

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	I
TABLE DES MATIERES.....	IV
LISTE DES FIGURES ET TABLES.....	VI
LISTE DES ARTICLES.....	VII
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	VIII
RESUME et MOTS CLES.....	XI
ABSTRACT and KEY WORDS.....	XII
INTRODUCTION	
<u>Avant-propos.....</u>	1
I. Régulation de l'expression des gènes et initiation de la traduction.....	3
A. De l'ARNm à la protéine.....	3
B. l'étape d'initiation de la traduction.....	9
B.1. Les étapes de la traduction.....	9
B.2. L'initiation de la traduction.....	9
B.2.1. L'initiation coiffe dépendante.....	10
B.2.2. L'initiation indépendante de la coiffe.....	13
B.2.3. La régulation de l'initiation.....	16
C. eIF4E et son inhibiteur 4E-BP au centre des régulations.....	24
C.1 eIF4E.....	24
C.1.1. Evolution et caractéristiques.....	24
C.1.2. Structure.....	27
C.1.3. Régulation.....	30
C.2. 4E-BP.....	35
C.2.1. Evolution et caractéristiques.....	35
C.2.2. Régulation.....	37
C.2.3. Structure et zones d'ombres.....	44
D. eIF4E/4E-BP et cancer.....	46
II. eIF4E et ses 4EIPs, un réseau d'interactions complexes dans le contrôle post transcriptionnel de l'expression des gènes.....	49
A. Régulation d'eIF4E par les 4E-IPs dans le cytoplasme.....	52
A.1. 4E-IPs et inhibition de la traduction spécifique de certains ARNm.....	52
A.1.1. Exemple de la Maskin.....	52

A.1.2.Neuroguidin et CYFIP1, deux 4E-IPs impliquées dans des processus de neurogénèse	54
A.1.3. Exemple particulier de Bicoid.....	55
A.2. 4E-IPs et régulation de la dégradation des ARNm.....	57
A.2.1.eIF4E, un rôle dans la séquestration et la stabilisation des ARNm dans le cytoplasme.....	57
A.2.2. 4E-T/Gemin5/DDX3, des 4E-IPs impliquées dans la modulation du rôle d'eIF4E au niveau de la dégradation des ARNm.....	58
A.3. Les complexes multifonctionnels de régulation de la traduction.....	59
 B. 4E-IPs et régulation d'eIF4E dans le noyau.....	63
B.1.Localisation et fonction d'eIF4E dans le noyau.....	63
B.2. 4E-IPs et régulation de l'export des ARNm eIF4E-sensitive.....	67
B.2.1_La protéine à homéodomaine PML, une 4E-IP inhibitrice générale de l'export des ARNm eIF4E-dépendant.....	67
B.2.2. La protéine LRPPRC, une 4E-IP cofacteur d'eIF4E dans l'export des ARNm.....	68
B.2.3. PRH-HOXA9, deux 4E-IPs régulatrices de l'export dépendant d'eIF4E.....	69
 C. eIF4E, un site d'interaction très convoité!.....	71
C.1 YXXXXXL , la clé évolutive pour accéder à eIF4E?.....	71
C.2 4EIPs wanted.....	74
C.3. Effet des 4EIPs sur la liaison à la coiffe.....	74
 <i>Objectifs de la thèse</i>	76

RESULTATS

Chapitre 1: Etudes des relations structure/fonction au cœur des régulations de l'étape d'initiation de la traduction.....	77
A. Analyse structurale du complexe eIF4E/4E-BP.....	77
Article 1.....	80-92
Réflexion sur la nature désordonnée de 4E-BP	93
B. Etude de la relation structure/fonction des trois classes d'eIF4E avec leurs partenaires.....	97
Introduction.....	97
Matériels et méthodes.....	98
Résultats.....	101
Discussion.....	106
 Chapitre 2: Identification et caractérisation d'une nouvelle 4E-IP: Angel1.....	109
A. A la recherche de nouvelles 4E-IPs: découverte de la protéine Angel1 comme nouveau partenaire d'eIF4E.....	109
Article 2	112
B. Caractérisation fonctionnelle d'Angel1	132
Matériels et méthodes.....	137
Résultats préliminaires.....	138
Discussion.....	141
 DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES et CONCLUSION.....	144
 BIBLIOGRAPHIE.....	154

Liste des Figures et Tables

Figure 1: De l'ARNm à la protéine	4
Figure 2: Eléments de structure qui influencent la traduction d'un ARNm	10
Figure 3: L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe	11
Figure 4: Facteurs d'initiations et traduction IRES dépendante des ARN viraux	14
Figure 5: Régulation de l'initiation par la phosphorylation d'eIF2	17
Figure 6: Les deux formes d'eIF4G avec leurs domaines d'interaction et les sites de phosphorylation connus	18
Figure 7: Régulation de la formation du complexe eIF4F par 4E-BP	19
Figure 1: Modèle hypothétique de <i>Gene-silencing</i> par les miR	23
Table 1: Caractéristiques des trois classes d'eIF4E	25
Figure 9: Structure cristallographique d'eIF4E1 lié à la coiffe (a) et d'eIF4E1/peptide 4E-BP1 lié à la coiffe (b)	28
Figure 10: Comparaison de la structure d'eIF4E2 (a) avec la structure d'eIF4E1 (b)	29
Figure 11: Régulation de la phosphorylation d'eIF4E	32
Figure 12: Régulation de la phosphorylation de 4E-BP	39
Table 2: Liste non exhaustive des partenaires d'eIF4E	51
Figure 13: Modèle de la régulation des ARNm contenant un motif CPE lors de la stimulation des oocytes de Xénope par la progestérone	56
Figure 14: Deux modèles envisagés pour la répression de la traduction de <i>caudal</i> par Bicoid dans la partie antérieure de l'embryon de drosophile	58
Figure 15: Modèle de complexe multifonctionnel impliqué dans la régulation de la traduction d'un ARNm	60
Table 3: Exemple de complexes multifonctionnels impliquant des inhibiteurs de la traduction	61
Figure 16: Régulation de la localisation nucléaire d'eIF4E	64

Figure 17: eIF4E bodies et PML bodies colocalisent dans le noyau	65
Figure 18: Modèle récapitulatif de l'export nucléaire par défaut des ARNm et l'export nucléaire des ARNm eIF4E dépendant	69
Figure 19: Divergence dans les modalités d'interaction avec eIF4E: CYFIP1 et protéine Z	73
Figure 20: niveau d'expression des transcrits codant pour les différents eIF4E évalué par microarray (Sp Base)	102
Figure 21: Caractérisation des propriétés d'association des 3 eIF4E avec leurs partenaires	104
Figure 22: Caractérisation de la structure d'eIF4E3	106
Figure 23: Représentation schématique des homologues CCR4a, CCR4b, Angel1 et Angel2 humains	133
Table 4: Tableau récapitulatif des CCR4 et de leurs orthologues au sein des différentes espèces	135
Figure 24: Complexes formés par les CCR4 et autres déadénylases chez la levure et chez les mammifères	136
Figure 25: Caractérisation de l'activité déadénylase d'Angel1	139
Figure 26: Test de traduction in vitro en présence des protéines recombinantes GST-Angel1	140

Liste des Articles

Article 1: Gosselin P., Oulhen N., Jam M., Ronzca J., Cormier P., Czjzek M. and Cosson B. (2011). "The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS." Nucleic Acids Res **39**(8): 3496-3503

Article 2: Gosselin P., Martineau Y., Morales J., Czjzek M., Gauffeny I., Cormier P., Pyronnet S. and Cosson B. (2012). " Tracking a redefined eIF4E-binding motif in protein databases reveals a new partner of eIF4E: the orphan protein Angel1, member of the CCR4 family."(en préparation)

Liste des Abréviations

3' ou **5'UTR** 3' ou 5' UnTranslated Region

4E-BP 4E Binding Protein

4EGI-1 eIF4G/eIF4E Interaction Inhibitor

4E-SE eIF4E Sensitive Element

4E-T eIF4E Transporter

ADN Acide DésoxyriboNucléique

APE Apurinic Endonuclease

ARE Adenine/uridine Rich Elements

ARN Acide RiboNucléique

ARNm ARN messager

ARNt ARN de transfert

ATF4 Activating Transcription Factor 4

ATP Adénosine-5'-Triphosphate

Brat Brain tumor

BRE Bicoid Response Element

CBC Cap-Binding Complex

CBP Cap-Binding Protein

CCR4 Catabolite Carbon Repressor 4

Cdc Cell division complex

CDK1 Cyclin Dependant Kinase 1

CMR1 Chromosome Maintenance Region 1

c-myc Cellular myelocytomatosis oncogene

CPEB Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein

DAP5 Death Associated Protein 5

Dcp Eukaryotic mRNA decapping protein 1

DDR DNA Damage Repair

DDX3 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box 3

Diap1 Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1

eEFs Eukaryotic Elongation Factors

EEP Endonuclease Exonuclease Phosphatase

eIFs Eukaryotic Initiation Factors

eRFs Eukaryotic Release Factors

FMRP Fragile X Mental Retardation Protein

FOXO Forkhead box protein O

FRAP/mTOR FKBP12 Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin

GCN2 General Control Nondepressible 2 kinase

GS Granules de Stress

GTP Guanosine Triphosphate

HOXA9 Homeobox Protein A9

HRI Heme-Regulated Inhibitor Kinase

HD Homeodomaine

IDP Intrinsically Disordered Protein

IRE Iron-Responsive Element

IRES Internal Ribosome Entry Site

IRP Iron Regulatory Protein

ITAF IRES Trans Acting Factor

ITC Isothermal titration calorimetry

LRR Leucine Reach Repeat

m⁷GTP 7-methyl Guanosine Tri-Phosphate

MAPK/Erk Mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinase

MEK Map/Erk Kinase

MEKK MEK Kinase

Met-ARNT Méthionyl-ARNT

miRNA micro ARN

Mnk1 Mitogen-activated protein kinase-interacting kinase 1

mRNP messenger RiboNucleoProtein

mTORC mTOR complex

NF-κB Nuclear Factor-kappa B

NMD Non-sense Mediated Decay

NGD Neuroguidin

NPC Nuclear Pore Complex

NRE Nanos Response Element

ODC Ornithine Decarboxylase
ORF Open Reading Frame
PABP PolyA Binding Protein
PAIP PABP Interacting Proteins
PAK2 p21 Activated Protein Kinase 2
P-Bodies Processing Bodies
PCRq PCR quantitative
Pcd4 Programmed cell death protein 4
PI3K Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PKA Protein Kinase A
PKC Protein Kinase C
PKR Protein Kinase R
Poly(A) Poly Adénine
PP2A Protein Phosphatase 2A
PRH Proline Rich Homeodomaine
PML Promyelotic Leukemia Protein
Raptor Regulatory associated protein of mTOR
RBPs RNA Binding Proteins
RISC RNA-induced silencing complexes
RRL Rabbit Reticulocyte Lysate
shRNA small hairpin RiboNucleic Acid
siRNA small interference RiboNucleic Acid
SMN Survival Motoneuron Complex
SPR Surface Plasmon Resonance
TLKB1 Tousled-like kinase 1B
TOS mTor Signalling
Trx Thioredoxin
uORF Upstream Open Reading Frame
USER Untranslated Sequence Element for Regulation
U1 snRNA U1 small nuclear RiboNucleic Acid
UV Ultraviolet
VEGF Vascular endothelial growth factor

Résumé

Le contrôle traductionnel est une étape critique de la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement embryonnaire et de nombreux processus cellulaires comme la croissance et la prolifération. Au cours de l'étape d'initiation, étape clé dans la régulation traductionnelle, le facteur eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) fixe la coiffe m⁷GTP des ARNm et recrute la protéine eIF4G pour former le complexe d'initiation. L'interaction eIF4E/eIF4G est inhibée de manière compétitive par le répresseur général de la traduction 4E-BP, qui partage avec eIF4G un motif consensus de liaison à eIF4E. Au cours de l'évolution des eucaryotes, de nouveaux partenaires d'eIF4E (4E-Interacting Partners, 4E-IPs) portant un motif similaire sont apparus, diversifiant les mécanismes de régulation d'eIF4E sur différents niveaux.

Dans une première partie de ma thèse, je me suis concentrée sur le répresseur traductionnel 4E-BP. Longtemps considérée comme une protéine complètement désordonnée, nous avons montré que 4E-BP adopte en réalité une conformation repliée lorsqu'il se lie à eIF4E. Cette conformation permet l'établissement de contacts dynamiques, en plus de la liaison établie entre son motif d'interaction et la surface dorsale convexe d'eIF4E. Ces résultats, couplés à d'autres études très récentes, apportent un nouveau regard sur les interactions qui s'établissent entre eIF4E et ses partenaires, suggérant que si l'interaction directe avec la surface dorsale d'eIF4E est nécessaire, d'autres contacts sont importants dans la formation de ces complexes et sont déterminants pour la compétition entre les différents partenaires d'eIF4E.

Mon travail de thèse a également permis l'établissement d'un nouveau criblage des 4E-IPs, basé sur une approche combinatoire alliant analyses structurales, bioinformatiques et biochimiques. Parmi les 4E-IPs détectées, nous avons caractérisé la protéine Angel1 qui appartient à une famille de déadénylases, protéines impliquées dans la régulation de la longueur de la queue poly(A) des ARNm. Notre étude a apporté la preuve qu'Angel1 est un nouveau partenaire d'eIF4E et l'ensemble de nos données suggère qu'Angel1 est impliquée dans la régulation d'ARNm spécifiques. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour caractériser le rôle d'Angel1 sur le métabolisme des messagers et leur traduction.

Considéré dans son ensemble, ce travail ouvre de nombreuses perspectives pour la compréhension des régulations traductionnelles qui prennent pour cible moléculaire eIF4E et met l'accent sur l'importance des études structurales pour le développement de nouvelles thérapies, notamment celles développées dans le cadre des cancers.

MOTS CLES: Régulation traductionnelle, eIF4E, cible moléculaire, 4E-IPs, analyse structurale, ARNm.

Abstract

Structural and functional analyses of the interactions between eIF4E and its partners.

The control of mRNA translation is a complex process that is critical for gene expression during development and many physiological processes such as cell growth and proliferation. The recruitment of the initiation complex to the cap structure of the mRNA by the eukaryotic Initiation Factor 4E is often the rate-limiting step and the major site of control of protein synthesis. Initiation complex formation, triggered by the interaction between eIF4E and eIF4G, is regulated by the small general translational repressor 4E-BP, which share with eIF4G a similar eIF4E-binding motif. In eukaryotes, new eIF4E-interacting partners (4E-IP) appeared independently through evolution, using a similar eIF4E-binding motif to compete for eIF4E and modulate its functions at different levels.

In the first part of my thesis, we focused on the translational repressor 4E-BP. Commonly, 4E-BP is described as a completely disordered protein, even in its eIF4E-bound state. In the present work, we show that 4E-BP adopts in fact a folded structure when it interacts with eIF4E, strengthening its binding by establishing fuzzy and dynamic contacts and involving a binding footprint of 4E-BP larger than the convex dorsal surface of eIF4E. These results, associated with recent studies, bring new insight into the mechanisms involved in the interaction between eIF4E and its partners. It suggests strongly that even if the interaction with the convex dorsal surface of eIF4E is necessary, other contacts are important to form the complex and to compete with other partners.

During my thesis, we also developed a new combinatorial approach based on structural, *in silico* and biochemical analyses to find novel 4E-IPs. We characterized one of the putative 4E-IPs obtained with this approach: Angel1, an orphan protein belonging to a family of deadenylases. Our study proved for the first time that Angel1 is a new partner of eIF4E. Taken together, our results suggest that Angel1 is involved in the regulation of specific mRNAs. Further investigations regarding the role of Angel1 on mRNA metabolism and translation will be required to understand the biological function of the protein.

All together, our results allowed us to discuss new perspectives in term of translational regulations that target eIF4E and to emphasize the role of structural studies to develop new therapies, particularly in cancer treatments.

KEY WORDS: Translational regulation, eIF4E, molecular target, 4E-IPs, structural analysis, mRNA.

Avant propos :

La régulation de l'expression des gènes a longtemps été considérée comme étant un mécanisme entièrement contrôlé par la transcription. Depuis le début des années 1990, de nouvelles méthodes d'analyses ont permis de révéler que la coordination globale de l'expression des gènes dépendait largement des évènements post-transcriptionnels, notamment au niveau de la traduction (Schwanhausser et al., 2011). La régulation des mécanismes traductionnels, qui se fait majoritairement lors de l'étape d'initiation, se présente comme une étape cruciale dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans de grandes fonctions cellulaires, telles que le cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération, ou encore, au cours du développement embryonnaire.

Chez la plupart des eucaryotes, la majorité des ARNm possède en 5' une structure particulière appelée coiffe, correspondant à une 7-méthylguanosine triphosphate (m7GpppN), qui est reconnue par le facteur d'initiation de la traduction : eIF4E. La reconnaissance de la coiffe et le recrutement du complexe d'initiation par eIF4E sont des étapes clés au cours de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, et sont la cible de multiples régulations, notamment par l'intervention de nombreux partenaires d'eIF4E. Depuis une trentaine d'années, la protéine eIF4E a suscité un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique et des efforts considérables ont été faits pour élucider la fonction de cette protéine clé. Depuis la mise en évidence de son fort potentiel oncogénique (Rousseau et al., 1996b), les études biochimiques et biophysiques se sont multipliées afin d'identifier les modulateurs intracellulaires d'eIF4E mais aussi de découvrir les caractéristiques structurales de ce facteur. Cependant, il reste de nombreuses zones d'ombres dans la compréhension des régulations fines qui s'exercent sur eIF4E dans la cellule et sur la caractérisation structurale des interactions entre eIF4E et ses partenaires.

