molecular cloning of casein kinase-II alpha-subunit from *Dictyostelium discoideum* and its expression in the life cycle. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5711-5723.
- Kinsey, W.H. (1984). Regulation of tyrosine-specific kinase activity at fertilization. *Dev. Biol.* **105**, 137-143.
- Kinsey, W.H. (1995). Protein tyrosine kinase activity during egg activation is important for morphogenesis at gastrulation in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **172**, 704-707.
- Kinsey, W.H. (1996). Biphasic activation of fyn kinase upon fertilization of the sea urchin egg. *Dev. Biol.* **174**, 281-287.
- Kinsey, W.H. (1997). Tyrosine kinase signaling at fertilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 519-522.
- Kinzy, T.G., Ripmaster, T.L. et Woolford, J.L. (1994). Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 gamma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2703-2707.
- Kinzy, T.G. et Woolford JI, J.R. (1995). Increased expression of *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factor 1 alpha bypasses the lethality of TEF5 null allele encoding elongation factor 1 beta. *Genetics* **141**, 481-489.
- Kisselev LL. et Frolova LY. (1999). Termination of translation in eukaryotes : new results and new hypotheses. *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 8-16.
- Kolettas, E., Lymboura, M., Khazaie, K. et Luqmani, Y. (1998). Modulation of elongation factor-1 delta (EF-1 delta) expression by oncogenes in human epithelial cells. *Anticancer. Res.* **18**, 385-392.

- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P. et Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain - Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Science* **3**, 2045-2054.
- Kumabe, T., Sohma, Y. et Yamamoto, T. (1992). Human cDNAs encoding elongation factor 1 gamma and the ribosomal protein L19. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2598.
- Kumar, R. et Tao, M. (1975). Multiple forms of casein kinase from rabbit erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **410**, 87-98.
- Lasky, L., Lev, Z., Xin, J.H., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1980). Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5317-5321.
- Lev, Z., Thomas, T.L., Lee, A.S., Angerer, R.C., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1980). Developmental expression of two cloned sequences coding for rare sea urchin embryo messages. *Dev. Biol.* **76**, 322-340.
- Lew, Y., Jones, D.V., Mars, W.M., Evans, D., Byrd, D. et Frazier, M.L. (1992). Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. *Pancreas* **7**, 144-152.
- Lin, W.-J., Tuazon, P.T. et Traugh, J.A. (1991). Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in Escherichia coli and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 5664-5669.
- Lin, A.N., Frost, J., Deng, T.L., Smeal, T., Alalawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. et Karin, M. (1992). Casein kinase-II is a negative regulator of c-jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**, 777-789.
- Linnala-Kankkunen, A., Palvimo, J. et Maenpaa, P.H. (1984). Polyamines and heparin do not appreciably influence phosphorylation of chromatin proteins HMG 14 and HMG 17 by nuclear protein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* **799**, 122-127.
- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericsson, L.H., Piening, C.J. et Krebs, E.G. (1991). Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **266**, 20380-20389.
- Litchfield, D.W., Luscher, B., Lozeman, F.J., Eisenman, R.N. et Krebs, E.G. (1992). Phosphorylation of casein kinase-II by p34(cdc2) in vitro and at mitosis. *J. Biol. Chem.* **267**, 13943-13951.
- Litchfield, D.W. et Luscher, B. (1993). Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biochem.* **128**, 187-199.
- Livingston, B.T., Vanwinkle, C.E. et Kinsey, W.H. (1998). Protein tyrosine kinase activity following fertilization is required to complete gastrulation, but not for initial differentiation of endoderm and mesoderm in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **193**, 90-99.
- Lorenz, P., Pepperkok, R. et Pyerin, W. (1994). Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 519-527.
- MacKintosh, F.R. et Bell, E. (1969). Regulation of protein synthesis in sea urchin eggs. *J. Mol. Biol.* **41**, 365-380.
- Mäenpää, P.H. (1977). Effects of polyamines and polyanions on a cyclic nucleotide-independent and a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **498**, 294-305.
- Maessen, G.D.F., Amons, R., Maassen, J.A. et Moller, W. (1986). Primary structure of elongation factor 1beta from Artemia. *Febs Lett.* **208**, 77-83.
- Maessen, G.D.F., Amons, R., Zeelen, R. et Moller, W. (1987). Primary structure of elongation factor 1gamma from Artemia. *Febs Lett.* **223**, 181-186.
- Maneu, V., Cervera, A.M., Martinez, J.P. et Gozalbo, D. (1996). Molecular cloning and characterization of a Candida albicans gene (EFB1) coding for the elongation factor EF-1 beta. *Fems. Microbiol. Lett.* **145**, 157-162.
- Maridor, G., Park, W., Krek, W. et Nigg, E.A. (1991). Casein kinase II. cDNA sequences, developmental expression, and tissue distribution of mRNAs for alpha, alpha' and beta subunits of the chicken enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 2362-2368.
- Marshak, D.R. et Russo, G.L. (1994). Regulation of protein kinase CKII during the cell division cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 513-517.