Pour cibler ces lacunes, j'ai tenu à faire le point dans la première partie de mon introduction sur les connaissances actuelles des régulations traductionnelles, en essayant de me placer, quand il était possible, dans un contexte évolutif. (i) J'ai tout d'abord brièvement rappelé les différentes étapes du contrôle post-transcriptionnel. (ii) J'ai ensuite mis l'accent sur la régulation de l'étape d'initiation de la traduction afin de montrer la diversité et la complexité du contrôle traductionnel mis en œuvre au cours de cette étape. Dans ce contexte, (iii) je me suis particulièrement concentrée sur deux acteurs : le facteur

eIF4E et son répresseur général 4E-BP, en abordant à la fois l'aspect régulation mais aussi l'aspect structure, qui soulève encore certaines questions bien qu'il soit à la base de la régulation des associations entre eIF4E et ses différents partenaires.

Dans la deuxième partie de mon introduction, je présente les divers partenaires d'eIF4E et la régulation des fonctions d'eIF4E mise en jeu lors de ces interactions dans le cytoplasme ou dans le noyau. Cette partie permet de faire le point sur les connaissances actuelles au niveau de ces régulations, qui seront par la suite nécessaires pour évaluer le rôle du nouveau partenaire d'eIF4E que nous avons mis en évidence au cours de cette thèse.

Les données expérimentales obtenues au cours de mon travail de thèse sont ensuite présentées sous forme de deux chapitres. Le premier chapitre présente l'étude des relations structures/fonctions établies au niveau des régulations traductionnelles. Le premier article fournit pour la première fois une vision complète du complexe eIF4E/4E-BP, montrant que 4E-BP se structure quand il interagit avec eIF4E et que la liaison de 4E-BP sur eIF4E ne se réduit pas seulement à l'interaction entre la surface dorsale convexe d'eIF4E et le motif d'interaction sur 4E-BP. En complément à cette étude, nous avons obtenu des données préliminaires permettant d'aborder les différences structurales entre les formes d'eIF4E, qui pourraient expliquer leur capacité différente à interagir avec leurs partenaires eIF4G et 4E-BP. Le deuxième chapitre de mes résultats présente la mise en évidence et la caractérisation d'un nouveau partenaire d'eIF4E, apparenté à une famille de déadénylases. Ce deuxième article fournit la preuve que la protéine Angel1, dont la fonction est inconnue, est un partenaire d'eIF4E et ouvre de nombreuses pistes d'investigation pour découvrir le rôle d'Angel1 dans la cellule.

L'ensemble de ces résultats originaux donne une nouvelle vision de l'association entre eIF4E et ses partenaires, revisitant le modèle d'interaction clé/serrure généralement admis. Ils amènent également de nombreuses perspectives quant à la compréhension des régulations fines exercées sur eIF4E et le placent au centre d'un véritable réseau de modulateurs moléculaires.

I. Régulation de l'expression des gènes et initiation de la traduction, un rôle central pour eIF4E

A. De l'ARNm à la protéine : les régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes

Il y a près de 3,8 milliards d'années, les premiers organismes unicellulaires sont apparus sur la terre sous la forme de cellules procaryotes, alors composées d'un cytoplasme et de molécules d'ARN ou d'ADN (encore discuté) comme seul support de l'information génétique indispensable à l'expression des caractères du vivant.

Au cours de l'évolution, les cellules se sont complexifiées, faisant l'acquisition d'un noyau qui permet d'isoler l'information génétique du reste de la cellule, caractéristique majeure des cellules eucaryotes. L'ADN contenu dans le noyau est divisé en unités de lecture appelées gènes qui codent pour les caractères de l'organisme qui les contient.

L'apparition d'organismes pluricellulaires a ensuite nécessité la mise en place de mécanismes de plus en plus complexes pour réguler l'expression des gènes, puisque toutes les cellules d'un même organisme possèdent un génome identique, mais n'expriment pas les mêmes gènes au même moment ou au même endroit. La transcription, c'est-à-dire le passage de l'ADN en ARN, a longtemps été considérée comme le mécanisme majeur de régulation de l'expression des gènes, ce qui est le cas chez les procaryotes. Mais depuis la fin des années 1990, un grand nombre d'études a montré chez les eucaryotes qu'une large partie des régulations de l'expression des gènes opère en réalité après la transcription des ARNm (Moore, 2005; Halbeisen et al., 2008), (Keene, 2010), complexifiant le schéma classique de la régulation des gènes : "l'ADN est transcrit en ARN qui est traduit en protéine".

Les régulations post-transcriptionnelles peuvent s'effectuer au cours de nombreuses étapes telles que la maturation des ARNm, le transport nucléocytoplasmique, l'efficacité de la traduction, la stabilité du transcrit, les modifications post-traductionnelles ou encore le *turnover* des protéines (Figure 1).

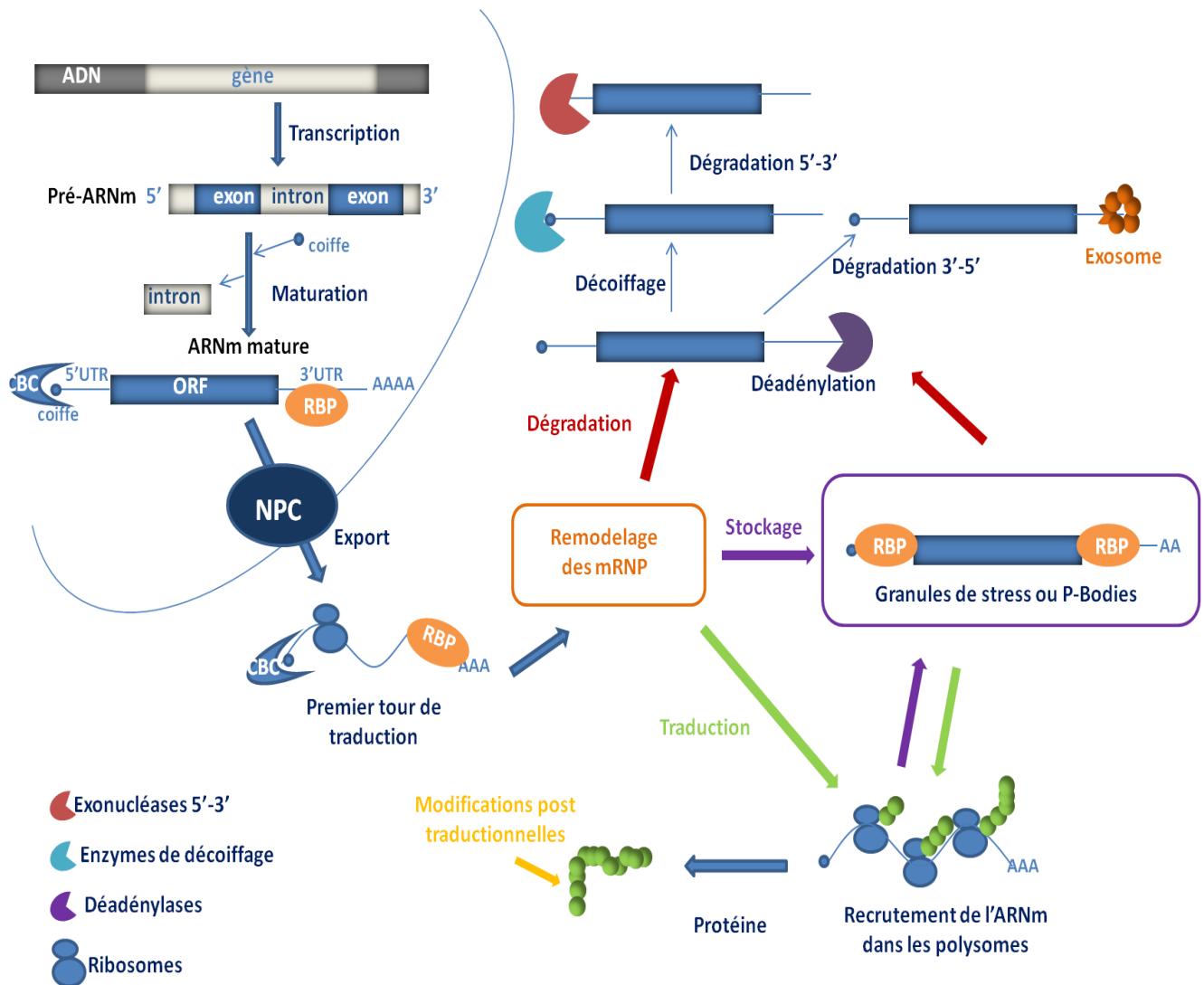


Figure 1 : De l'ARNm à la protéine.

Les gènes sont transcrits dans le noyau pour donner un pré-ARNm composé d'exons et d'introns. L'ARN est mûr par ajout d'une coiffe et d'une queue poly(A) et par épissage (élimination des introns). La coiffe est liée par le CBC (Cap Binding Complex), ce qui permet l'export de l'ARNm dans le cytoplasme par les NPC (Nuclear Pore Complex). Chez les mammifères, les ARNm vont subir un premier tour de traduction important pour le contrôle de leur qualité. Le devenir de l'ARNm est ensuite guidé par les RBPs (RNA binding proteins) qui sont liés en 3' et en 5'UTR de l'ARNm, formant un complexe mRNP (messenger Ribonucleoprotein). Dans le cytoplasme, les mRNP peuvent être recrutés dans les polysomes pour la synthèse protéique, dirigés vers les granules ARN (Processing bodies, Stress granules) pour être stockés, ou bien dégradés par différents procédés. Les protéines synthétisées peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Pour plus d'information, se reporter au texte ci-dessous.

La transcription est effectuée au niveau du noyau par un grand nombre de facteurs de transcriptions, d'enzymes ARN polymérasées et autres acteurs (Remenyi et al., 2004). L'ARNm, une fois synthétisé, va passer par plusieurs étapes de maturation nucléaire avant d'être traduit en protéines :

- Chez les eucaryotes, l'extrémité 5' des transcrits va être coiffée d'une guanosine méthylée (coiffe ou m⁷GTP) pendant que l'ARN polymérase II continue leur élongation (Gu and Lima, 2005). La liaison de la coiffe, par des protéines telles que le complexe CBC (cap binding complex, composé de CBP80 et CBP20) ou le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, est cruciale pour protéger les ARNm d'une dégradation par les exonucléases 5'-3' présentes dans le noyau et dans le cytoplasme.
- Les introns des pré-ARNm (régions non codantes) sont ensuite excisés par l'étape d'épissage (Wang and Burge, 2008).
- L'extrémité 3' est allongée par l'ajout d'une queue poly (A) (Gilmartin, 2005). Cette étape de maturation nucléaire est considérée comme une modification appliquée par défaut pour la plupart des ARNm, excepté les ARNm codant pour les histones, qui sont clivés en 3'UTR mais non polyadénylés (Gilmartin, 2005). La longueur de la queue poly(A) des ARNm pourra ensuite être modifiée dans le cytoplasme, ce qui permet de distinguer une polyadénylation nucléaire et cytoplasmique (Zhang et al., 2010).

Une fois mûr, l'ARNm est pris en charge par des RBP (RNA Binding Protein) pour être exporté vers le cytoplasme. Les RBP sont des protéines qui lient l'ARNm et forment des complexes mRNP (messenger RiboNucleoProtein) de manière stable ou transitoire. En fonction de leur identité, elles lient des structures communes, ou éléments cis, tels que la coiffe et la queue poly(A), ou des motifs spécifiques que l'on retrouve dans les régions non codantes en 5' ou 3'UTR (untranslated regions) de l'ARNm. Ces motifs sont des séquences nucléotidiques spécifiques reconnues par des RBPs qui vont contrôler la stabilité, la traduction, et la dégradation des ARNm qui les portent.

Les mRNPs vont dicter la destinée de l'ARNm dans la cellule. La disponibilité d'un messager et son recrutement au niveau de la machinerie de traduction dépend de sa séquence nucléotidique, et par là même, des RBPs avec lesquelles il se lie (Moore, 2005). Une fois l'ARNm dans le cytoplasme, les RBPs peuvent agir sur différents paramètres (Abaza and Gebauer, 2008):

1. "The pioneer round of translation" : Chez les mammifères, la plupart des ARNm nouvellement synthétisés sont d'abord soumis à un premier tour de traduction, important pour le contrôle de la qualité des messagers. Ce processus est initié par le complexe protéique CBC qui se fixe sur la coiffe dès que celle-ci est ajoutée sur l'ARNm dans le noyau (Isken and Maquat, 2008; Maquat et al., 2010). Ce premier tour de traduction va permettre notamment la vérification de la qualité de l'ARNm et, dans le cas échéant, la dégradation des ARNm qui portent un codon stop prématué (Nonsense mediated RNA decay (NMD)).
2. La stabilité et la dégradation des ARNm : L'équilibre polyadénylation/déadénylation cytoplasmique va jouer un rôle important dans le métabolisme des ARNm (Zhang et al., 2010). Dans le cytoplasme, la stabilité des messagers, mais aussi leur traduction, peuvent être régulées par l'ajout d'une queue poly(A) plus longue (Richter, 1999). Des exemples de régulation de la traduction de messagers spécifiques par polyadénylation/déadénylation seront abordés dans la partie (II.A) de cette introduction. La dégradation des ARNm peut se faire par le recrutement de protéines de décoiffage, de déadénylases, d'exonucléases, d'acteurs du RNA *silencing* ou de l'exosome. L'exosome est un complexe protéique capable de dégrader les acides ribonucléiques au niveau du cytoplasme, du noyau et du nucléole. L'ensemble de ces mécanismes participe au *turnover* des ARNm, à la régulation de leur demi-vie, mais aussi à la régulation spécifique de l'expression des gènes dans des conditions de stress ou dans des processus développementaux. Il est intéressant de noter qu'il existe également des mécanismes de polyadénylation/déadénylation et de dégradation des ARNm par l'exosome dans le noyau, impliqués dans la surveillance des ARN et dans la réponse de dommage à l'ADN : DDR (DNA Damage Response) (revue (Zhang et al., 2010)).
3. La localisation spécifique des ARNm : ce procédé va réguler à la fois le moment et le lieu où l'ARNm est traduit. La localisation de l'ARNm peut se faire par association du messager au cytosquelette comme dans l'embryon de drosophile, où l'ARNm *nanos* est transporté au pôle postérieur de l'œuf associé au cytosquelette par l'intermédiaire d'un motif spécifique qu'il porte en 3'UTR (Gavis et al., 1996). La localisation subcellulaire spécifique joue un rôle important au niveau des processus de *patterning* des embryons, mais peut aussi participer à des mécanismes de traduction localisée pour répondre à des besoins cellulaires spécifiques. Il existe par exemple des points de traduction active dans l'extrémité des prolongements cytoplasmiques des fibroblastes, au niveau desquels pourraient se trouver des ARNm spécifiques codant pour des facteurs impliqués dans la motilité ou la polarité cellulaire

(Willett et al., 2011). Ce type de traduction localisée d'ARNm spécifiques se retrouve également au niveau des synapses des neurones (Jung et al., 2006). De plus, les RBP peuvent participer à la séquestration de l'ARNm dans des structures cytoplasmiques, au niveau desquelles les ARNm sont dégradés, comme dans les P-bodies (Processing Bodies), ou stocker en attente de leur dégradation ou de leur traduction comme dans les Granules de Stress (GS).

4. La traduction : la régulation se fait en inhibant ou en augmentant le recrutement des ARNm dans les polysomes. L'activité de la machinerie traductionnelle joue un rôle crucial au niveau des régulations post-transcriptionnelles et se présente comme le centre d'intérêt de ma thèse. Les mécanismes mis en œuvre au cours de cette étape seront plus longuement détaillés dans le chapitre suivant.

Les protéines, synthétisées à partir de l'ARNm, pourront subir ensuite toute une série de modifications post traductionnelles qui régulent leur conformation et leur activité enzymatique le cas échéant, leur localisation, leurs partenaires ou leur temps de vie. L'ensemble de ces mécanismes régule également l'expression des gènes mais ne seront pas ou très peu abordés dans cette thèse, seulement dans le cadre de modifications spécifiques qui contrôlent les mécanismes de traduction.

Quel est l'intérêt de ces modifications post-transcriptionnelles ?

En terme énergétique, transcrire un gène sans traduire l'ARNm présente un coût pour la cellule. Cependant, la régulation post-transcriptionnelle présente l'énorme avantage de pouvoir fabriquer une protéine, ou inversement, d'interrompre la production de la protéine ou de l'éliminer, à un endroit donné et à un moment donné. Il est par exemple estimé chez la levure que la durée totale nécessaire à l'expression d'un gène codant une protéine ribosomale est de cent minutes (Warner, 1999). Disposer d'ARNm prêts à être traduits permet à la cellule de répondre à des besoins rapides, sans avoir à modifier le programme de transcription des gènes. Inversement, dans certaines conditions de stress, la cellule peut interrompre la production des protéines très rapidement, ce qui lui permet d'économiser une quantité d'énergie importante consommée par les mécanismes de traduction. En effet, la traduction et la fabrication des ribosomes représentent la plus grande dépense énergétique de la cellule (Warner, 1999). Joblin et collab. ont suggéré que le coût moyen de la synthèse protéique serait d'environ 70 à 100 mmol d'ATP par gramme de protéines (Jobling, 1985), ce qui

signifie, selon Fraser et Rogers, que 98% des coûts de production dans un organisme sont occasionnés par la synthèse protéique (Fraser and Rogers, 2007). Ainsi, la capacité à gérer le coût énergétique induit par la traduction va influencer la survie de la cellule ou de l'organisme en condition de stress. En réponse à la plupart des stress, le niveau global de traduction est inhibé, permettant ainsi à la cellule d'économiser de l'énergie (Lopez-Maury et al., 2008). De plus, la traduction de certains ARNm aboutissant à la synthèse de protéines spécifiques est induite afin de favoriser la réponse au stress. Cette régulation traductionnelle est réversible, mais aussi rapide et parfois spatiale, ce qui présente un avantage important dans le cadre de la plasticité cellulaire.