- Mathews, M.B., Sonenberg, N. et Hershey J.W.B (1996). Origins and targets of translational control. In "Translational control" (J.W.B. Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, Eds.), 1-29. CSHL press, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mathur, S., Cleary, K.R., Inamdar, N., Kim, Y.H., Steck, P. et Frazier, M.L. (1998). Overexpression of elongation factor-1gamma protein in colorectal carcinoma. *Cancer* **82**, 816-821.
- Matsumoto, S., Oizumi, N., Taira, H. et Ejiri, S. (1992). Cloning and sequencing of the cDNA encoding rice elongation factor-1beta'. *Febs Lett.* **311**, 46-48.
- Matsumoto, S., Mizoguchi, T., Oizumi, N., Tsuruga, M., Shinozaki, K., Taira, H. et Ejiri, S. (1993). Analysis of phosphorylation of wheat elongation factor-1 beta and factor-beta(γ) by casein kinase-II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1740-1742.
- Matsumoto, S., Terui, Y., Xi, S.X., Taira, H. et Ejiri, S. (1994). Cloning and Characterization of the cDNA Encoding Rice Elongation Factor 1 beta. *Febs Lett.* **338**, 103-106.
- Meggio, F., Donella Deana, A., Brunati, A.M. et Pinna, L.A. (1982). Inhibition of rat liver cytosol casein kinases by heparin. *Febs. Lett.* **141**, 257-262.
- Meggio, F., Brunati, A.M. et Pinna, L.A. (1983). Autophosphorylation of type 2 casein kinase TS at both its alfa- and beta-subunits. Influence of different effectors. *Febs Lett.* **160**, 203-208.
- Meggio, F. et Pinna, L.A. (1984). Subunit structure and autophosphorylation mechanism of casein kinase-TS (type-2) from rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.* **145**, 593-599.
- Meggio, F., Brunati, A.M. et Pinna, L.A. (1987). Polycation-dependent, Ca²⁺-antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and spleen tyrosine protein kinase. *Febs Lett.* **215**, 241-246.
- Meggio, F., Shugar, D. et Pinna, L.A. (1990). Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* **187**, 89-94.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Marchiori, F., Perich, J.W., Issinger, O.-G. et Pinna, L.A. (1992a). The effect of polylysine on casein-kinase-2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **205**, 939-945.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L.A. et Issinger, O.-G. (1992b). Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **204**, 293-297.
- Meggio, F., Donella Deana, A., Ruzzene, M., Brunati, A.M., Cesaro, L., Guerra, B. et al. (1995). Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetics studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem* **234**, 317-322.
- Meijer, L. et Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp. Cell Res.* **174**, 116-129.
- Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T. et Beach, D. (1989). Cyclin is a component of sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J.* **8**, 2275-2282.
- Meijer, L., Azzi, L. et Wang, J. (1991). Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **10**, 1545-1554.
- Meisner, H. et Czech, M.P. (1991). Phosphorylation of transcriptional factors and cell-cycle-dependent proteins by casein kinase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 474-483.
- Merrick, W.C. et Hershey, J.W.B. (1996). The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In "Translational control" (J.W.B. Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, Eds.), 31-69. CSHL Press, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mimori, K., Mori, M., Inoue, H., Mafune, K., Akiyoshi, T. et Sugimachi, K. (1996). Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Gut* **38**, 66-70.
- Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R., Belle, R. et Mulner-Lorillon, O. (1994). CDC2 kinase sets a memory phosphorylation signal on elongation factor EF-1 delta during meiotic cell division, which perdures in early development. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 521-525.