Les facteurs de traduction ont longtemps été considérés comme des facteurs de ménages. Depuis les années 1990, les recherches dans de multiples disciplines ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de la régulation traductionnelle dans de nombreux processus impliqués dans le cycle cellulaire (revue (Kronja and Orr-Weaver, 2011)), l'apoptose (Clemens, 2001), le développement et la différenciation cellulaire (revue (Sonenberg and Hinnebusch, 2009)), la plasticité synaptique et la mémoire (Kelleher et al., 2004), le vieillissement (Petroulakis et al., 2009) ou encore l'apparition de maladies (Clemens and Bommer, 1999). Au regard de l'importance des mécanismes de régulation traductionnelle, les facteurs de traduction présentent en réalité un intérêt majeur pour la compréhension de la régulation de l'expression des gènes.

Si les différentes étapes de la synthèse protéique, initiation, élongation et terminaison, sont susceptibles d'être contrôlées, l'initiation de la traduction est reconnue comme étant l'une des étapes majoritairement régulées. Le travail réalisé au cours de cette thèse s'est focalisé sur les facteurs d'initiations et principalement sur le facteur eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E). Dans la première partie de cette introduction, seront détaillés l'étape d'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes, les différents facteurs impliqués et les mécanismes de régulations qui entrent en jeu.

B. l'étape d'initiation de la traduction

B.1. Les étapes de la traduction

La traduction permet le passage de l'ARNm en protéine par la traduction du code génétique contenu dans l'ARNm en acides aminés, dont l'enchaînement va constituer la protéine. La traduction s'effectue en 3 étapes :

- l'initiation, qui correspond au recrutement du ribosome sur l'ARNm. C'est l'étape limitante de la traduction. La sous-unité 40S du ribosome, plusieurs facteurs d'initiation eIFs (eukaryotic Initiation Factors) et l'ARNt initiateur portant la méthionine sont recrutés en 5' de l'ARNm pour former le complexe de pré-initiation. Ce complexe se déplace jusqu'au codon start AUG où la sous-unité 60S vient rejoindre le 40S pour former le ribosome.
- l'elongation correspond ensuite à l'ajout des acides aminés à la suite de la méthionine initiatrice. Elle est catalysée par les facteurs d'elongations eEF1 et eEF2 (eukaryotic Elongation Factors).
- la terminaison, qui se fait lors de la reconnaissance d'un codon stop sur l'ARNm par les facteurs de terminaison, eRF1 et eRF3 (eukaryotic Releasing Factors), entraînant le relargage des différents acteurs de la traduction, une dissociation des sous-unités ribosomales et une libération de la chaîne peptidique nouvellement synthétisée.

B.2. L'initiation de la traduction

L'initiation chez les eucaryotes est une étape très complexe assistée par plus de 25 protéines ((Hershey, 2000), (Pestova et al., 2001), (Preiss and Hentze, 2003)). Cette étape permet le recrutement de l'ARNm et la spécification de sa phase de lecture (ORF-Open Reading Frame).

La structure et les séquences régulatrices de l'ARNm vont influencer l'initiation de leur traduction (Gebauer and Hentze, 2004) (figure 2). Il existe deux types d'initiation chez les eucaryotes :

- La traduction dépendante de la coiffe, retrouvée majoritairement chez les eucaryotes.
- La traduction indépendante de la coiffe, régulée par les structures en 5' telles que les IRES (Internal Ribosomes Entry Sequences).

Les séquences uORF (upstream open reading frame) peuvent jouer le rôle de régulateur négatif en réduisant la traduction de l'ORF (open reading frame) principale. Les structures en épingle à cheveux (hairpin) en 5'UTR vont bloquer l'initiation de la traduction coiffe-dépendante, mais peuvent aussi favoriser la traduction indépendante de la coiffe. Ces mécanismes ne seront pas plus détaillés du fait qu'ils dépassent le domaine d'expertise de cette thèse.

L'ARNm porte également des éléments régulateurs cis contenus dans la séquence des régions 3' et 5' UTR, pouvant être reconnus par des RBP qui modulent spécifiquement la traduction (ce mécanisme sera détaillé dans I.B.2.3).

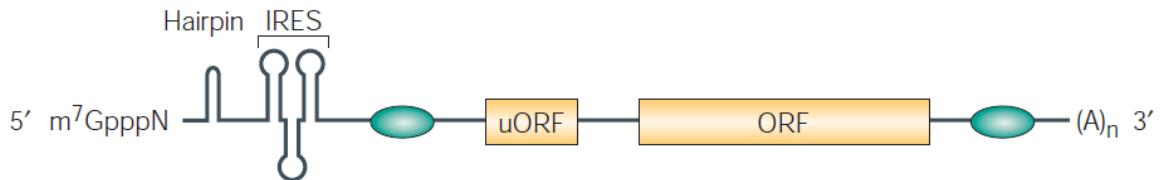


Figure 2 : Éléments de structure qui influencent la traduction d'un ARNm (Gebauer and Hentze, 2004)

La coiffe m^7GpppN et la queue poly (A) favorisent la traduction coiffe dépendante. uORF (upstream open reading frame) et hairpin réduisent la traduction coiffe-dépendante. Les IRES permettent l'initiation de la traduction de manière indépendante à la coiffe. Les éléments cis dans les régions non codantes sont symbolisés par les ronds verts.

B.2.1 L'initiation coiffe dépendante

les étapes de l'initiation :

Chez les eucaryotes, la majorité des ARNm sont traduits de manière dépendante de la coiffe (von der Haar et al., 2004). La coiffe se compose d'une guanosine méthylée en position N7 reliée au premier nucléotide transcrit par une liaison 5'-5' triphosphate. La synthèse de la coiffe se fait de manière co-transcriptionnelle et implique plusieurs enzymes. Cette structure en 5' UTR est essentielle pour la stabilisation et la protection des ARNm mais aussi pour l'export nucléaire de ces derniers. L'interaction de la coiffe m^7GTP avec les facteurs d'initiation eIFs permet le recrutement du ribosome en 5'UTR des ARNm. L'initiation déroule en plusieurs étapes (Figure 3):

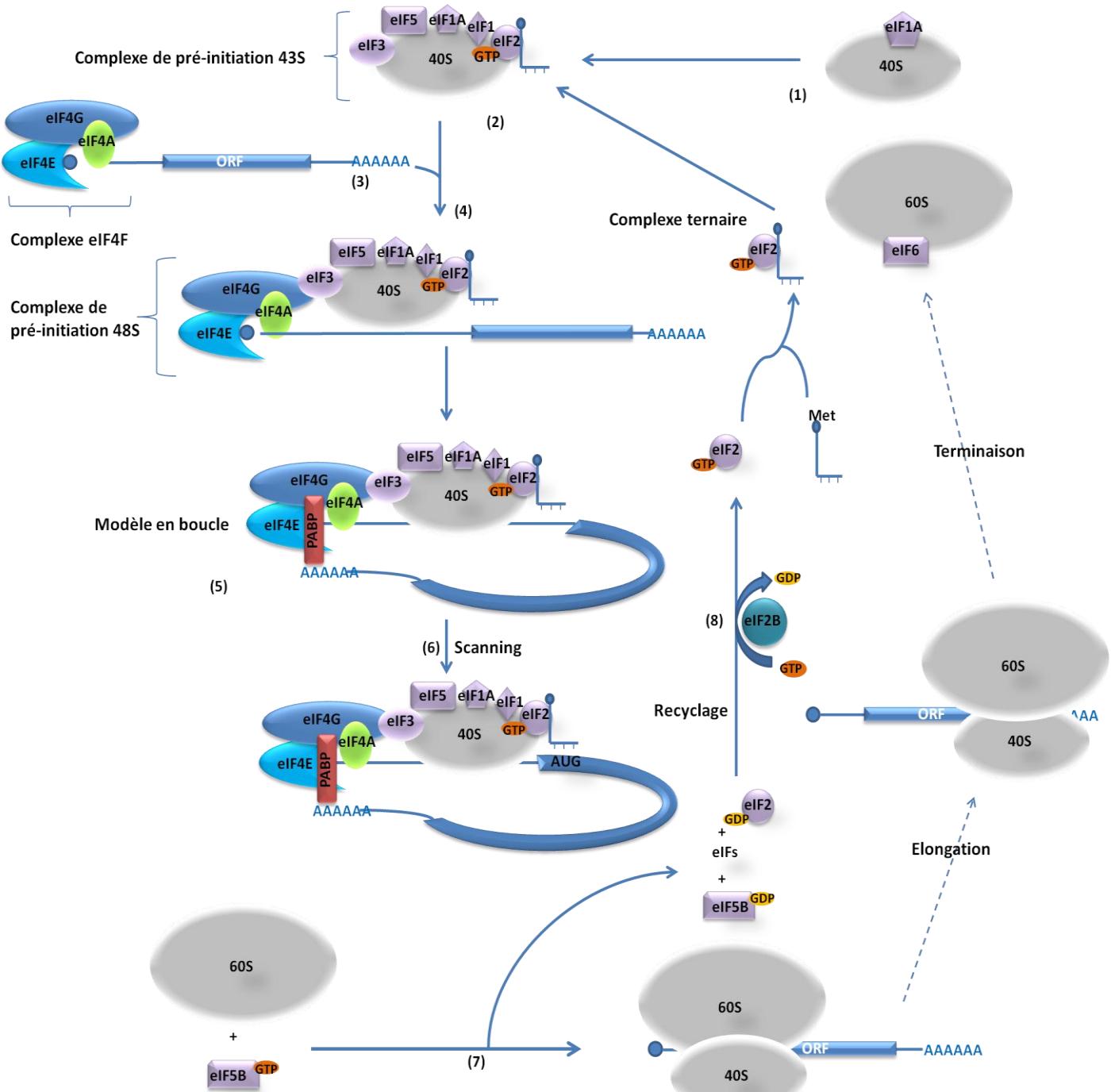


Figure 3 : L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe.

(1) Le facteur eIF1A permet la séparation des 2 sous-unités ribosomales et eIF6 empêche leur réassocation. La sous-unité ribosomale 40 S s'associe aux facteurs eIF1, eIF3, eIF5, eIF1A, puis au complexe ternaire composé par eIF2, GTP et Methionyl-ARNt pour former le 43S (2). Le complexe eIF4F (eIF4E/eIF4G/eIF4A) se forme indépendamment sur la coiffe de l'ARNm (3), puis recrute le complexe 43 S pour donner le complexe de pré-initiation 48 S (4). PABP permet la circularisation de l'ARNm puisqu'elle lie eIF4G et la queue poly(A) (5). Dans cette configuration, la sous-unité ribosomale 40 S va scanner l'ARNm dans le sens 5'- 3' (6). Lors de la reconnaissance du codon initiateur AUG, les facteurs d'initiation sont relargués et

eIF5B lié au GTP intervient pour permettre à la sous-unité 60 S de se fixer sur l'ARNm et former le ribosome (7). L'étape d'elongation peut alors commencer. Une fois le cadre de lecture (ORF) traduit, le ribosome est dissocié pendant l'étape de terminaison. Le recyclage de tous les acteurs impliqués dans la traduction permettra l'entrée dans un nouveau cycle de traduction (8).

(1) Pour commencer, les deux sous-unités du ribosome doivent être séparées. En fin d'elongation, le facteur eIF1A, associé au 40S, participe à la dissociation des deux sous-unités 40S et 60S. Le facteur eIF6 se lie à la sous-unité 60S dans le cytoplasme et inhibe l'association des deux sous-unités.

Les facteurs eIF1, eIF2 sous forme de complexe ternaire avec le GTP et l'ARNt initiateur portant la méthionine, eIF3 et eIF5 ensuite s'associent à la petite sous-unité 40S du ribosome (2). Les protéines eIF1 et eIF1A vont faciliter le recrutement des autres facteurs et promouvoir le changement de conformation de la sous-unité 40S, permettant le scan de l'ARNm jusqu'au codon initiateur AUG (Passmore et al., 2007). L'ensemble de ces facteurs et la sous-unité 40S forment le complexe de préinitiation 43S.

Indépendamment de la formation du complexe de préinitiation 43S, le facteur eIF4E se lie sur la coiffe des ARNm (Sonenberg et al., 1978) et recrute eIF4G (3), une grosse protéine plateforme qui à son tour recrute eIF3 et eIF4A, une ARN hélicase qui permet le déroulement des structures secondaires comme les hairpins en 5' des ARNm et facilite le déplacement du 40S jusqu'au codon de départ. L'activité hélicase peut être stimulée par deux autres facteurs : eIF4B et eIF4H (Rogers et al., 2001). Les facteurs eIF4E, eIF4G et eIF4A forment le complexe eIF4F.

Le recrutement en 5' de l'ARNm du 43S se fait grâce au complexe d'initiation eIF4F par l'intermédiaire d'eIF3, formant ainsi le complexe 48S (4). Dans le cadre de la configuration en boucle, la poly(A) Binding Protein, (PABP) se lie sur la queue poly(A) en 3'UTR des ARNm et permet la circularisation de l'ARN par son interaction avec eIF4G (5) (Kahvejian et al., 2005).

Dans la phase suivante, la sous-unité 40S scanne l'ARNm dans le sens 5'-->3' jusqu'au codon initiateur AUG, reconnu en partie par eIF1. Le codon initiateur est ensuite positionné au niveau du site P de la sous-unité 40S (6). La reconnaissance de l'AUG entraîne l'hydrolyse du GTP porté par eIF2 en GDP+Pi par le facteur eIF5 (Algire et al., 2005), déclenchant le départ des facteurs d'initiation de la sous-unité 40S, à l'exception d'eIF1A. Le facteur eIF2B

régénérera par la suite le complexe actif eIF2-GTP en faisant l'échange GDP/GTP (8) (Sonenberg and Hinnebusch, 2009)

Le facteur eIF5B-GTP va permettre le recrutement du 60S sur le 40S pour former le ribosome en interagissant avec eIF1A (Acker et al., 2006) (7). La sous-unité 60S catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP sur eIF5B, entraînant le relargage d'eIF5B et d'eIF1A (Allen and Frank, 2007). Lorsque le ribosome s'assemble sur l'ARNm pour débuter la traduction, eIF6 est relarguée à la fin de l'initiation par un mécanisme dépendant de la PKC (Ceci et al., 2003).

L'elongation peut alors commencer.

Le rôle du complexe eIF4F dans l'étape de scan de l'ARN est encore inconnu. La question de savoir si la coiffe, eIF4E, eIF4G, eIF3 et la sous-unité 40S restent associés lors de la transition qui s'effectue entre l'attachement du ribosome à l'ARNm et la reconnaissance du codon AUG est encore très discutée. En effet, si ces interactions restent intactes, cela implique qu'un seul complexe 43S à la fois puisse scanner le 5'UTR (Jackson et al., 2010). Certaines études remettent même en cause la spécificité du recrutement du complexe eIF4F par la coiffe, montrant que celui-ci peut lier les ARNm indépendamment de la présence de la coiffe (Kaye et al., 2009).

B.2.2 l'initiation indépendante de la coiffe

Chez les eucaryotes, certains ARNm sont traduits de façon indépendante de la coiffe en utilisant des structures secondaires présentes dans la région 5'UTR de l'ARNm ou parfois même dans la région codante : les IRES (Internal Ribosome Entry Site). Les IRES permettent une traduction sélective de certains messagers au cours de processus physiologiques ou pathologiques. La synthèse protéique indépendante de la coiffe peut être utilisée lors de conditions physiologiques particulières, durant une infection virale, un stress, au cours du cycle cellulaire ou de l'apoptose (Sarnow, 1989; Johannès and Sarnow, 1998; Johannès et al., 1999; Clemens, 2001; Qin and Sarnow, 2004; Conte et al., 2008).

Dans ce cadre, les ribosomes sont recrutés sur l'ARNm avec l'aide des protéines ITAFs (*IRES Trans Acting Factors*), et des facteurs d'initiation à l'exception d'eIF4E (Marash and Kimchi, 2005). Il existe différents types d'IRES qui ne vont pas avoir la même stratégie pour recruter le ribosome, pouvant faire appel à très peu de facteurs (Hernandez, 2008).

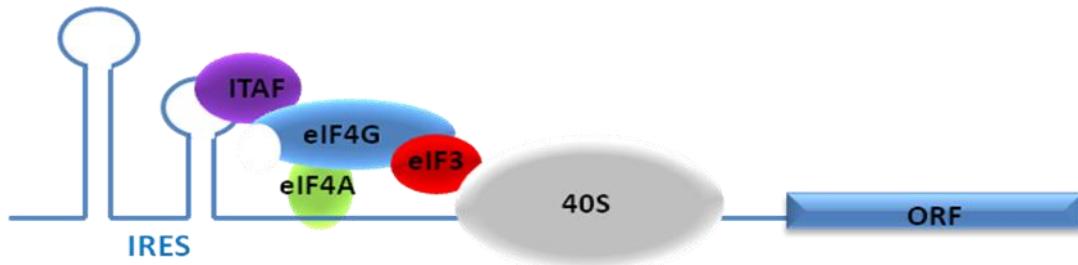


Figure 4 : Facteurs d'initiations et traduction-IRES dépendante des ARN viraux

Les protéines ITAFs interagissent au niveau des séquences IRES portées en 5' de l'ARN, elles recrutent le facteur eIF4G clivé par les protéases virales, lié à eIF4A et eIF3, qui a son tour recrute la sous-unité 40S du ribosome, l'initiation peut ainsi commencer.

Les premières séquences IRES ont été décrites dans la région 5'UTR de l'ARNm de différents virus (Pelletier and Sonenberg, 1988). Ces virus sont capables d'inhiber la traduction des ARNm cellulaires et de détourner la machinerie cellulaire à leur profit par le clivage protéolytique des facteurs de traduction (Gebauer and Hentze, 2004) (Figure 4). Lorsqu'eIF4G est clivé par des protéases à la suite d'une infection virale par le poliovirus, la formation du complexe eIF4F est affectée. eIF4G clivé perd son site d'interaction à eIF4E et ne peut plus participer à l'initiation dépendante de la coiffe. Cependant, eIF4G est toujours capable d'interagir avec eIF4A et eIF3 pour intervenir dans l'initiation dépendante des IRES (Bushell et al., 2000; Schneider and Mohr, 2003). L'infection par le poliovirus peut également entraîner le clivage de la PABP (Marissen et al., 2004). Le clivage de ces facteurs d'initiation par les protéases virales est un moyen efficace pour les virus de détourner la machinerie cellulaire pour produire leurs propres protéines.

Plus de 10% des ARNm seraient capables d'initier la traduction à partir d'un IRES (Stoneley and Willis, 2004) bien que l'ensemble des ARNm cellulaires soit coiffé. Au total, 70 ARNm cellulaires et 43 ARN viraux contenant un motif IRES ont été recensés (Mokrejs et al., 2010). La majorité des IRES cellulaires se trouvent au niveau des ARNm codant pour des protéines impliquées dans le contrôle de la croissance (par exemple : FGF2, VEGF-A, IGF-1), dans la réponse cellulaire aux situations de stress ou d'apoptose (Apaf-1, XIAP, c-myc, DAP5), mais aussi en mitose (avec ODC, PITSLRE, Cycline D1) (King et al., 2010; Mokrejs et al., 2010). Par exemple, VEGF est un facteur de croissance clé dans les mécanismes d'angiogenèse (Vajanto et al., 2002) et son ARNm présente deux séquences IRES dans sa région 5' non

traduite (Huez et al., 1998). Un stress ischémique au niveau du muscle squelettique chez la souris induit une augmentation significative de l'expression de VEGF alors que la traduction dépendante de la coiffe est inhibée (Bornes et al., 2007). La stimulation de l'expression de VEGF par le stress hypoxique se fait en réalité par l'induction de la traduction IRES dépendante (Bornes et al., 2007). Ces structures IRES permettent donc une traduction indépendante de la coiffe, mais aussi une stimulation de l'expression de VEGF dans des conditions de stress pour lesquelles son expression est requise.

Des études intéressantes menées sur l'écureuil ont montré que lors de la période d'hibernation, où la transcription de nouveaux transcrits est très réduite, les ARNm porteurs d'IRES s'associent préférentiellement avec les ribosomes, aux dépens des ARNm traduits de manière coiffe-dépendante lors de la phase active de vie. Cette traduction différentielle des ARNm préexistants, en l'absence de transcription *de novo* pendant l'hibernation, peut permettre la production de protéines clés pour la survie face à cette longue période d'hibernation (exemple des protéines de stress) (Pan and van Breukelen, 2011). Les IRES peuvent donc aussi jouer un rôle dans des conditions physiologiques et permettent à l'organisme de s'adapter aux conditions environnementales.

Sur les bases de la phylogénie des facteurs d'initiations et sur la connaissance des mécanismes d'initiation de la traduction cellulaires et viraux, la traduction IRES dépendante a été proposée comme étant la première forme d'initiation apparue chez les eucaryotes ancestraux (Hernandez, 2008). Les IRES cellulaires actuelles seraient en réalité des reliquats de l'évolution et auraient été conservées grâce à l'avantage sélectif et adaptatif qu'elles confèrent. Au cours de l'évolution des eucaryotes, la traduction coiffe-dépendante est ensuite devenue le processus le plus répandu pour initier la traduction d'un ARNm en protéine. Ce procédé présente de nombreux degrés de régulation faisant intervenir un grand nombre de facteurs et une myriade de mécanismes pour les réguler, ce qui a pu présenter un avantage sélectif majeur pour exercer une régulation fine de l'expression des gènes. Nous allons maintenant détailler ces différents moyens de contrôle mis en œuvre au cours de l'initiation coiffe-dépendante en s'attardant sur les mécanismes qui touchent les éléments du complexe eIF4F.

B.2.3 La régulation de l'initiation

Les mécanismes qui régulent l'initiation de la traduction peuvent être classés en 2 catégories :

- les mécanismes qui touchent les eIFs ou les ribosomes
- les mécanismes qui ciblent directement les régions cis régulatrices de l'ARNm par l'intermédiaire de protéines trans régulatrices ou de microARN (Jackson et al., 2010).

Régulation des eIFs

Dans cette introduction, nous nous concentrerons uniquement sur les régulations touchant les eIFs. La compréhension du contrôle traductionnel au niveau des ribosomes est en plein développement, mais sort du champ d'expertise de cette thèse et ne sera donc pas abordée ici.

Dans la cellule, les facteurs d'initiation peuvent être régulés de différentes manières, principalement par phosphorylation ou séquestration par un autre partenaire de façon à ce qu'ils ne puissent plus interagir avec leurs partenaires initiaux.

Les régulations touchant spécifiquement le facteur eIF4E et son régulateur 4E-BP seront développées dans la partie consacrée exclusivement à ces deux acteurs, qui sont les centres d'intérêt majeurs de mon travail de thèse. Dans cette partie, je ne détaillerai que les régulations majeures touchant l'initiation.

- Régulation des eIFs par Phosphorylation

La régulation traductionnelle ne se résume pas qu'au contrôle d'eIF4E. D'autres acteurs sont aussi reconnus pour y jouer un rôle majeur. Dans cette introduction, je ne citerai que les informations essentielles pour comprendre leur implication dans ce niveau de régulation et mettre en évidence le niveau de complexité mis en œuvre pour contrôler l'expression des gènes.

Le facteur eIF2 est un des acteurs importants du contrôle de la synthèse protéique en réponse au stress cellulaire.

eIF2– L'initiation de la traduction peut être régulée par la phosphorylation du facteur eIF2 sur l'une de ses 3 sous-unité, la sous-unité alpha, au niveau de la sérine 51. Cette

phosphorylation augmente l'affinité d'EIF2 α pour EIF2B. Le facteur EIF2 est alors séquestré par EIF2B et ne peut plus être rechargé en GTP (Sudhakar et al., 2000), ce qui l'empêche de participer à l'initiation de la traduction (Figure 5). Les quatre kinases connues chez les mammifères pour participer à la phosphorylation de la sérine 51 (Dever, 2007) sont HRI (Heme-Regulated Inhibitor kinase), la PKR, la PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), et GCN2.

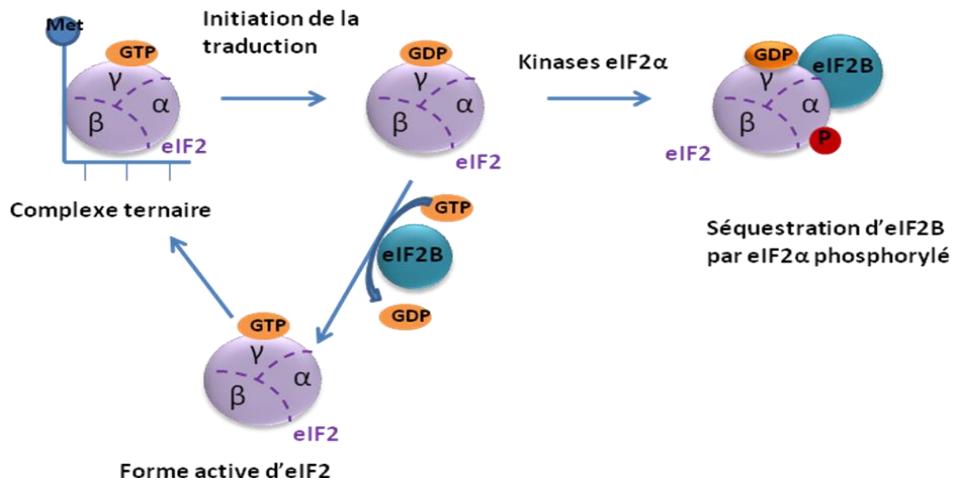


Figure 5 : Régulation de l'initiation par la phosphorylation d'EIF2

La phosphorylation d'EIF2 sur sa sous-unité α entraîne la séquestration d'EIF2B, échangeur du GDP en GTP. Cette séquestration empêche la formation du complexe ternaire qui est nécessaire pour l'initiation de la traduction (Jackson et al., 2010).

EIF4G–**EIF4G** est recruté par **EIF4E** pour former avec **EIF4A** le complexe d'initiation **EIF4F**. Chez les vertébrés, **EIF4G** existe sous deux formes : **EIF4G1** et **EIF4G2**. Ils sont décrits comme des gènes paralogues (Gradi et al., 1998; Imataka et al., 1998) et sont parfois impliqués dans des mécanismes spécifiques (rôle d'**EIF4G2** dans la différenciation des plaquettes (Caron et al., 2004)). **EIF4G1** est le plus étudié et est principalement responsable du recrutement du ribosome par le complexe **EIF4F** (Coldwell and Morley, 2006). **EIF4G1** possède de multiples isoformes issus de l'épissage alternatif et de la présence de plusieurs promoteurs en amont du gène. Le rôle de ces isoformes n'est pas encore identifié, mais l'analyse de leur séquence suggère qu'ils aient chacun une fonction particulière puisqu'ils ne possèdent pas tous les domaines d'**EIF4G1**.

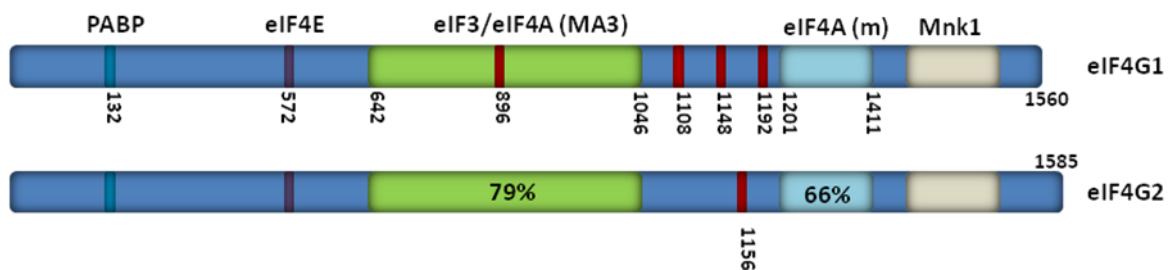


Figure 6 : Les deux formes d'eIF4G avec leurs domaines d'interaction et les sites de phosphorylation connus

les nombres correspondent aux numéros des acides aminés concernés sur eIF4G1 humain. Les pourcentages indiquent la similitude des domaines d'eIF4G2 avec ceux d'eIF4G1. Les sites de phosphorylations sont symbolisés par une barre rouge.

Les eIF4G sont aussi des phosphoprotéines (Figure 6). Trois sites de phosphorylations en C-terminal d'eIF4G1 ont été mis en évidence après une stimulation au sérum : les séries 1108, 1148, 1192 (Raught et al., 2000). Ces phosphorylations sont sensibles à la rapamycine, inhibiteur de la voie mTOR, mais ne sont pas directement régulées par la kinase FRAP/mTOR. En revanche, l'activation de cette voie est nécessaire pour permettre l'accessibilité à ces sites et ainsi, leur phosphorylation par d'autres kinases. Ling et collab. (Ling et al., 2005) ont mis en évidence un nouveau site, la séries 896, qui est phosphorylé par PAK2 (p21 activated kinase). PAK2 est une kinase activée lors de stress modéré qui inhibe la division cellulaire ou qui est constitutivement active lors de stress apoptotique (Roig and Traugh, 1999; Roig et al., 2000; Roig and Traugh, 2001). La phosphorylation d'eIF4G1 par PAK2 inhiberait l'association eIF4E/eIF4G.

eIF4G2 n'est pas phosphorylée par la même voie, mais par la Ca^{2+} /calmodulin dépendante kinase sur la séries 1156 (Qin et al., 2003). Pyronnet et collab. ont également montré qu'eIF4G2 est hyperphosphorylée pendant la mitose (Pyronnet et al., 2001) alors qu'eIF4G1 n'est pas modifiée (Bonneau and Sonenberg, 1987). Cette phosphorylation coïncide avec une diminution de l'association avec eIF4E. Les auteurs proposent que la phosphorylation d'eIF4G2 pendant la mitose empêche la formation du complexe eIF4F et facilite l'interaction d'eIF4G2 avec d'autres protéines, notamment pour favoriser la traduction IRES dépendante.

eIF4G1 et eIF4G2 sont donc régulées par des voies différentes de phosphorylation. De nos jours, la régulation des différents acteurs du complexe eIF4F par phosphorylation est encore mal comprise. L'utilisation de nombreux inhibiteurs de kinases ne semble notamment pas affecter la formation du complexe eIF4F (Raught et al., 2000). En revanche, l'état de

phosphorylation d'EIF4G1, mais aussi d'EIF4E augmente dans des conditions connues pour stimuler la synthèse protéique et corrèle avec une augmentation de la traduction.

Régulations de l'initiation par l'intervention d'autres partenaires

EIF4E-EIF4G régulée par 4E-BP – 4E-BP est une petite protéine possédant un site consensus similaire de liaison à EIF4E qu'EIF4G. 4E-BP s'associe à EIF4E et inhibe compétitivement sa liaison avec EIF4G (Mader et al., 1995). L'état de phosphorylation de 4E-BP est classiquement associé à sa capacité de séquestrer EIF4E. Lorsque 4E-BP est hypophosphorylé, il s'associe à EIF4E et empêche la formation du complexe EIF4F. La phosphorylation de 4E-BP sur plusieurs sites principalement par la voie FRAP/mTOR (FKBP12 Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin) empêche son association avec EIF4E qui est ainsi libre pour interagir avec EIF4G et initier la traduction (Gingras AC, 1998) (Figure 7). Les régulations fines et les mécanismes mis en œuvre au cours de la phosphorylation restent encore discutés dans la littérature et seront détaillés dans le paragraphe exclusivement consacré aux régulations de 4E-BP.

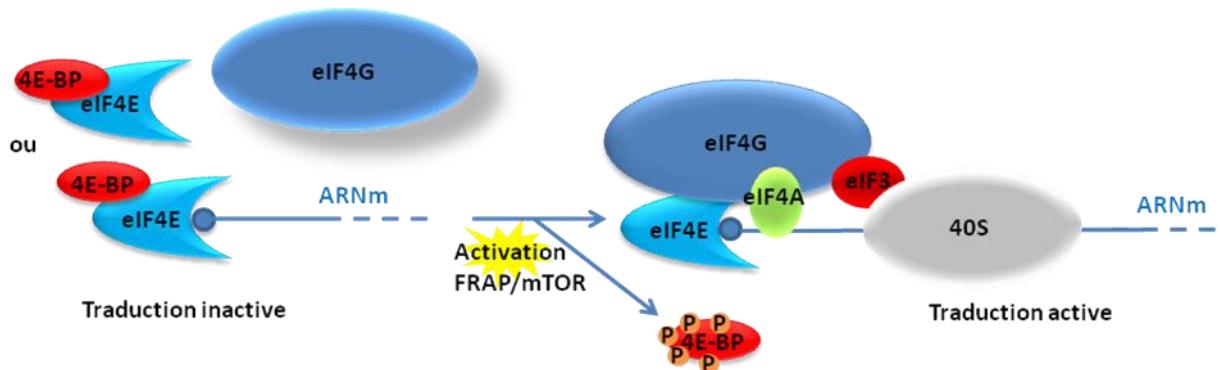


Figure 7 : Régulation de la formation du complexe EIF4F par 4E-BP

L'association EIF4E/EIF4G est inhibée par l'interaction EIF4E/4E-BP. L'activation de la voie FRAP/mTor entraîne la phosphorylation de 4E-BP, empêchant son association avec EIF4E et permettant la formation du complexe EIF4F.

Historiquement, les premières protéines identifiées comme s'associant à EIF4E sur ce site ont été nommées en anglais les 4E-Binding Proteins. Le répresseur 4E-BP et EIF4G, même s'ils possèdent des fonctions antagonistes, représentent les prototypes de ces "4E-binding proteins". Le nombre de protéines interagissant avec EIF4E a depuis augmenté dans des proportions importantes, imposant un nouveau vocable les caractérisant : les "4E-

interacting proteins" (4E-IP). Ces nouveaux partenaires seront décrits dans la seconde partie de cette thèse, où seront abordées les différentes catégories de régulateurs d'EIF4E, mon travail de thèse ayant en partie consisté à caractériser une nouvelle 4E-IP.

EIF4G-PABP régulée par PAIP— Les PAIP (poly(A)-binding protein Interacting Protein) sont des protéines capables d'interagir avec la PABP. Elles régulent l'initiation de la traduction en modulant l'interaction d'EIF4G avec PABP, nécessaire pour la formation du modèle en boucle. La protéine PAIP-1 présente 39% de similarité avec le domaine central d'EIF4G et possède un site de liaison à PABP au niveau de son domaine C-Terminal (Craig et al., 1998). Le mécanisme par lequel PAIP1 stimule la traduction a été décrypté par Martineau et collab. (Martineau et al., 2008). Un modèle est proposé dans lequel PAIP1 est capable d'interagir avec PABP et EIF3, de manière à stabiliser l'interaction PABP/ EIF4G, favorisant la formation du modèle en boucle et stimulant ainsi la traduction.

Une autre protéine de la famille des PAIP, PAIP2, est capable cette fois-ci d'inhiber la traduction. PAIP2 est une toute petite protéine qui entraîne la dissociation de la PABP avec la queue poly(A), mais qui inhibe également l'association entre PABP et EIF4G par compétition (Karim et al., 2006), perturbant la formation du modèle en boucle.

EIF4A-EIF4G régulée par Pcd4— eIF4A, par son activité RNA hélicase ATP dépendante, joue un rôle important dans l'initiation de la traduction, en particulier lorsque les ARNm possèdent en 5'UTR un nombre important de structures secondaires. eIF4A n'est pas régulée par phosphorylation mais son activité change en fonction de ses partenaires. Pcd4 (programmed cell death gene 4) est une protéine suppresseur de tumeur et joue le rôle de répresseur traductionnel des ARNm contenant des structures en 5' UTR. Pcd4 possède deux domaines MA3 qui agissent en synergie pour former un complexe très stable autour d'eIF4A. Ces deux domaines entrent en compétition avec eIF4G, et le domaine eIF4G-MA3 (Figure 6) ne peut par conséquent plus interagir avec la région N-terminale d'eIF4A (Waters et al., 2011). Pcd4 peut également interagir directement avec le domaine central d'EIF4G, indépendamment de la liaison à eIF4A (Yang et al., 2003).