- Minella, O., Mulner-Lorillon, O., De Smedt, V., Hourdez, S., Cormier, P. et Belle, R. (1996a). Major intracellular localization of elongation factor-1. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 805-810.
- Minella, O., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Belle, R. et Cormier, P. (1996b). The guanine-nucleotide-exchange complex (EF-1 beta gamma delta) of elongation factor-1 contains two similar leucine-zipper proteins EF-1 delta, p34 encoded by EF-1 delta(1) and p36 encoded by EF-1 delta(2). *Eur. J. Biochem.* **237**, 685-690.
- Minella, O., Mulner-Lorillon, O., Bec, G., Cormier, P. et Belle, R. (1998). Multiple phosphorylation sites and quaternary organization of guanine-nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1 beta gamma delta /ValRS) control the various functions of EF-1alpha. *Biosci. Rep.* **18**, 119-127.
- Mita K., Morimyo, M., Ito, K., Sugaya, K., Ebihara, K., Hongo, E., Higashi, T., Hirayama, Y., Nakamura, Y. (1997). Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors. *Gene* **187**, 259-266
- Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1109-1149.
- Momoi, H., Yamada, H., Ueguchi, C. et Mizuno, T. (1993). Sequence of a fission yeast gene encoding a protein with extensive homology to eukaryotic elongation factor-1 gamma. *Gene* **134**, 119-122.
- Moore, G.P., Costantini, F.D., Posakony, J.W., Davidson, E.H. et Britten, R.J. (1980). Evolutionary conservation of repetitive sequence expression in sea urchin egg RNA's. *Science* **208**, 1046-1048.
- Moore, K.L. et Kinsey, W.H. (1994). Identification of an Abl-related protein tyrosine kinase in the cortex of the sea urchin egg: Possible role at fertilization. *Dev. Biol.* **164**, 444-455.
- Moore, K.L. et Kinsey, W.H. (1995). Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on egg activation and fertilization-dependent protein tyrosine kinase activity. *Dev. Biol.* **168**, 1-10.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Denis, H. et Belle, R. (1991). Purification and characterization of a germ cell-specific form of elongation factor 1alpha (EF1-alpha) from *Xenopus laevis*. *Biochimie* **73**, 1249-1253.
- Morales, J., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R. et Belle, R. (1992). Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta. *Nucl. Acids Res.* **20**, 4091.
- Morales, J., Bassez, T., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. et Osborne, H.B. (1993). Expression of elongation factor 1alpha (EF1-alpha) and 1betagamma (EF1betagamma) are uncoupled in early *Xenopus* embryos. *Dev. Genet.* **14**, 440-448.
- Moreau, J.L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J.C., Peaucellier, G., Picard, A. et Genevriere, A.M. (1998). Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev. Biol.* **200**, 182-197.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 261-291.
- Motorin, Y.A., Wolfson, A.D., Lohr, D., Orlovsky, A.F. et Gladilin, K.L. (1991). Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 325-331.
- Motoyoshi, K. et Iwawaki, K. (1977). Resolution of the polypeptide chain elongation factor-1 beta gamma into subunits and some properties of the subunits. *J.biochem.* **82**, 703-708.
- Mulner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Poulhe, R. et Belle, R. (1988). Purification and characterization of a casein kinase II type enzyme from *Xenopus laevis* ovary. Biological effects on the meiotic cell division of full-grown oocyte. *Eur. J. Biochem.* **171**, 107-111.
- Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Cormier, P., Labbe, J.-C., Doree, M. et Belle, R. (1989). Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *Febs Lett.* **251**, 219-224.
- Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe, J.-C., Doree, M., Poulhe, R., Osborne, H. et Belle, R. (1990). M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the beta subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur. J. Biochem.* **193**, 529-534.
- Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Cavadore, J.-C., Morales, J., Poulhe, R. et Belle, R. (1992). Phosphorylation of *Xenopus* elongation factor-1 gamma by cdc2 protein kinase : Identification of the

phosphorylation site. *Exp. Cell Res.* **202**, 549-551.

Mulner-Lorillon, O., Minella, O., Cormier, P., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Morales, J., Poulhe, R. et Belle, R. (1994). Elongation factor EF-1 delta, a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 20201-20207.

Munstermann, U., Fritz, G., Seitz, G., Yiping, L., Schneider, H.R. et Issinger, O.G. (1990). Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur. J. Biochem.* **189**, 251-257.

Murakami, K., Ejiri, S. et Katsumata, T. (1978). Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Effect of EF-1beta on EF-1alpha- and ribosome-dependent GTPase activity. *Febs. Lett.* **92**, 255-257.

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

Nakajo, S., Hagiwara, T., Nakaya, K. et Nakamura, Y. (1986). Tissue distribution of casein kinases. *Biochem. Int.* **13**, 701-707.