En conditions normales de traduction, les deux domaines d'EIF4G MA3 (Figure 6) interagissent avec les parties N-ter et C-ter d'eIF4A pour former un complexe actif de la

traduction. Pdc4d, grâce à ses domaines MA3, inhibe l'activité ARN hélicase d'EIF4A en empêchant le domaine MA3 d'EIF4G de fixer EIF4A en N-ter.

Régulation de l'initiation en fonction des séquences portées par l'ARNm

Le deuxième type de régulation de l'initiation de la traduction s'exerce en fonction des séquences portées par l'ARNm. Les séquences cis sur l'ARNm vont permettre un contrôle spécifique de l'initiation de la traduction de messagers qui portent ces motifs particuliers localisés au niveau des régions 5' et 3' UTR reconnus par des RBP spécifiques.

- Régulation de l'initiation par l'interaction de RBP en 5'UTR

La régulation de l'initiation par des protéines interagissant de manière spécifique avec la région 5'UTR, en dehors de la coiffe et des IRES, est très rare et le seul exemple bien étudié est celui des ARNm codant pour la ferritine. Ces ARNm portent une séquence IRE (Iron Response Element) en 5'UTR, qui permet le recrutement des protéines IRP1 et IRP2 (Iron Response Protein) lors d'une déficience en Fer. La liaison de ces protéines avec l'ARNm empêche le recrutement du complexe 43S et ainsi, l'initiation de la traduction. Cette répression se fait par un blocage stérique de l'accès à la coiffe et n'est effective que si seulement le motif IRE est situé près de la coiffe (Gray and Hentze, 1994; Muckenthaler et al., 1998) .

- Régulation de l'initiation par l'interaction de RBP en 3'UTR

Contrairement à la régulation modulée par les éléments en 5'UTR, les exemples de régulation de l'initiation de la traduction par des motifs en 3'UTR sont très nombreux, particulièrement dans les processus de développement. Ces éléments spécifiques en 3'UTR vont permettre le recrutement de protéines trans régulatrices sur l'ARNm. À l'exception de la PABP qui lie la queue poly(A) des ARNm et qui facilite ainsi l'étape d'initiation, l'interaction des RBP avec leurs motifs de liaison va jouer un rôle souvent inhibiteur sur l'initiation de la traduction de manière directe, ou indirecte en recrutant des partenaires, selon différents procédés. Ils peuvent:

- empêcher la formation du complexe EIF4F en se fixant sur EIF4E
- réguler la longueur de la queue poly(A)
- recruter des corépresseurs, tels que des enzymes de décoiffage (Dcp1, Dcp2 ,decapping protein), des DEAD box helicases (Dhh1, DEAD box mRNA helicase 1).

Des exemples précis de ces mécanismes seront exposés plus en détail dans la partie II.A.

-Régulation de l'initiation par les miR

Les micro ARNs (miR) sont des petits ARN simple brin de 21 nucléotides, issus d'une succession de digestions d'un pré-miARN notamment par les enzymes Drosha et Dicer (Denli et al., 2004). Chaque miR reconnaît une séquence présente sur les ARNm cibles, permettant de réguler spécifiquement leur expression. Chez les animaux, ces séquences se retrouvent le plus souvent dans la région 3'UTR. Les miR ne vont pas avoir une séquence parfaitement complémentaire à la séquence cible, ce qui permettra de bloquer la traduction de l'ARNm mais n'entraînera pas le clivage de l'ARNm comme chez les plantes. Le degré de répression augmente avec le nombre de miR associés en 3'UTR, même si ces derniers ne sont pas identiques (Jackson RJ, 2007). De manière intéressante, il n'a pour le moment été montré qu'un effet des miR sur la traduction des ARNm portant une coiffe, et non celle des messagers IRES (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005).

La protéine argonaute (AGO), pour laquelle il existe 4 isoformes chez les mammifères, s'associe avec le complexe miR-ARNm, permettant la formation du complexe RISC (RNA-induced silencing complexe). AGO recrute de nombreux facteurs tels que GW182, une autre protéine centrale dans le complexe RISC, qui présente un rôle important pour la répression de la traduction par les miR (Eulalio et al., 2009). Les miRs jouent donc le rôle d'adaptateur sur l'ARNm pour la protéine AGO, qui à son tour recrute des facteurs tel que GW182 pour réprimer la traduction.

Les mécanismes mis en jeu pour réprimer la traduction par les miR restent peu compris à l'heure actuelle, mais semblent impliquer deux composantes:

- la déadénylation des ARNm par le recrutement d'une activité déadénylase. De récentes études ont effectivement montré que GW182 est capable de se lier à la PABP (Zekri et al., 2009; Fabian et al., 2010; Huntzinger et al., 2010) et qu'elle recrute des activités déadénylases, telles que le complexe CCR4/NOT (Fabian et al., 2011) (Braun et al., 2011) (Figure 8).

-l'inhibition de l'initiation. Cette hypothèse de régulation a été avancée par Kiriakidou et collab. (Kiriakidou et al., 2007). Ils montrent que la protéine argonaute est capable de se lier à la coiffe, limitant l'interaction eIF4E/coiffe et donc inhibant l'initiation des ARNm ciblés, ce que ne font pas les mutants d'AGO dans le site de liaison à la coiffe. Ce mécanisme reste néanmoins très controversé. En effet, les mutations effectuées dans AGO1 pour empêcher sa

liaison à la coiffe affectent également sa liaison avec GW182 et les miRNA (Eulalio et al., 2008). Or, la fonction inhibitrice des miRNA repose sur la formation du complexe AGO1-GW182, au-delà des mécanismes de déadénylation. Il semblerait donc qu'il existe plutôt une inhibition postinitiation, avec l'hypothèse que la déadénylation de l'ARNm déstabilise le complexe d'initiation par la perte de liaison avec la PABP (Jackson et al., 2010) (Figure 8). La compréhension de ces mécanismes nécessitera sûrement d'en savoir davantage sur les partenaires protéiques d'Ago et de GW182, et leurs rôles sur les facteurs d'initiations.

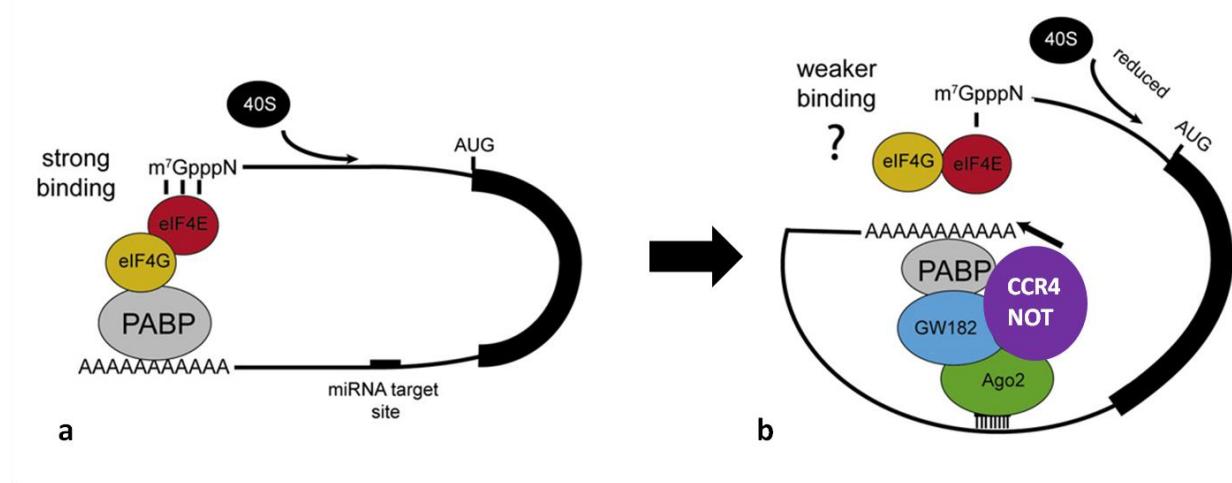


Figure 6 : Modèle hypothétique de *Gene-silencing* par les miR réalisé à partir de (Fabian et al., 2009; Fabian et al., 2011).

(a) *Modèle en boucle de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante.* (b) *miRISC se lie sur le site cible de l'ARNm en 3'UTR. GW182 lie la PABP, ce qui pourrait inhiber sa liaison avec eIF4G, et inhiber l'initiation en diminuant la liaison eIF4E/coiffe. Le recrutement du complexe CCR4/NOT par l'intermédiaire de GW182 faciliterait la déadénylation de l'ARNm.*

L'initiation de la traduction se présente donc comme une étape hautement régulée par différents procédés. Au cours de mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux régulations touchant le facteur eIF4E, qui joue un rôle majeur dans l'étape d'initiation puisqu'il recrute le complexe eIF4F sur la coiffe en 5' des ARNm. Mon travail s'est concentré sur les régulations exercées sur eIF4E par ses partenaires, et en particulier, la régulation exercée par le répresseur général de la traduction 4E-BP, en abordant ces interactions sous un angle structural. Les régulations et les caractéristiques structurales d'eIF4E, ainsi que celle de 4E-BP seront donc détaillées dans le paragraphe ci-dessous.

C. eIF4E et son inhibiteur 4E-BP au centre des régulations

C.1 eIF4E

C.1.1 évolution et caractéristiques

Du point de vue de l'évolution, les protéines eIF4E et eIF4G, tout comme la présence de la coiffe en 5'UTR des ARNm, sont retrouvées exclusivement chez les eucaryotes. Le facteur eIF4E ne possède pas d'homologues chez les eubactéries et les archae, et ne partage aucun domaine connu avec d'autres protéines, indiquant que l'initiation dépendante de la coiffe s'est seulement mise en place après l'apparition des cellules eucaryotes (revue (Hernandez, 2008)).

Joshi et collab. ont mis en évidence l'existence de 3 classes d'eIF4E chez les mammifères (Joshi et al., 2005) : eIF4E1, eIF4E2 (appelée également 4E-HP, 4E-SL) et eIF4E3 (Table I). Chez l'homme, la protéine eIF4E2 présente 28% d'identité avec eIF4E1, tandis qu'eIF4E3 présente 25% d'identité avec eIF4E1 et eIF4E2 respectivement. La classification des eIF4E se base sur la nature des acides aminés en position 43 et 56 (positions sur la séquence humaine):

- eIF4E1 possède un tryptophane en position 43 et 56
- eIF4E2 n'a pas de tryptophane sur ces positions
- eIF4E3 possède un tryptophane en position 43

Le tryptophane en position 56 fait partie du site qui interagit avec la coiffe (Joshi et al., 2004; Joshi et al., 2005). Les variations particulières d'acides aminés à cet endroit suggèrent une conformation particulière et une affinité différente de chaque forme d'eIF4E pour la coiffe. Plusieurs études ont notamment montré qu'eIF4E-2 (4E-HP) humain avait une affinité jusqu'à 100 fois plus faible pour la coiffe par rapport à eIF4E1 (Rosettani et al., 2007; Zuberek et al., 2007). Joshi et collab. ont également montré que la spécificité d'interaction d'eIF4E3 pour la coiffe était très faible, puisque celle-ci pouvait être éluée d'une colonne m^7 GTP par du GTP non méthylé (Joshi et al., 2004).

Au niveau de l'évolution, eIF4E1 se retrouvent chez tous les eucaryotes, eIF4E2 seulement au niveau des métazoaires, des champignons et des "végétaux verts" (viridiplantae) (Joshi et al., 2005) ainsi que chez les algues brunes (Cock et al., 2010) tandis qu'eIF4E3 est bien représenté au niveau des chordés, alors qu'il est absent chez la Drosophile et les nématodes. eIF4E3 est également retrouvé sporadiquement chez quelques métazoaires (cnidaires (Joshi et al., 2005), ou encore chez les échinodermes (Morales et al., 2006)) et chez les algues brunes (Cock et al.,

2010) (Table I). Chez les vertébrés, les eIF4E des classes 1 et 2 se subdivisent en sous-groupes : on trouve principalement eIF4E1a, eIF4E1b, eIF4E2a, eIF4E2b. Ces sous-groupes ne sont pas présents chez tous les organismes. Joshi et collab. ont montré par l'analyse des génomes humain et murin qu'il n'existe pas de séquence correspondant à eIF4E2b. Chaque forme possède des caractéristiques propres. Alors que les transcrits d'eIF4E1a sont exprimés de manière ubiquitaire, les transcrits d'eIF4E1b s'expriment seulement au cours du développement embryonnaire, puis dans les gonades et les muscles chez le poisson-zèbre (Robalino et al., 2004). Contrairement à eIF4E1a, eIF4E1b n'interagit pas du tout avec eIF4G ou 4E-BP et très faiblement avec la coiffe (Joshi et al., 2004).

Propriétés	eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3
Signatures structurales	Partie centrale conservée d'environ 170 aminés dont 8W (43,46,56,73,103,113,130,166 pour heIF4E1)	28 et 25% d'homologie respective avec eIF4E1 et eIF4E3	25% d'homologie avec eIF4E1 et 2
Distribution de l'expression	Ubiquitaire	Ubiquitaire	Cœur, muscle squelettique, poumon, rate
Association avec la coiffe	oui	Oui, mais discutée (100 à 200 fois moins qu'eIF4E1)	Oui, mais faible spécificité
Association avec eIF4G	oui	non	oui
Association avec 4E-BP	oui	Oui (discutée)	non
Répartition phylogénique	eucaryotes	Métazoaires, viridiplantae, Fungi, Algues brunes	Deutérostomes, Cnidaires, Algues Brunes

Table 1 : Caractéristiques des trois classes d'eIF4E

eIF4E1a et eIF4E2a sont les sous-groupes communément appelés eIF4E1 et eIF4E2 (4E-HP). L'expression des transcrits analysée chez la souris montre qu'eIF4E1 et eIF4E2 sont présents de manière ubiquitaire dans les différents tissus. En revanche, les transcrits d'eIF4E3 ne sont présents que dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et la rate (Joshi et al., 2004) (Table I). Chez la souris, les 3 classes d'eIF4E présentent des affinités différentes pour

leurs principaux partenaires : eIF4G et 4E-BP. Ces caractéristiques sont résumées dans la Table I. eIF4E1 peut interagir avec 4E-BP et eIF4G, eIF4E2 seulement avec 4E-BP et eIF4E3 seulement avec eIF4G. L'affinité d'eIF4E2 humain pour 4E-BP n'a pas pu être mise en évidence par une équipe (Rom et al., 1998).

Les particularités d'association des différents eIF4E avec la coiffe et leurs partenaires, ainsi que leur ordre d'apparition dans l'évolution et leur territoire d'expression, suggèrent que chaque forme d'eIF4E joue un rôle spécifique en fonction de son expression et de ses partenaires. Par exemple, seul eIF4E1 (souris) est capable de sauver le phénotype létal de la délétion du gène unique eIF4E chez la levure, eIF4E2 et eIF4E3 n'étant pas suffisants (Joshi et al., 2004). Chez la drosophile, sept gènes codent pour huit isoformes d'eIF4E, notées d'eIF4E-1 à eIF4E-8. L'épissage alternatif du gène codant pour eIF4E-1 permet de produire eIF4E-2 (Hernandez et al., 2005). Selon la classification établie par Joshi et collab. (Joshi et al., 2004), les protéines eIF4E-1 à eIF4E-7 appartiennent à la classe 1, tandis qu'eIF4E-8 appartient à la classe 2. Les transcrits des 8 isoformes sont présents à différents moments du développement et les protéines présentent différentes affinités pour la coiffe des messagers ainsi que pour eIF4G et 4E-BP. Chez la drosophile, eIF4E-1 se présente comme l'acteur principal dans la traduction dépendante de la coiffe (Hernandez et al., 2005). D'une tout autre façon, eIF4E-8 (4E-HP) joue lui aussi un rôle important dans la détermination des axes embryonnaires de la drosophile, en participant à l'inhibition de la traduction coiffe dépendante de certains ARNm spécifiques (Cho et al., 2005; Cho et al., 2006).

Chez l'homme, seule la fonction d'eIF4E1 est plutôt bien caractérisée. Il est le point de contrôle majeur dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. La fonction d'eIF4E2 reste incomprise, même si la protéine est également exprimée de manière ubiquitaire. eIF4E2 peut interagir avec la coiffe, mais de façon beaucoup plus faible qu'eIF4E1, ne pouvant donc pas rentrer en compétition avec celui-ci pour la coiffe des ARNm (Zuberek et al., 2007). eIF4E2 humain possède une affinité beaucoup plus forte pour la coiffe lorsqu'elle est modifiée par ISG15, une ubiquitin-like *modifier* fortement activée par l'interféron de type 1 (Okumura et al., 2007). Les auteurs ont proposé qu'eIF4E2 puisse jouer un rôle dans l'inhibition spécifique des ARNm viraux de manière coiffe-dépendante, puisque les interférons inhibent généralement la traduction des ARNm viraux alors que la traduction de la majorité des ARNm cellulaire n'est pas affectée (Platanias, 2005). Quant à eIF4E3, son rôle est totalement

inconnu à l'heure actuelle, mais son expression tissu-spécifique laisse penser que celui-ci jouerait un rôle dans la traduction d'ARNm spécifiques.

La principale différence fonctionnelle de ces trois formes d'EIF4E repose sur leur capacité différente à interagir avec 4E-BP et eIF4G, faisant de l'analyse structurale de ces acteurs un point crucial pour la compréhension de ces divergences.

C.1.2 Structure

Les eIF4E ont une structure assez conservée. Les structures en 3 dimensions d'eIF4E1 souris, humain et *S.cerevisiae* liés à des analogues de la coiffe se caractérisent par un feuillet β composé de 8 brins antiparallèles, au-dessus de 3 hélices α formant une forme en gant de baseball (Figure 9a). Deux résidus tryptophane (Trp56 et Trp102 pour l'eIF4E humain), localisés au niveau d'une cavité étroite sur la surface concave, permettent de tenir le résidu guanine de la coiffe grâce à des interactions non covalentes entre les cycles aromatiques et la coiffe, qui s'intercale entre les deux cycles (p_p stacking). Ces interactions sont stabilisées par la formation de liaisons hydrogènes entre le Trp 102 et le résidu conservé Glu (Glu 103 pour eIF4E1 humain). Un troisième résidu (Trp166 pour eIF4E1 humain) reconnaît la présence du groupe méthyl-N7 de la coiffe (Joshi et al., 2004).