Narita, H., Ikura, K., Sasaki, R. et Chiba, H. (1979). Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates by 2,3-bisphosphoglycerate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 755-761.

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

Nemer, M. et Infante, A.A. (1965). Messenger RNA in early sea-urchin embryos: size classes. *Science* **150**, 217-221.

Nordnes, S., Krauss, S. et Johansen, T. (1994). cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1 alpha: molecular phylogeny of eukaryotes based on elongation factor-1 alpha protein sequences. *Biochim. Biophys. Acta.* **1219**, 529-532.

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

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

Ohtsuki, K., Matsumoto, M., Saito, H. et Kato, T. (1993). Characterization of casein kinase-II, and of p98 as one of its effective phosphate acceptors in sea urchin eggs. *J. Biochem.* **113**, 334-342.

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

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

Osborne, H.B., Mulner-Lorillon, O., Marot, J. et Belle, R. (1989). Polyamine levels during *Xenopus laevis* oogenesis : a role in oocyte competence to meiotic resumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **158**, 520-526.

Padmanabha, R., Chen-Wu, J.L.P., Hanna, D.E. et Glover, C.V.C. (1990). Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089-4099.

Palen, E., Huang, T.T. et Traugh, J.A. (1990). Comparison of phosphorylation of elongation factor 1 from different species by casein kinase II. *Febs Lett.* **274**, 12-14.

Palen, E. et Traugh, J.A. (1991). Phosphorylation of casein kinase II. *Biochemistry* **30**, 5586-5590.

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

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

Pancetti, F., Bossler, R., Itarte, E. et Bachs, O. (1996). Changes in the activity of nuclear protein kinase CK2 during rat liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 35-39.

- Parisi, E., Filosa, S., de Petrocellis, B. et Monroy, A. (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. *Paracentrotus lividus*. *Dev. Biol.* **65**, 38-49.
- Peaucellier, G., Veno, P.A. et Kinsey W.H. (1988). Protein tyrosine phosphorylation in response to fertilization. *J. Biol. Chem* **263**, 13806-13811.
- Pelech, S.L., Tombes, R.M., Meijer, L. et Krebs, E.G. (1988). Activation of myelin basic protein kinases during echinoderm oocyte maturation and egg fertilization. *Dev. Biol.* **130**, 28-36.
- Pelech, S.L., Sanghera, J.S. et Daya-Makin, M. (1990). Protein kinase cascades in meiotic and mitotic cell cycle control. *Biochem. Cell Biol.* **68**, 1297-1330.
- Pelech, S.L., Sanghera, J.S., Paddon, H.B. Quayle, K.A. et Brownsey, R.W. (1991). Identification of a major maturation-activated acetyl-CoA carboxylase kinase in sea star oocytes as p44mpk. *Biochem. J.* **274**, 759-767.
- Pepperkok, R., Lorenz, P., Jakobi, R., Ansorge, W. et Pyerin, W. (1991). Cell growth stimulation by EGF : Inhibition through antisense-oligodeoxynucleotides demonstrates important role of casein kinase II. *Exp. Cell Res.* **197**, 245-253.
- Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W. et Pyerin, W. (1994). Casein Kinase II Is Required for Transition of G(0)/G(1), Early G(1), and G(1)/S Phases of the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.* **269**, 6986-6991.
- Perez, M., Grande, M. et Itarte, E. (1987). Developmental changes in rat hepatic casein kinases 1 and 2. *Eur. J. Biochem.* **170**, 493-498.
- Perez, M., Grande, J. et Itarte, E. (1988). Casein kinase 2 activity increases in the prereplicative phase of liver regeneration. *Febs Lett.* **238**, 273-276.
- Perez, J.M.J., Siegal, G., Kriek, J., Hard, K., Dijk, J., Canters, G.W. et Moller, W. (1999). The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1 beta reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from *Escherichia coli*. *Structure. Fold.. & Des.* **7**, 217-226.
- Peters, C. et Jeffery, W.R. (1978). Postfertilization poly(A). protein complex formation on sea urchin maternal messenger RNA. *Differentiation* **12**, 91-97.
- Peters, H.I., Chang, Y.W.E. et Traugh, J.A. (1995). Phosphorylation of elongation factor 1(EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity. *Eur. J. Biochem.* **234**, 550-556.
- Philipova, R. et Whitaker, M. (1998). MAP kinase activity increases during mitosis in early sea urchin embryos. *J. Cell Sci.* **111**, 2497-2505.
- Picard, B., Le Maire, M., Wegnez, M. et Denis, H. (1980). Biochemical Research on oogenesis. Composition of the 42-S storage particles of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.* **109**, 359-368.
- Pines, J. et Hunt, T. (1987). Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *EMBO J.* **6**, 2987-2995.
- Pinna, L.A. (1990). Casein kinase 2: an "eminence grise" in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta* **1054**, 267-284.
- Pinna, L.A. et Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. In "Progress in cell cycle research" (L. Meijer, S. Guidet et M. Philippe, Eds.), Vol.3, pp. 77-97. Plenum press, New York.
- Pirollet, F., Feige, J.J., Cochet, C., Job, D. et Chambaz, E.M. (1981). Identification of a specific endogenous inhibitor of a casein kinase (G type) in bovine adrenal cortex as a glycosaminoglycan mixture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 613-620.
- Pistorius, K., Seitz, G., Remberger, K. et Issinger, O.G. (1991). Differential CKII activities in human colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Onkologie* **14**, 256-260.
- Plana, M., Guasch, M.D. et Itarte, E. (1985). Effect of bivalent cations on rat liver cytosol casein (glycogen synthase) kinases 1 and 2. Influence of the protein substrate. *Biochem. J.* **230**, 69-74.
- Plumas-Marty, B., Schoneck, R., Billaut-Mulot, O., Taibi, A., Capron, A. et Ouaiissi, M.A. (1994). Molecular cloning of a *trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous with mammalian elongation factor 1 beta. *Parasitol. Res* **80**, 626-628.