Les partenaires d'eIF4E1, 4E-BP et eIF4G se lient au niveau de la surface dorsale convexe d'eIF4E, grâce au même motif très conservé YXXXXL Φ (où Φ : acide aminé aliphatique (L, F ou M)) qu'ils portent dans leur séquence (Mader et al., 1995). Des études cristallographiques sur eIF4E1 de souris, associée avec un fragment d'eIF4G ou de 4E-BP contenant le motif YXXXXL Φ , ont montré que les résidus His37, Pro38, Val69, Trp73, Leu131, Glu132 et Leu135 (numérotés selon eIF4E1 humain) participent à l'interaction avec les fragments eIF4G et 4E-BP (Figure 9b). La substitution du Trp 73 par un acide aminé non aromatique dans un eIF4E1 de mammifère rend eIF4E incapable d'interagir avec eIF4G ou 4E-BP. La substitution de la Val69 par un résidu de glycine entraîne la production d'un eIF4E1 capable de se lier à 4E-BP1 de manière efficace, mais qui ne peut alors plus interagir avec eIF4G et 4E-BP2 (Ptushkina et al., 1999).

La plupart des études de cristallographie se sont portées sur un eIF4E1 tronqué en N-ter de 30 acides aminés, car cette région est très flexible et ne cristallise pas (Marcotrigiano et al., 1997; Marcotrigiano et al., 1999; Niedzwiecka et al., 2002; Tomoo et al., 2005). Depuis, Gross et al.

ont montré que cette région N-terminale était essentielle pour l'interaction eIF4G/eIF4E1. En effet, des mutants chez la levure exprimant une forme d'eIF4E tronquée en N-ter présentent une croissance ralentie et un profil de polysomes changé, enrichi au niveau du pic de 80S, révélateur d'un dysfonctionnement au niveau de l'étape d'initiation. La région N-terminale d'eIF4E1 se structure lorsqu'eIF4E1 interagit avec eIF4G (résidus 393-490, levure). Cette région est requise pour la stabilisation d'eIF4E1 et la structuration d'eIF4G en forme de bracelet moléculaire qui s'entoure autour de cette région (Gross et al., 2003). L'effet de la présence de cette région N-terminale pour la liaison eIF4E/4E-BP est encore discuté. La région N-terminale d'eIF4E1 a un effet inhibiteur sur son association avec 4E-BP1 et 4E-BP2 mais pas avec 4E-BP3 (Abiko et al., 2007). Les propriétés structurales des 4E-BPs, seules ou en association avec eIF4E seront détaillées dans I.C.2 .3.

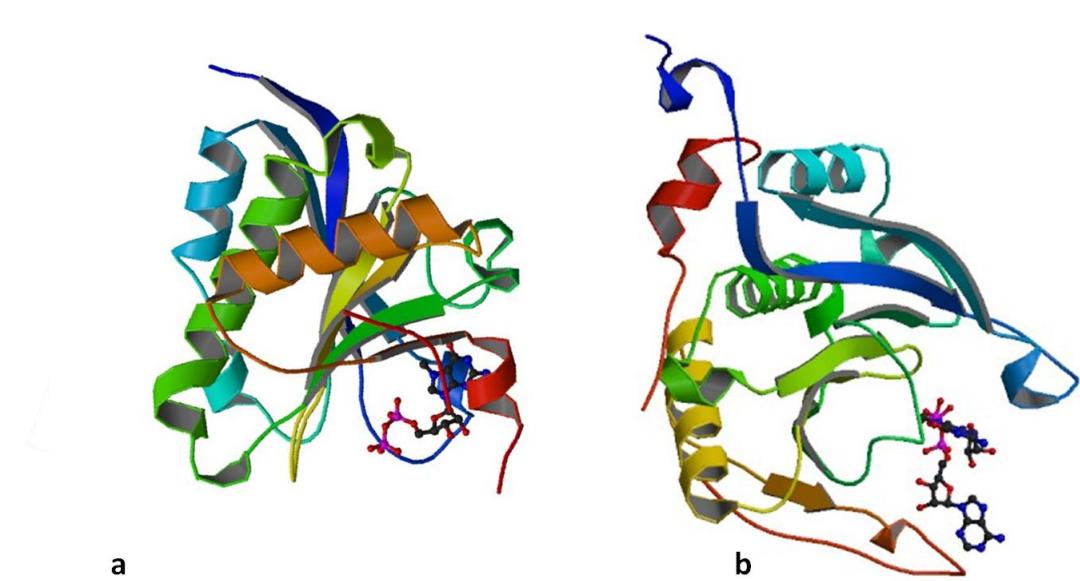


Figure 9 : Structure cristallographique d'eIF4E1 lié à la coiffe (a) et d'eIF4E1/peptide 4E-BP1 lié à la coiffe (b)

(a) (Niedzwiecka et al., 2002). Structure d'eIF4E1 tronqué en N-ter (30 acides aminés) interagissant avec la coiffe (structure en bâtons). (b) (Tomoo et al., 2005) Structure d'eIF4E1 tronqué en N-ter (30 acides aminés) interagissant avec un peptide 4E-BP1 de 15 acides aminés (rouge) contenant le motif YXXXXLΦ.

Très peu de données structurales sont disponibles pour eIF4E2. Les seules données sont celles obtenues par Rosettani et collab., qui ont utilisé la cristallographie et l'ITC (isothermal titration calorimetry) pour regarder la structure et les propriétés d'association d'eIF4E2 humain avec la coiffe et un peptide 4E-BP (Rosettani et al., 2007). Dans cette étude, l'affinité

d'EIF4E2 pour la coiffe et pour le peptide 4E-BP1 ont été mesurées comme étant au moins 100 fois plus faibles que celles d'EIF4E1, tout en ayant une pertinence physiologique dans le sens où ces valeurs restent considérables dans une cellule.

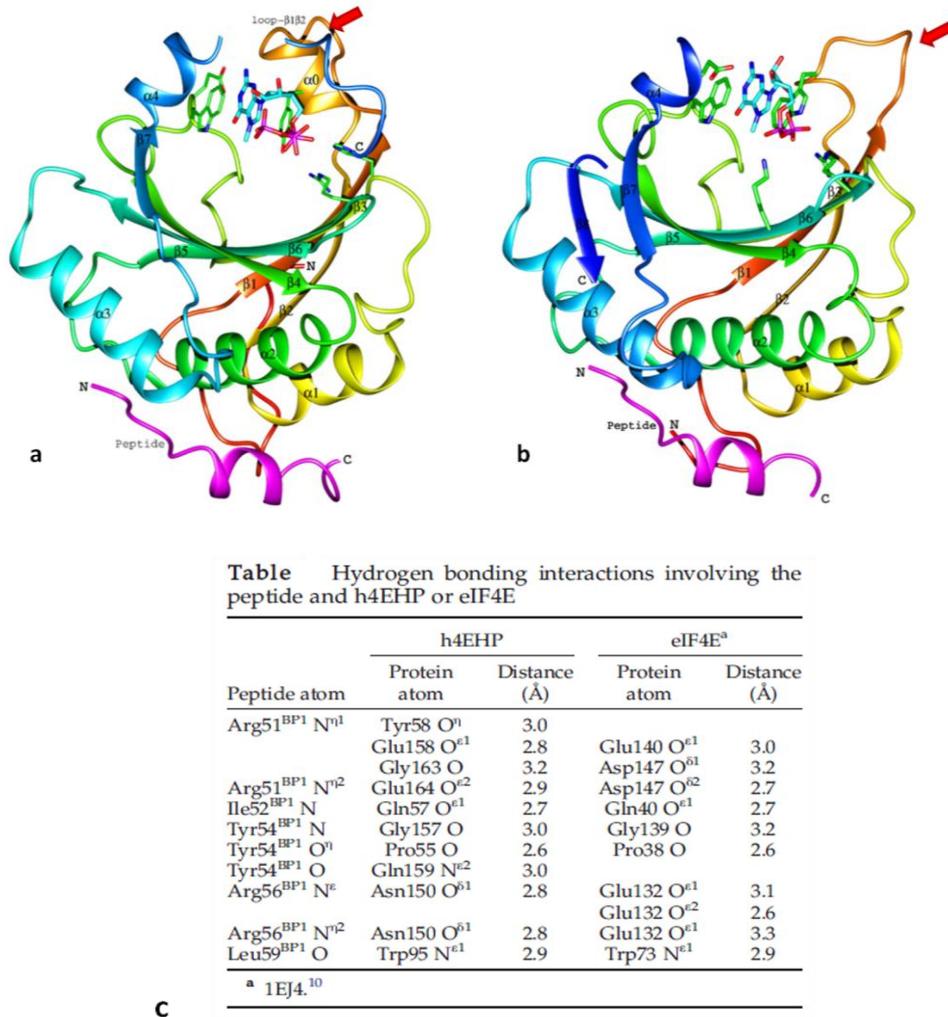


Figure 10 : Comparaison de la structure d'EIF4E2 (a) avec la structure d'EIF4E1 (b) (Rosettani et al., 2007)

Les deux eIF4E sont représentées avec le peptide 4E-BP1 (RIIYDRKFLMECRNSPV) (violet) et la coiffe (structure en bâtons). La flèche rouge indique la boucle $\beta 1\beta 2$. Pour plus de détails, voir le texte ci-dessous.(c) Tableau répertoriant les liaisons hydrogènes impliquées dans l'interaction entre le peptide 4E-BP1 et eIF4E ou 4E-HP (eIF4E2).

La structure générale d'EIF4E2 est très similaire à celle d'EIF4E1 (Figure 10). Les principales variations se trouvent en N et en C-terminal ainsi qu'au niveau des boucles $\beta 1\beta 2$ (flèche rouge figure 10 (a) et (b)). C'est ce dernier changement, au niveau de la boucle $\beta 1\beta 2$ formant une partie du site de liaison à eIF4E, qui semble le plus significatif. Dans eIF4E2,

cette boucle possède 4 résidus de plus que dans eIF4E1; elle contient une hélice α 0 supplémentaire et referme ainsi un peu plus le site de liaison à la coiffe. La guanosine de la coiffe va être prise en sandwich par une tyrosine et un tryptophane, au lieu de 2 tryptophanes pour eIF4E1, ce qui permettrait d'expliquer qu'eIF4E2 possède une affinité plus faible pour la coiffe que celle mesurée pour eIF4E1 (Table I). La tyrosine se trouve dans une boucle plus longue pour eIF4E2, ce qui lui permet de mimer le tryptophane et d'adopter une orientation similaire.

Au niveau du site de liaison sur la surface dorsale convexe, il semblerait que le modèle d'association du peptide 4E-BP1 (résidus Arg51 à Val 67 du 4E-BP1 humain) avec eIF4E1 proposé par Marcotrigiano et collab. (Marcotrigiano et al., 1999), puisse s'appliquer à eIF4E2, qui possède également le tryptophane en position 73 (Figure 10c). La région de 4E-BP1 comprise entre les résidus Ile52 et Cys62 contenant le motif YXXXXL Φ , se lie de manière très similaire à eIF4E1 ou eIF4E2 du fait de la grande conservation de la région d'interaction sur les eIF4E. Seule une mutation de la leucine d'eIF4E1 en isoleucine pour eIF4E2 est observée au niveau du site qui lie Leu59^{BP1}. Néanmoins, la différence majeure entre les deux interactions s'observe au niveau de la région d'eIF4E interagissant avec l'Arg56^{BP1}. Pour eIF4E1, le résidu Glu132^{eIF4E1} va former un pont salin avec l'Arg56^{BP1} mettant en jeu deux groupements carboxyles, tandis qu'au niveau d'eIF4E2, l'acide aminé impliqué dans cette interaction est l'Asn150^{eIF4E2}, ce qui ne permettra la formation que d'une seule liaison hydrogène. Cette variation pourrait expliquer la différence d'affinité des deux eIF4E pour le peptide 4E-BP1. En dehors de ce site de liaison, les protéines sont ensuite plus variables, représentant une piste pour comprendre les différences d'affinités pour eIF4G et 4E-BP.

En ce qui concerne eIF4E-3, aucune structure cristallographique n'a été obtenue jusqu'à aujourd'hui. Au niveau de la conservation des sites importants, le Trp en position équivalente du Trp56 pour eIF4E1 est remplacé par une cystéine. Les autres résidus Trp sont conservés, notamment celui du site de liaison en position 73.

Dans la suite de cette introduction, la plupart des données concerneront eIF4E1. Pour plus de clarté, eIF4E fera systématiquement référence à l'isoforme eIF4E1. Dans le cas contraire, l'isoforme eIF4E2 ou eIF4E3 sera spécifié.

C.1.3 Régulation d'eIF4E

Longtemps considéré comme le facteur limitant dans l'étape d'initiation de la traduction (Duncan et al., 1987) (Hiremath et al., 1985), eIF4E est un point de contrôle majeur pour réguler la traduction. Même si de nouvelles études ont montré que le facteur limitant serait plutôt eIF4G (Rau et al., 1996), de nombreux moyens sont mis en place dans la cellule pour jouer sur la disponibilité d'eIF4E pour ses partenaires dans le complexe eIF4F.

Régulation d'eIF4E par la transcription

La régulation de la quantité d'eIF4E présente dans le cytoplasme peut s'exercer au niveau de la transcription. Le promoteur du gène codant pour eIF4E, qui contient deux "E-Box", interagit avec le facteur de transcription proto-oncogène c-myc, et active sa transcription (Jones et al., 1996; Schmidt, 2004). p53 exerce une régulation négative indirecte sur la transcription d'eIF4E en se liant à c-myc et en empêchant sa liaison avec le promoteur d'eIF4E (Zhu et al., 2005).

Régulation d'eIF4E par la phosphorylation

Un autre moyen de réguler la fonction d'une protéine consiste à la phosphoryler. Un site majeur de phosphorylation a été mis en évidence sur eIF4E : la sérine 209, après traitement par facteurs de croissance, hormones, mitogènes ou lors de stress cellulaires (Morley and Traugh, 1989; Rutgers et al., 1996; Wang et al., 1998). *In vitro*, la sérine 209 est le site de phosphorylation majeur par la PKC, et cette phosphorylation est inhibée lorsqu'eIF4E est associée à 4E-BP1 ((Tuazon et al., 1990; Whalen et al., 1996; Wang et al., 1998)).

In vivo, la phosphorylation d'eIF4E corrèle de manière positive avec la traduction et la croissance cellulaire. eIF4E devient également phosphorylé lors de la maturation des lymphocytes B et T, ou lors de la différenciation des cellules PC12 en neurones. Au contraire, eIF4E est déphosphorylé dans des cellules bloquées en mitose, lors d'un choc thermique ou après infection par un adénovirus, concordant avec une diminution de la synthèse protéique (Gingras AC, 1999).

La seule kinase *in vivo* mise en évidence pour la phosphorylation de la sérine 209 est MNK1 (Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1999; Pyronnet, 2000), une kinase activée par ERK et p38 (Fukunaga and Hunter, 1997). MNK1 ne se lie pas à eIF4E directement, mais se fixe sur la région C-terminale d'eIF4G pour se rapprocher d'eIF4E et permettre sa phosphorylation

(Figure 11). La phosphorylation d'EIF4G par la PKC α régule de manière positive la liaison entre MNK1 et EIF4G (Dobrikov et al., 2011) et donc la phosphorylation d'EIF4E. Cette phosphorylation est aussi régulée en situation de stress par PAK2 (p21 activated Protein Kinase) (Orton et al., 2004). PAK2 phosphoryle Mnk1 au niveau de son domaine terminal, empêchant celle-ci de se lier avec EIF4G et donc de phosphoryler EIF4E (Figure 11). PAK2 est également capable de phosphoryler EIF4G et d'empêcher sa liaison avec EIF4E (Ling et al., 2005). La protéine phosphatase 2A (PP2A) a également été montrée comme jouant un rôle dans la régulation de la formation du complexe EIF4F par la déphosphorylation d'EIF4E et Mnk1 (Li et al., 2010).

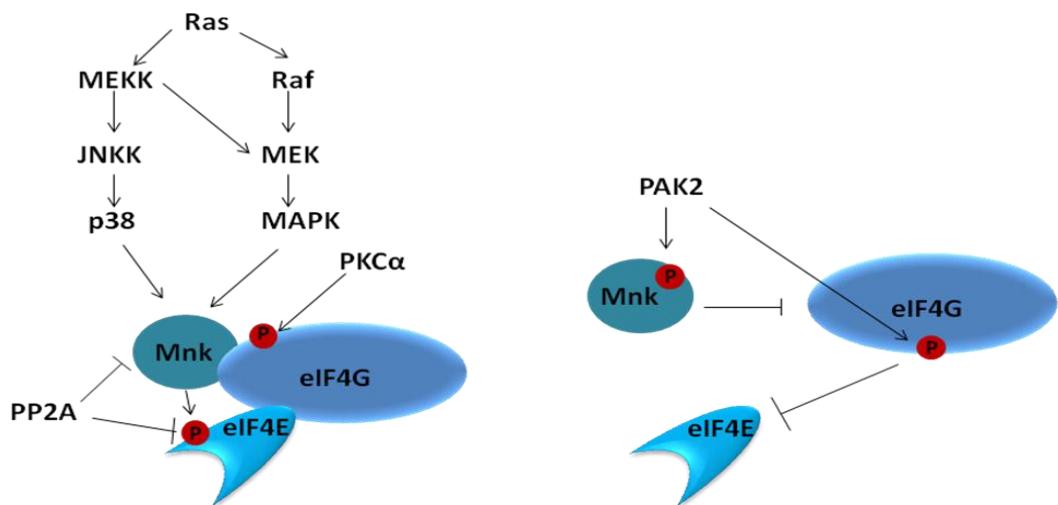


Figure 11 : Régulation de la phosphorylation d'EIF4E

L'activation de la voie Ras entraîne l'activation de MNK. MNK se lie à EIF4G et phosphoryle EIF4E. La PKC α peut stimuler l'association EIF4G/MnK en phosphorylant EIF4G. PP2A déphosphoryle MNK, ce qui inhibe son association avec EIF4G. Elle peut aussi déphosphoryler EIF4E. PAK2 peut phosphoryler MNK et EIF4G, perturbant leur association avec leur partenaire respectif EIF4G et EIF4E.

Il existe deux isoformes de MNK : MNK1 et MNK2 qui vont réguler différemment EIF4E. Contrairement à MNK1, MNK2 possède une activité basale très forte et n'est pas très sensible à l'activation de ERK et p38 (Map kinases en aval des voies de réponses à un signal mitogène ou à un stress). Mnk1 joue le rôle essentiel pour phosphoryler EIF4E en réponse aux stimuli extérieurs faisant intervenir la voie des MAPK. Mnk2 est capable de phosphoryler EIF4E mais beaucoup plus faiblement (Ueda et al., 2004). Chez la souris, Mnk1 et Mnk2

apparaissent comme les deux seules kinases capables de phosphoryler eIF4E, car eIF4E se retrouve non phosphorylé dans des mutants, double KO pour Mnk1 et Mnk2.

Ras est un proto-oncogène qui stimule en amont les voies de phosphorylation Raf/MEK/MAPK/MNK ou MEKK/JNKK/p38/MNK (figure 11), aboutissant à la phosphorylation d'eIF4E et à la transformation des cellules. Dans les cellules cancéreuses, eIF4E est largement retrouvé sous sa forme phosphorylée. De nombreuses études ont corrélé de manière positive la phosphorylation d'eIF4E avec la croissance cellulaire et l'augmentation de la traduction (Flynn and Proud, 1996; Gingras AC, 1999). Plus récemment, Furic et collab. ont montré que des souris exprimant une forme non phosphorylable d'eIF4E étaient résistantes au développement de tumeurs dans un modèle du cancer de la prostate (Furic et al., 2010). En culture, les cellules de ces souris sont résistantes à l'activation de la voie Ras et ne se transforment pas. La présence d'eIF4E phosphorylé favorise le développement de tumeur dans la prostate, et elle permet d'augmenter la traduction de certains ARNm spécifiques codant pour des protéines impliquées dans la tumorigénèse. La phosphorylation de la sérine 209 semble donc être nécessaire à la transformation de ces cellules même si à elle seule, elle est insuffisante pour provoquer la prolifération.

La régulation de la fonction d'eIF4E dans l'initiation de la traduction par la phosphorylation de la sérine 209 reste très discutée (Scheper and Proud, 2002). En effet, les souris double KO pour MNK1 et MNK2 se développent normalement et la synthèse protéique globale n'est pas affectée (Ueda et al., 2004), indiquant que la phosphorylation d'eIF4E n'est pas nécessaire dans le développement de la souris. McKendrick et al. ont également montré que la phosphorylation de la sérine 209 n'était pas requise pour la traduction en conditions de croissance normale (McKendrick et al., 2001). Au contraire, chez la drosophile, la mutation de la sérine 209 en alanine entraîne deux phénotypes : un retard dans le développement et des adultes de plus petite taille (Lachance et al., 2002). La phosphorylation de la sérine 209 a donc ici un effet physiologique important, qui varie selon les organismes.

Au niveau moléculaire, les études sont là aussi contradictoires. Marcotrigiano et collab. ont montré que la phosphorylation de la sérine 209 favorise l'interaction d'eIF4E avec la coiffe en formant un pont avec la Lys 159, ce qui stabilisera la coiffe (Marcotrigiano et al., 1997). Ces résultats ont ensuite été confirmés par Shibata et collab., par l'étude de l'interaction entre la coiffe et des mutants d'eIF4E sur la sérine 209 (Shibata et al., 1998). D'autres études de

fluorospectrométrie et de SPR (surface plasmon resonance) ont montré qu'au contraire, la phosphorylation sur eIF4E déstabilise la liaison avec la coiffe mais n'affecte pas la liaison avec 4E-BP1 ou eIF4G1 (Scheper and Proud, 2002; Scheper et al., 2002). Ces auteurs proposent deux modèles dans lesquels la phosphorylation d'eIF4E pourrait soit:

- libérer la coiffe juste après la formation du 43S, permettant celui-ci de scanner jusqu'au codon initiateur, et de laisser la coiffe libre pour la formation d'un deuxième complexe.

- dans le deuxième modèle, la phosphorylation se ferait après l'étape de reconnaissance du codon initiateur, permettant le relargage des acteurs, les rendant disponibles pour la traduction d'autres ARNm.

Régulation de la fonction d'eIF4E par la localisation

Comme nous l'avions évoqué plus haut, la disponibilité d'eIF4E pour eIF4G est régulée majoritairement par des protéines (4E-IPs) capables d'interagir compétitivement avec eIF4E sur le même site de liaison qu'eIF4G. En plus d'exercer une compétition avec eIF4G, certaines 4E-IPs peuvent réguler la formation du complexe eIF4F par la modification de la localisation d'eIF4E. En effet, si eIF4E est une protéine majoritairement cytoplasmique, une fraction de cette protéine est retrouvée au niveau du noyau (Iborra et al., 2001). Les mécanismes d'import et de séquestration d'eIF4E dans le noyau seront détaillés dans la partie deuxième partie de cette introduction (B.1) (Figure 16 p.64). Cette séquestration nucléaire d'eIF4E permet d'inhiber la synthèse protéique en prévenant l'association d'eIF4E et eIF4G dans le cytoplasme. eIF4E se localise également dans certaines structures cytoplasmiques qui sont les P-Bodies et les granules de stress (détails dans II.A.2).

Régulation d'eIF4E par la dégradation

Malgré l'importance du facteur eIF4E, très peu de données sont disponibles quant à la régulation de l'expression d'eIF4E au niveau de la protéine. Dans différentes lignées cellulaires humaines, eIF4E est ubiquitiné et dégradé de façon dépendante du protéasome en réponse à des métaux lourds (Othumpangat et al., 2005b; Othumpangat et al., 2005a). Chez la drosophile, Diap1 (Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein) interagit directement avec eIF4E, entraînant l'ubiquination d'eIF4E via son activité ubiquitine ligase E3, et la dégradation de celui-ci par le protéasome (Lee et al., 2007).

Dans les cellules humaines, eIF4E est en premier lieu ubiquitiné sur la lys-159 (Murata and Shimotohno, 2006). L'inhibition du protéasome par du MG132 entraîne l'augmentation du niveau d'eIF4E, suggérant qu'il existe bien une dégradation d'eIF4E dépendante du protéasome dans les cellules humaines. De plus, la phosphorylation d'eIF4E, sa liaison avec eIF4G ou encore la surexpression de 4E-BP protègent eIF4E de l'ubiquination et de la dégradation.

Un grand nombre de procédés, parfois peu étudiés, sont donc mis en œuvre pour contrôler eIF4E, ce qui impacte directement sur la régulation de la traduction coiffe-dépendante. Cependant, le mécanisme majeur de contrôle de la disponibilité d'eIF4E dans les cellules passe par la liaison d'eIF4E avec son répresseur 4E-BP, faisant de celui-ci une molécule clé pour comprendre les régulations fines du contrôle de l'expression des gènes. Le paragraphe suivant sera consacré à la description de cet acteur et aux mécanismes mis en œuvre pour réguler son association avec eIF4E.

C.2 4E-BP

4E-BP contrôle l'initiation de la synthèse protéique en se liant à eIF4E et en empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F. 4E-BP partage avec eIF4G un motif YXXXXLΦ (où Φ : acide aminé aliphatique (L, F ou M)) qui se lie sur la surface dorsale convexe d'eIF4E (Mader et al., 1995). 4E-BP est souvent considérée comme le répresseur de la synthèse protéique globale, faisant de la compréhension de sa régulation un point crucial pour comprendre la régulation de la traduction.

C.2.1 évolution et caractéristiques

Chez les mammifères, trois 4E-BPs ont été mises en évidence : 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 (Pause et al., 1994; Rousseau et al., 1996a; Poulin et al., 1998). Ces trois formes sont capables de fixer eIF4E et d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe. Les transcrits des trois 4E-BP sont localisés de façon ubiquitaire mais en quantité plus forte dans certains tissus:

- les ARNm de 4E-BP1 sont concentrés dans le muscle squelettique, le pancréas et le tissu adipeux
- les ARNm de 4E-BP2 sont très présents dans le foie et le rein, mais aussi le système nerveux central.

- les ARNm de 4E-BP3 sont en grande quantité dans le muscle squelettique, le pancréas, le cœur et les reins (Poulin et al., 1998).

Il n'y a que chez les chordés et chez les annélides qu'il existe plusieurs gènes codant pour 4E-BP par espèces. Chez les autres métazoaires, les protistes et les fungi, un seul gène orthologue à 4E-BP a été retrouvé. En revanche, il existe certains organismes et groupes taxonomiques non apparentés tels que *Caenorhabditis elegans*, *S. cerevisiae*, le groupe des plantes et des phéophycées (Cock et al., 2010), qui ne présentent dans leur génome aucun gène orthologue aux 4E-BPs (Hernandez, 2009). Le scénario évolutif proposé par Hernandez et collab. suggère qu'un 4E-BP ancestral est apparu assez tôt dans l'évolution des eucaryotes, permettant d'éteindre la traduction dépendante de la coiffe dans des conditions de stress environnementaux et nutritionnels. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'il existe une large distribution des orthologues de 4E-BPs chez les eucaryotes. Ce 4E-BP ancestral a ensuite été perdu dans certains groupes taxonomiques tels que les plantes, et s'est dupliqué chez les chordés et les annélides.

Les 4E-BPs sont impliqués dans de nombreux processus, tels que la progression du cycle cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire, la plasticité synaptique, la résistance aux infections virales, le métabolisme des graisses ou encore la réponse au manque de nourriture (Sonenberg and Hinnebusch, 2009), (Richter and Sonenberg, 2005), (Raught B., 2007; Sonenberg and Hinnebusch, 2007). Dans les cellules, 4E-BP est maintenant reconnu de manière incontestable comme un important régulateur de la synthèse protéique générale. Cependant, le rôle biologique de 4E-BP dans les organismes en développement n'a pas encore été clairement établi en raison du fait que la majorité des études concernant 4E-BP ont été faites sur des cellules en culture.

Chez les mammifères, le 4E-BP le plus étudié correspond au 4E-BP1. Des souris KO pour 4E-BP1 sont viables et présentent un métabolisme élevé avec une réduction du tissu adipeux (Tsukiyama-Kohara et al., 2001). Puisque les souris expriment trois 4E-BPs, il est difficile de savoir si le phénotype observé résulte de l'extinction de la fonction ancestrale de 4E-BP ou bien d'une fonction dérivée de 4E-BP1. Des études menées chez la drosophile (Teleman et al., 2005), qui ne possède qu'un seul 4E-BP, ont mis en évidence le rôle de 4E-BP dans le contrôle du métabolisme, et particulièrement l'accumulation des graisses. Alors que les drosophiles n'expriment pas de 4E-BP se développent normalement, la surexpression de 4E-BP entraîne une accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux, suggérant que la fonction

ancestrale de 4E-BP est celle d'un régulateur métabolique. 4E-BP joue donc le rôle de frein métabolique, qui ne semble pas actif lors du développement normal, mais qui permet de répondre à des stress tels que le jeûne pour contrôler la dépense énergétique de l'animal. De plus, lorsque 4E-BP est surexprimé chez les drosophiles placées en conditions de régime restrictif, il permet l'augmentation de la durée de vie en modulant l'activité de la mitochondrie via la régulation de la traduction de gènes mitochondriaux (Zid et al., 2009).

Un exemple de rôle physiologique de 4E-BP se retrouve chez l'oursin. L'oursin n'exprime également qu'un seul 4E-BP. Dans les ovules d'oursins, eIF4E est séquestré par 4E-BP, empêchant la traduction des ARNm maternels stockés dans l'œuf (Cormier et al., 2001). La fécondation déclenche la dissociation de 4E-BP et d'eIF4E, la dégradation de 4E-BP, et l'augmentation de la traduction des ARNm présents (Salaun et al., 2003). 4E-BP d'oursin aurait donc garder un rôle ancestral qui pourrait être celui d'un frein métabolique, cette fois-ci en conditions "normales" de développement, qui maintiendrait les ovules d'oursin dans un état "peu consommateur d'énergie" avant la fécondation.

Nous allons voir que de nombreuses régulations sont mises en place dans les cellules pour contrôler à la fois le niveau de 4E-BP cellulaire, mais également la fraction de 4E-BP capable de se lier à eIF4E.

C.2.2 Régulation

Par la transcription

4E-BP peut être régulé au niveau transcriptionnel. Chez la drosophile, un stress oxydatif ou une privation de nourriture (différent d'un régime restrictif) entraîne la phosphorylation du facteur de transcription dFO XO (Forkhead Box Protein O), qui rentre alors dans le noyau et active la synthèse de d4E-BP (Teleman et al., 2005), mais aussi la transcription des gènes de protéines mitochondrielles (Teleman et al., 2008). Dans le cas du régime restrictif évoqué plus haut, dFO XO n'est pas nécessaire à l'induction de la protéine d4E-BP suggérant qu'il existe des mécanismes différents pour réguler 4E-BP entre une privation complète de nourriture et un régime restrictif (Zid et al., 2009).

Chez les mammifères, un autre type de régulation transcriptionnelle a été mis en évidence dans des cellules hématopoïétiques, où la transcription de 4E-BP est inhibée par ERK et p38, dans une voie dépendante de EGR1 (Rolli-Derkinderen et al., 2003). Dans les cellules du pancréas, l'expression du gène 4E-BP1 est dépendante du facteur de transcription ATF4

lorsqu'un stress est généré au niveau du réticulum endoplasmique des cellules endocrines de type β (Yamaguchi et al., 2008). Dans les cellules exocrines du pancréas, SMAD4 (Similar Mothers Against Decapentaplegic homolog 4) lie directement le promoteur de 4E-BP1 et la transcription de 4E-BP1 dépendante de TGF β -SMAD est essentielle pour l'inhibition de la prolifération cellulaire médiée par TGF β (Azar et al., 2009).

Par la phosphorylation

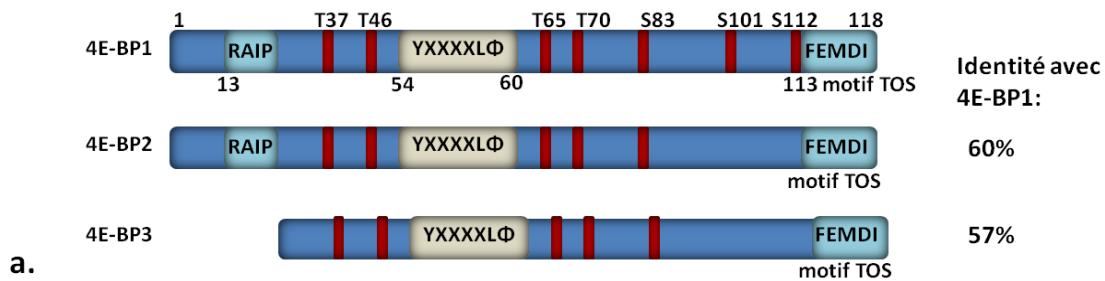
La phosphorylation de 4E-BP sur plusieurs sites affecte son association avec eIF4E, qui est ainsi libre pour interagir avec eIF4G et initier la traduction (Gingras AC, 1998). Néanmoins, nous verrons dans ce paragraphe que le contrôle de l'association/dissociation de 4E-BP à eIF4E par phosphorylation reste discuté.

Les 4E-BPs sont directement phosphorylés par la voie FRAP/mTOR, en aval de l'activation de la voie de signalisation PI3Kinase-Akt (Figure 12c) en réponse à la disponibilité des acides aminés, du statut de l'énergie cellulaire, de nombreuses situations de stress, et de stimulations variées par les hormones, les facteurs de croissance, etc... (Richter and Sonenberg, 2005; Raught B., 2007; Ma and Blenis, 2009).

Les sites de phosphorylation sur 4E-BP et la protéine TOR sont très conservés, même entre des espèces relativement distantes phylogénétiquement (Goldberg et al., 2006) (Hall, 2008), (Engelman et al., 2006; Bhaskar and Hay, 2007), suggérant que la régulation de 4E-BP par phosphorylation est apparue très tôt dans l'évolution des eucaryotes. L'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de la kinase FRAP/mTOR, empêche la phosphorylation de 4E-BP et bloque le cycle cellulaire en phase G1. Beretta et collab ont montré que la rapamycine inhibait seulement la synthèse protéique dépendante de la coiffe (Beretta et al., 1996).

Chez les mammifères, la phosphorylation de 4E-BP1 et 4E-BP2 est stimulée par l'insuline entraînant la dissociation d'eIF4E dans les adipocytes. Ces modifications sont sensibles à la rapamycine (Lin and Lawrence, 1996). En revanche, la régulation de 4E-BP3 est différente. Dans des cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 cultivées sans sérum, 4E-BP3 se dissocie d'eIF4E alors que les complexes 4E-BP1/eIF4E augmentent (Kleijn et al., 2002). En réponse à l'insuline, 4E-BP3 et eIF4E se réassocient, alors que 4E-BP1 et eIF4E se dissocient. Étrangement, la rapamycine n'exerce aucun effet sur l'association entre 4E-BP3 et eIF4E, suggérant que la régulation qui s'exerce sur 4E-BP3 est indépendante de la voie mTOR et est différente de celle appliquée aux autres 4E-BPs.

Les sites de phosphorylations :



Ordre de phosphorylation	Formes liées à eIF4E	Formes non liées à eIF4E	références
Non(P)→Thr37/Thr46→Thr70→Thr65	Non(P) Thr37/Thr46	Thr37/Thr46/Thr70/Thr65	(Gingras et al. 2001) (Niedzwiecka et al. 2002) (Wang et al. 2005)
Non(P)→Thr70→Thr37/Thr46→Thr65	Non(P) Thr70	Thr37/Thr46/Thr70 Thr37/Thr46/Thr70/Thr65	(Ayuso et al., 2000)

b.