- Posakony, J.W., Flytzanis, C.N., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1983). Interspersed sequence organization and developmental representation of cloned poly(A) RNAs from sea urchin eggs. *J. Mol. Biol.* **167**, 361-389.
- Proud, C.G. (1994). Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 161-170.
- Proud, C.G. et Denton, R.M. (1997). Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem. J.* **328**, 329-341.
- Prowald, K., Fischer, H. et Issinger, O.G. (1984). Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures. *Febs Lett.* **176**, 479-483.
- Raff Ra, Brandis, J.W., Huffman, C.J., Koch, A.L. et Leister, D.E. (1981). Protein synthesis as an early response to fertilization of the sea urchin egg: a model. *Dev. Biol.* **86**, 265-271.
- Ralph, R.K., Darkin-Rattray, S. et Schofield, P. (1990). Growth-related protein kinases. *Bioessays* **12**, 121-124.
- Regier, J.C. et Kafatos, F.C. (1977). Absolute rates of protein synthesis in sea urchins with specific activity measurements of radioactive leucine and leucyl-tRNA. *Dev. Biol.* **57**, 270-283.
- Reynolds, P.J., Angerer, L.M., Palis, J., Nasir, A. and Angerer, R.C. (1992). Early mRNAs, spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one encoding a protein related to tolloid and BMP-1. *Development* **114**, 769-786.
- Richter, J.D. (1996). Dynamics of Poly(A) addition et removal during development. In "Translational Control" (J.W.B. Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, Eds.), Vol., pp. 481-503. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C. et Merrick, W.C. (1990). Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 420-424.
- Rinaldi, A.M. et Monroy, A. (1969). Polyribosome formation and RNA synthesis in the early post-fertilization stages of the sea urchin egg. *Dev. Biol.* **19**, 73-86.
- Rittschof, D. et Traugh, J.A. (1982). Identification of casein kinase II and phosphorylated proteins associated with messenger ribonucleoproteins particles from reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* **123**, 333-336.
- Russo, G.L., Vandenberg, M.T., Yu, I.J., Bae, Y.-S., Franza, B.R.J.R. et Marshak, D.R. (1992). Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* **267**, 20317-20325.
- Sacchi, G.A., Zocchi, G. et Cocucci, S. (1984). Changes in form of elongation factor 1 during germination of wheat seeds. *Eur. J. Biochem.* **139**, 1-4.
- Sacks, D.B. et McDonald, J.M. (1992). Effects of cationic polypeptides on the activity, substrate interaction, and autophosphorylation of casein kinase II : a study with calmodulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 275-280.
- Sanders, J., Maassen, J.A., Amons, R. et Moller, W. (1991). Nucleotide sequence of human elongation factor-1beta cDNA. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4551.
- Sanders, J., Maassen, J.A. et Moller, W. (1992). Elongation factor-1 messenger RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5907-5910.
- Sanders, J., Raggiaschi, R., Morales, J. et Moller, W. (1993). The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1-delta. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**, 87-90.
- Sanders, J., Brandsma, M., Janssen, G.M.C., Dijk, J. et Moller, W. (1996). Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **109**, 1113-1117.
- Sanghera, J.S., Charlton, L.A., Paddon, H.B. et Pelech, S.L. (1992). Purification and characterization of echinoderm casein kinase II - Regulation by protein kinase C. *Biochem. J.* **283**, 829-837.
- Sarisky, V. et Yang, D.C.H. (1991). Co-purification of the aminoacyl-tRNA synthetase complex with the elongation factor eEF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 757-763.
- Schatt, P., Moreau, M. et Guerrier, P. (1983). Variation cyclique de la phosphorylation des protéines and de l'activité MPF pendant la segmentation précoce de l'oeuf d'oursin. *C.R. Acad. Sci. Paris* **296**, 551-554.

- Schneider, H.R., Reichert, G.H. et Issinger, O.G. (1986). Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis : identification of a 110-kDa phosphoprotein as the major phosphorylation product in mouse embryos and Krebs II mouse ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.* **161**, 733-738.
- Schneider, H.R. et Issinger, O.G. (1989). Growth-dependent modulation of casein kinase II and its substrate nucleolin in primary human cell cultures and HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1014**, 98-100.
- Schuel, H. (1978). Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development. *Gamete Res.* **1**, 299-382.
- Seitz, G., Munstermann, U., Schneider, H.R. et Issinger, O.G. (1989). Characterization of casein kinase II in human colonic carcinomas after heterotransplantation into nude mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 635-641.
- Shen, R., Su, Z.Z., Olsson, C.A. et Fisher, P.B. (1995). Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6778-6782.
- Shen, S.S., Kinsey, W.H. et Lee, S.J. (1999). Protein tyrosine kinase-dependent release of intracellular calcium in the sea urchin egg. *Develop. Growth Differ.* **41**, 345-355.
- Sheu, G.T. et Traugh, J.A. (1992). Nucleotide sequence of a rabbit cDNA encoding elongation factor 1-gamma. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5849.
- Sheu, G.T. et Traugh, J.A. (1997). Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in *escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**, 33290-33297.
- Sheu, G.T. et Traugh, J.A. (1999). A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 181-186.
- Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A. et Nishida, E. (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* **266**, 282-285.
- Singh, T.J., Akatsuka, A., Blake, K.R. et Huang, K.P. (1983). Phosphorylation of troponin and myosin light chain by cAMP-independent casein kinase-2 from rabbit skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**, 615-622.
- Slater, I., Gillespie, D. et Slater, D.W. (1973). Cytoplasmic adenylation and processing of maternal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **70**, 406-411.
- Slater, D.W., Slater, I., Gillespie, D.H. et Gillespie, S. (1974). Post-fertilization polyadenylation during transcriptive and translational inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 1222-1228.
- Slobin, L.I. et Moller, W. (1975). Changes in form of elongation factor during development of *Artemia salina*. *Nature* **258**, 452-454.
- Slobin, L.I. et Moller, W. (1976). Characterization of developmentally regulated forms of elongation factor 1 in *Artemia salina*. 1. Purification and structural properties of the enzymes. *Eur. J. Biochem.* **69**, 351-366.
- Slobin, L.I. et Moller, W. (1978). Purification and properties of an elongation factor functionally analogous to bacterial elongation factor Ts from embryos of *Artemia salina*. *Eur. J. Biochem.* **84**, 69-77.
- Snell, V. et Nurse, P. (1994). Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast - A role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* **13**, 2066-2074.
- Sommercorn, J., Mulligan, J.A., Lozeman, F.J. et Krebs, E.G. (1987). Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 8834-8838.
- Song, J.M., Picologlou, S., Grant, C.M., Firoozan, M., Tuite, M.F. et Liebman, S. (1989). Elongation factor EF-1alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **9**, 4571-4575.
- Spirin, A. (1996). Masked et translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes. In "translational control" (J.W.B. Hershey, M.B. Mathews et N. Sonenberg, Eds.), 319-334. CSHL press.
- Sprinzel, M. (1994). Elongation factor Tu: A regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 245-250.

- Standart, N.M., Bray, S.J., George, E.L., Hunt, T., Ruderman, J.V. (1985). The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and Sea urchin eggs. *J. Cell. Biol.* **100**, 1968-1976.
- Su, Z.Z., Goldstein, N.I. et Fisher, P.B. (1998). Antisense inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1764-1769.
- Sulston, J., Du, Z., Thomas, K., Wilson, R., Hillier, L., Staden, R., Halloran, N., Green, P., Thierry-Mieg, J., Qiu, L. et al. (1992). The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning *Nature* **356**, 37-41.
- Sun, Y., Lin, J., Katz, A.E. et Fisher, P.B. (1997). Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res.* **57**, 18-23.
- Suprynowicz, F.A., Prusmack, C. et Whalley, T. (1994). Ca²⁺ triggers premature inactivation of the cdc2 protein kinase in permeabilized sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6176-6180.
- Swann, K. et Whitaker, M.J. (1990). Second messengers at fertilization in sea urchin eggs. *J. Reprod. Fertil.* **42**, 141-153.
- Szyska, R., Grankowski, N., Felczak, K. et Shugar, D. (1995). Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 418-424.
- Taira, H., Kamiie, K., Kakuta, A., Ooura, H., Matsumoto, S., Ejiri, S. et Katsumata, T. (1992). Nucleotide sequence of the cDNA encoding silk gland elongation factor 1beta'. *Nucl. Acids Res.* **20**, 6734.
- Taylor, A., Allende, C.C., Weinmann, R. et Allende, J.E. (1987). The phosphorylation of nucleoplasmin by casein kinase-2 is resistant to heparin inhibition. *Febs Lett.* **226**, 109-114.
- Terui, Y., Tsutsumi, K., Kidou, S., Sawazaki, T., Kuroiwa, Y., Yamaki, M. et Ejiri, S. (1998). A novel variant of translation elongation factor 1 beta: isolation and characterization of the rice gene encoding EF-1beta2. *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 369-372.
- Toen, C., de Herdt, E. et Slegers, H. (1986). Identification of the ribosomal proteins phosphorylated by the ribosome-associated casein kinase type II from cryptobiotic gastrulae of the brine shrimp *Artemia* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 347-354.
- Thompson, R.C. (1988). EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy. *Trends Biol. Sci.* **13**, 91-93.
- Toker, A. et Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673-676.
- Traugh, J.A., Lin, W.-J., Takada-Axelrod, F. et Tuazon, P.T. (1990). Importance of subunit interactions in regulation of casein kinase II. In "The Biology and Medicine of Signal Transduction" (A.L. Nishizuka Y Et, Eds.), 224-229. Raven Press, New York.
- Tuazon, P.T. et Traugh, J.A. (1991). Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein. Res.* **23**, 123-164.
- Tuite, M.F. et Stansfield, I. (1994). Termination of protein synthesis. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 171-181.
- Van Damme, H.T.F., Amons, R., Karssies, R., Timmers, C.J., Janssen, G.M.C. et Moller, W. (1990). Elongation factor 1beta of artemia : localization of functional sites and homology to elongation factor 1delta. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**, 241-247.
- Van Damme, H., Amons, R., Janssen, G. et Moller, W. (1991). Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1betagamma. *Eur. J. Biochem.* **197**, 505-511.
- Van Damme, H.T.F., Amons, R. et Moller, W. (1992). Identification of the sites in the eukaryotic elongation factor 1alfa involved in the binding of elongation factor 1beta and aminoacyl-tRNA. *Eur. J. Biochem.* **207**, 1025-1034.
- Venema, R.C., Peters, H.I. et Traugh, J.A. (1991a). Phosphorylation of valyl-tRNA synthetase and elongation factor 1 in response to phorbol esters is associated with stimulation of both activities. *J. Biol. Chem.* **266**, 11993-11998.

- Venema, R.C., Peters, H.I. et Traugh, J.A. (1991b). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 12574-12580.
- Viel, A., Armand, M.-J., Callen, J.-C., Gomez de Gracia, A., Denis, H. et Le Maire, M. (1990). Elongation factor 1alpha (EF-1alpha) is concentrated in the Balbiani body and accumulates coordinately with the ribosomes during oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **141**, 270-278.
- Von Der Kammer, H., Klaudiny, J., Zimmer, M. et Scheit, K.H. (1991). Human elongation factor 1beta: cDNA and derived amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 312-317.
- Wagenaar EB. (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp. Cell. Res.*, **144**, 393-403.
- Wallace, H.M. (1998). Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 569-571.
- Wang, J.F., Engelsberg, B.N., Johnson, S.W., Witmer, C., Merrick, W.C., Rozmiarek, H. and Billings, P.C. (1997). DNA binding activity of the mammalian translation elongation complex: Recognition of chromium- and transplatin-damaged DNA. *Arch. Toxicol.* **71**, 450-454.
- Whitmarsh, A.J. et Davis, R.J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 481-485.
- Wilson, L.K., Dhillon, N., Thorner, J. et Martin, S. (1997). Casein kinase II catalyzes tyrosin phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.* **272**, 12961-12967.
- Wilt, F.H. (1977). The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell* **11**, 673-681.
- Winkler, M.M., Bruening, G. et Hershey, J.W. (1983). An absolute requirement for the 5' cap structure for mRNA translation in sea urchin eggs. *Eur. J. Biochem.* **137**, 227-232.
- Winkler, M.M., Nelson, E.M., Lashbrook, C. et Hershey, J.W. (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **107**, 290-300.
- Winkler, M.M., Steinhardt, R.A., Grainger, J.L. et Minning, L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature* **287**, 558-560.
- Wintero, A.K., Fredholm, M. et Davies, W. (1996). Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones. *Mamm. Genome* **7**, 509-517.
- Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M. et Jeang, K.T. (1998). Interaction of the second coding exon of tat with human EF-1delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 384-389.
- Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmouvardhane, S. et Condeelis, J. (1990). Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1alpha. *Nature* **347**, 494-496.
- Yang, W., Burkhart, W., Cavallius, J., Merrick, W.C. et Boss, W.F. (1993). Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 392-398.
- Yasuda, G.K. et Schubiger, G. (1992). Temporal regulation in the early embryo: is MBT too good to be true? *Trends Genet.* **8**, 124-127.
- Young, A.V., Hehn, B.M., Sanghera, J.S., Pelech, S.L. et Shah, R.M. (1996). Changes in casein kinase 2 activity during development of the secondary palate in the hamster. *Anat. Rec.* **245**, 724-730.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L. et Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**, 4065-4072.

RESUME

La synthèse protéique est composée de trois phases: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le facteur eEF-1 intervient dans la phase d'élongation de la synthèse protéique. Il est constitué de deux éléments: d'une protéine G: eEF-1A et d'un complexe d'échange de GDP/GTP: eEF-1B. La composition du complexe eEF-1B est différente selon les espèces: eEF-1 β ou eEF-1 γ associé à la valyl-ARNt synthétase chez les animaux et eEF-1 δ chez les végétaux.

Nous avons cloné et séquencé deux ADNc de 2,0 et 2,7 kb codant pour eEF-1 δ chez l'oursin *Sphaerechinus granularis*. Ils codent pour une protéine de 35 kDa identifiée à eEF-1 δ sur trois critères: la présence d'un domaine leucine zipper dans la partie N-terminale, d'un domaine d'échange de GDP/GTP dans la partie C-terminale et son intégration dans un complexe eEF-1 hétérologue.

Les deux ADNc sont identiques dans leurs séquences 5' non codante et codante, ils diffèrent par la longueur de leur région 3'UTR. Leur expression est régulée au cours du développement et suggère la mise en place d'une sélection alternative du site de polyadénylation au cours du développement. L'expression des ARNm codant pour eEF-1 δ est découplée de celle de son partenaire eEF-1A au cours du développement précoce.

L'analyse phylogénétique des séquences des protéines de type eEF-1 β/γ et eEF-1 δ a montré que eEF-1 β et γ étaient des gènes paralogues et que eEF-1 δ provenait de la fusion d'un domaine C-terminal d'un gène ancestral avec un domaine leucine zipper.

Nous avons utilisé la protéine recombinante eEF-1 δ pour étudier la régulation de(s) activité(s) eEF-1 δ kinase(s) au cours du développement précoce. Nous avons montré une activité transitoire eEF-1 δ kinase atteignant son maximum d'activité 24 à 30h après la fécondation. La eEF-1 δ kinase a été identifiée à la CK2, kinase phosphorylant les facteurs d'échange de nucléotides: eEF-1 β et eEF-1 γ . Les inhibiteurs de la CK2 affectent la transition blastula-gastrula, suggérant un rôle de la kinase dans le développement précoce.

La régulation de l'expression de eEF-1 au cours du développement ainsi que la phosphorylation de la protéine par plusieurs protéines kinases (PKA, PKC, CDK1/cycline B, S6 kinase multipotentielle, CK2, U(L)13) laissent présager un rôle d'intégrateur de signaux pour la régulation de l'activité du complexe eEF-1B dont eEF-1 δ est un constituant chez les animaux.