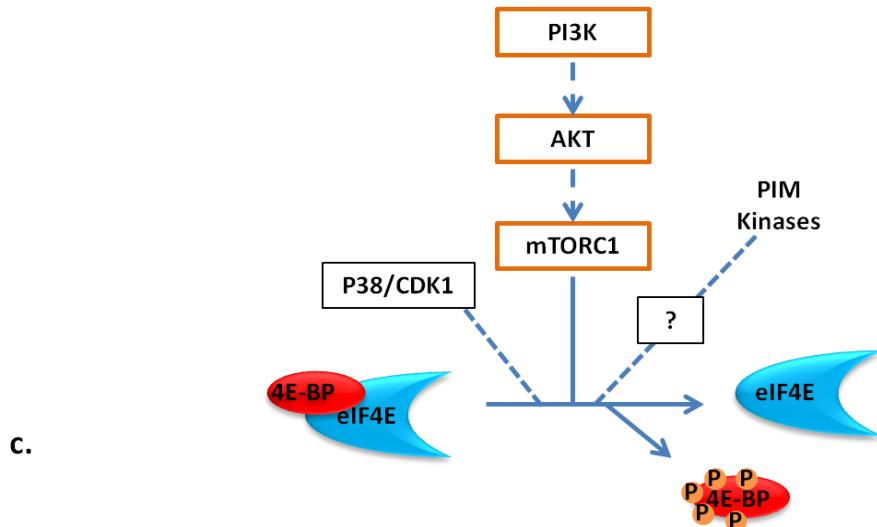


Figure 12 : Régulation de la phosphorylation de 4E-BP

(a) sites de phosphorylation et motifs de régulation sur les 4E-BPs

Localisation des thréonines (T) et des séries (S) décrites comme des sites de phosphorylation sur les 4E-BP1. Les motifs de fixation pour Raptor, RAIP et TOS (séquence FEMDI), et le site de liaison à eIF4E YXXXXLΦ sont également indiqués. Les nombres correspondent aux positions des acides aminés sur la séquence 4E-BP1 humaine.

(b) Hiérarchisation des phosphorylations de 4E-BP1 et caractéristiques d'interaction avec eIF4E.(adapté d'Ayuso et al., 2010)

1ère ligne : modèle établi par Gingras en culture cellulaire. 2ème ligne : modèle établi par Ayuso en condition d'ischémie et de reperfusion du cerveau de rat (pour plus de détails, voir le texte)

(c) Voies de signalisations impliquées dans la phosphorylation de 4E-BP1 (adapté de Martineau et al., 2012)

Suite à la stimulation de la voie oncogénique PI3K/Akt-mTOR, 4E-BP est phosphorylé par le complexe mTORC1. Dans certaines conditions, la phosphorylation de 4E-BP peut dépendre d'autres kinases, comme p38, CDK1 ou encore les PIM kinases. Le lien entre les kinases PIM et 4E-BP n'a pas été établi.(voir le texte pour plus de détails)

La sérine 65 a été le premier site de phosphorylation identifié après phosphorylation *in vitro* du 4E-BP1 de souris par la MAPK (Haystead et al., 1994). Quatre autres sites ont ensuite été découverts par la même technique sur le 4E-BP1 de rat : Thr 37, Thr46, Thr 70, Ser 83 (positions correspondantes au 4E-BP1 humain) (Fadden et al., 1997) (Figure 12a). La phosphorylation des sites 37, 46, 65 et 70 se fait de manière rapamycine dépendante, tandis que la régulation de la phosphorylation de la sérine 83 est inconnue. La phosphorylation de la ser83 est indépendante de la stimulation à l'insuline et non sensible à la rapamycine (Mothe-Satney et al., 2000).

4E-BP est phosphorylé en plusieurs étapes (Gingras AC, 1999). Les sites Thr 37 et Thr 46 sont phosphorylés en premier par FRAP/mTOR. Ces phosphorylations sont relativement insensibles à la rapamycine et à la privation en sérum, elles sont également insuffisantes pour dissocier le complexe eIF4E/4E-BP. Elles sont par contre nécessaires pour la phosphorylation de la Thr70, elle-même requise pour la phosphorylation de la Ser 65 (Gingras AC, 1999; Gingras et al., 2001a). Gingras et collab. ont montré que la phosphorylation de la Ser 65 et la Thr70 seules ne suffisaien pas à décrocher 4E-BP d'eIF4E (Gingras et al., 2001a). Jusqu'en 2009, il était alors communément admis que c'était la combinaison de ces 4 phosphorylations qui permettait la séparation entre eIF4E et 4E-BP (Gingras et al., 2001b; Niedzwiecka et al., 2002; Wang et al., 2005). Cette hiérarchisation des phosphorylations a ensuite été remise en cause par Ayuso et collab. (Ayuso et al., 2010). En effet, dans un contexte d'ischémie et de reperfusion plus ou moins longue du cerveau de rat, la rephosphorylation de 4E-BP1 dans ces tissus se fait dans un ordre différent de celui amené par Gingras et al. (2001) (Figure 12b). L'ischémie entraîne la déphosphorylation de 4E-BP1 sur les sites Thr70 (qui peut parfois rester phosphorylée), Thr37, Thr46 et Thr65 (sites numérotés selon les sites humains). Après reperfusion, la phosphorylation de la Thr70 se fait en premier, suivie par celle des sites Thr37/Thr46, puis celle de la Thr65 en dernier. Seul 4E-BP1 non phosphorylé et 4E-BP1 phosphorylé sur la Thr70 sont retrouvés en complexe avec eIF4E. À l'exception de cette

étude, aucune donnée n'est disponible quant à la régulation de la phosphorylation des sites dans des conditions physiologiques, ce qui semble pourtant crucial pour élucider le rôle physiologique de la phosphorylation de 4E-BP.

Deux autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur le 4E-BP1 humain : la Ser 101 (Wang et al., 2003) et la Ser 112 (Heesom et al., 1998) et ne sont pas présents dans 4E-BP2 et 4E-BP3. Ces phosphorylations sont insensibles à la rapamycine et constitutives, ou n'affectent pas la liaison de 4E-BP1 à eIF4E (Proud, 2007; Raught B., 2007).

Dans des contextes physiologiques particuliers, d'autres voies de signalisation peuvent jouer un rôle dans la phosphorylation (Figure 12c). Il a été proposé que la phosphorylation de 4E-BP1 au cours du cycle cellulaire soit dépendante de la voie en G1 mTOR (Pyronnet and Sonenberg, 2001) et de la cycline CDK1 en mitose (Heesom et al., 2001). De même, lors d'un stress cellulaire provoqué par des UVB, la phosphorylation de 4E-BP1 semble indépendante de la voie PI3-Akt qui mène à l'activation de mTOR, et est activée par la voie inductible par le stress p38 (Liu et al., 2002). Dans certaines lignées cellulaires provenant de tumeurs solides ou hématologiques, la phosphorylation de 4E-BP1 devient résistante à la rapamycine (Chen et al., 2005; Gong et al., 2009). Cette résistance est corrélée avec l'activation des kinases PIM, mais les mécanismes reliant ces kinases à la phosphorylation de 4E-BP1 n'ont pas encore été identifiés. Au niveau des neurones dopaminergiques de drosophile, la kinase LRKK2 (leucine-rich repeat kinase 2) peut phosphoryler le 4E-BP, et donc stimuler la synthèse protéique, atténuant la résistance au stress oxydatif et la survie des neurones (Imai et al., 2008).

Il existe également des mécanismes pour déphosphoryler 4E-BP. Peterson et collab. ont montré que 4E-BP1 pouvait s'associer à PP2A (Peterson et al., 1999), suggérant fortement que cette phosphatase déphosphoryle 4E-BP1. Depuis, d'autres études ont confirmé le rôle de PP2A dans la régulation de 4E-BP1 (Wang et al., 2005) et ont montré que la stimulation de la voie mTOR entraîne la séquestration de PP2A dans un complexe PP2A- α 4 à l'écart de 4E-BP1 (Inui et al., 1998; Kong et al., 2004).

La régulation de 4E-BP par phosphorylation soulève encore aujourd'hui de nombreuses questions. Les quatre sites de phosphorylations conservés sur 4E-BP (T37,T46,S65,T70) sont certes nécessaires pour perturber l'association eIF4E/4E-BP *in vitro*, mais néanmoins pas suffisants pour permettre la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP (Oulhen et al., 2009).

Youtani et collab. ont proposé un modèle selon lequel la phosphorylation de 4E-BP ne pouvait avoir un effet que si 4E-BP n'est pas lié à eIF4E (Youtani et al., 2000). Ces données suggèrent qu'il existe un mécanisme supplémentaire pour réguler 4E-BP. Un autre mécanisme de régulation sera présenté dans la partie dégradation de 4E-BP. La localisation des phosphorylations sur 4E-BP soulève aussi la question de savoir quelles sont les parties de 4E-BP impliquées dans l'interaction avec eIF4E, puisque certaines phosphorylations sont distantes du motif de liaison à eIF4E YXXXXLΦ. Cette question sera abordée dans la partie structure.

Les motifs RAIP et TOR

La kinase FRAP/mTOR est impliquée dans deux complexes : mTORC1 et mTORC2. C'est dans le complexe mTORC1 qu'elle phosphoryle 4E-BP mais aussi S6K (la kinase S6) pour réguler la synthèse protéique. Ce complexe est composé de Raptor (Regulatory associated protein of mTOR), mTOR et mLST8.

En 2002, Tee et Proud ont mis en évidence l'existence d'un motif sur 4E-BP1 en N-terminal, contenant une arginine, alanine, isoleucine et proline (RAIP) nécessaire à la phosphorylation de celui-ci et à la dissociation d'eIF4E (Tee and Proud, 2002). Ce motif se retrouve également sur 4E-BP2, mais pas 4E-BP3, montré comme incapable de se dissocier d'eIF4E lors d'une stimulation à l'insuline. En produisant une chimère de 4E-BP3 portant le motif RAIP, Tee et Proud ont montré que le motif RAIP était indispensable à la régulation de 4E-BP par l'insuline.

Un second motif, TOS, a été mis en évidence la même année par Schalm et Blenis sur la kinase S6K1 (Schalm and Blenis, 2002). Ce motif, composé de 5 acides aminés (FDIDL), est essentiel à l'activité de la kinase, mais aussi à sa régulation par FRAP/mTOR. Il est très conservé au cours de l'évolution et se retrouve également chez les 4E-BP1, 2 et 3, au niveau de l'extrémité C-terminale, avec la séquence FEMDI (Figure 12 a).

Ces deux motifs RAIP et TOS sont importants pour réguler la phosphorylation de 4E-BP1. TOS joue un rôle essentiel pour l'interaction avec Raptor (Beugnet et al., 2003; Choi et al., 2003). Les mutants de TOS limitent la phosphorylation de la Thr70 et inhibent complètement celle de la Ser 65 (Beugnet et al., 2003). En revanche, le rôle du motif RAIP est plus controversé. Ce motif n'est pas suffisant pour permettre l'interaction avec Raptor (Beugnet et al., 2003), mais une mutation dans le motif RAIP diminue l'association de 4E-BP1 avec

Raptor (Choi et al., 2003). Les mutants de RAIP inhibent cependant la phosphorylation des Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70. Lee et al ont tranché en montrant que le motif TOS est essentiel pour l'interaction avec Raptor, mais n'est néanmoins pas suffisant, tandis que le motif RAIP n'est pas indispensable, mais participe à l'interaction avec Raptor (Lee et al., 2008). Ils suggèrent qu'il existe d'autres régions dans 4E-BP1 qui sont impliquées dans l'interaction avec Raptor.

Par la dégradation :

La dégradation de 4E-BP a été mise en évidence pour la première fois chez l'oursin (Cormier et al., 2001) et est associée à son état de phosphorylation puisqu'elle est sensible à la rapamycine (Salaun et al., 2003). La dégradation de 4E-BP1 par le protéasome dans des cellules humaines a été montrée à plusieurs reprises (Walsh and Mohr, 2004; Walsh et al., 2005; Wan et al., 2005) sans aucune mention d'une possible ubiquitination de la protéine.

Dans des cellules humaines de Jurkat de la lignée lymphocytaire T, 4E-BP1 peut être polyubiquitiné lorsqu'il est hyperphosphorylé, et former des protéines 4E-BP1 de haut poids moléculaire (Elia et al., 2008). L'inhibition du protéasome par le MG132 affecte légèrement l'accumulation de ces formes de 4E-BP1, suggérant que le protéasome dégrade en partie la forme 4E-BP1 ubiquitinée. En revanche, l'inhibition des activités phosphatases par la calyculine A stimule l'apparition de ces formes qui sont incapables de se lier à eIF4E, montrant que la phosphorylation de 4E-BP1 est essentielle pour l'ubiquitination de celui-ci.

De manière intéressante, l'activation de p53 stimule le clivage de 4E-BP1 par le protéasome (Constantinou et al., 2008). 4E-BP1 tronqué ne peut plus être phosphorylé et interagit de manière plus stable avec eIF4E1. Il existe donc une double régulation exercée par p53 en conditions de stress, qui inhibe d'une part la transcription *de novo* d'eIF4E1 (voir ci-dessus la régulation d'eIF4E par la transcription), et la disponibilité d'eIF4E1 pour la machinerie de traduction en tronquant 4E-BP1 d'autre part.

Au niveau de la dégradation de 4E-BP, le protéasome joue donc deux rôles selon l'état de phosphorylation de la protéine. La forme hyperphosphorylée et ubiquitinée est dégradée en partie par celui-ci, tandis que la forme hypophosphorylée peut être clivée et stabilisée lors d'une activation de p53. Une toute dernière étude a cependant démontré que dans des cellules où l'expression d'eIF4E était artificiellement drastiquement réduite, 4E-BP1 hypophosphorylé était dégradé par le protéasome à la suite de son ubiquitination par une ubiquitine ligase E3

(Yanagiya et al., 2012). La relevance de ces résultats et la possibilité d'observer un tel phénomène dans des conditions physiologiques seront discutées à la suite des résultats obtenus sur la structure de 4E-BP.

C.2.3 Structure et zones d'ombre

4E-BP est décrite comme étant une protéine complètement désordonnée (Fletcher, 1998), c'est-à-dire qu'elle ne possède aucune structure de degré secondaire. Lorsque 4E-BP s'associe avec eIF4E, il est communément admis que seule la région centrale de 4E-BP, qui contient le motif de liaison à eIF4E (YXXXXLΦ), se structure en formant une région en forme de L, avec une courte hélice alpha (Fletcher, 1998; Marcotrigiano et al., 1999).

La comparaison de l'association entre eIF4E1 et un peptide 4E-BP1 (résidus 51 à 67 (mammifère)) ou un peptide eIF4G2 (résidus 621 à 637(mammifère)) contenant le motif YXXXXLΦ montre que le peptide 4E-BP1 lié à eIF4E mime de manière exacte la liaison avec eIF4G (Marcotrigiano et al., 1999). Seules les extrémités N et C-terminale des peptides liés à eIF4E présentent une conformation différente qui permet à 4E-BP de lier plus étroitement eIF4E. Cette conformation présente une explication quant au fait que l'affinité du peptide 4E-BP1 est plus forte que celle du peptide eIF4G2 pour eIF4E.

Cependant, l'empreinte en RMN (résonance magnétique nucléaire) de 4E-BP sur eIF4E ne se limite pas à la région liée par le peptide central de 4E-BP. Elle englobe d'autres sites d'eIF4E, suggérant qu'il existe d'autres types de liaisons entre eIF4E et 4E-BP (Matsuo et al., 1997). En utilisant une méthode d'analyse structurale de diffusion aux petits angles (SAXS), nous avons démontré que 4E-BP se compacte autour d'eIF4E et établit des contacts dynamiques avec celui-ci en dehors de la surface dorsale convexe (Gosselin et al., 2011) (voir Résultats chapitre1). Dans ce sens, le 4E-BP1 entier présente plus d'affinité pour eIF4E que le peptide issu de 4E-BP1 (Tomoo et al., 2006). Tout dernièrement, Paku et collab. ont mis en évidence un motif sur 4E-BP1, en C-terminal, qui joue un rôle important dans la liaison eIF4E/4E-BP en stabilisant l'interaction (Paku et al., 2012), déjà évoqué par Mizuno et al. (Mizuno et al., 2008).

Des données biochimiques suggèrent également qu'il existe d'autres régions que le peptide central sur 4E-BP capable d'interagir avec eIF4E. En effet, un composant 4EGI-1 (eIF4E/eIF4G inhibitor) est capable d'inhiber la liaison entre eIF4G et eIF4E sans pour autant

perturber l'association de 4E-BP à eIF4E. eIF4G et 4E-BP ayant seulement en commun le site consensus de liaison à eIF4E, d'autres sites sur 4E-BP pour lier eIF4E doivent exister pour lui permettre de maintenir l'interaction avec eIF4E (Moerke et al., 2007). Cette donnée a très dernièrement été remise en question par les travaux de Mc Mahon et collab. (McMahon et al., 2011) qui montrent que de faibles quantités de 4EGI-1, insuffisantes pour dissocier le complexe eIF4F, permettent toujours la répression de la traduction. 4EGI-1 augmenterait en réalité l'association des ribosomes avec eIF2 α phosphorylée, formant ainsi des complexes inactifs, remettant en question son action sur le complexe eIF4E/eIF4G.

Plusieurs questions sur les 4E-BPs ont été abordées par des études structurales et biophysiques. La première concerne la capacité des 4E-BPs à modifier l'affinité d'eIF4E pour la coiffe.

La liaison de 4E-BP1 ou 4E-BP2 sur eIF4E stabilise l'interaction d'eIF4E avec la coiffe, et inversement, l'interaction avec la coiffe stabilise l'association des 4E-BPs avec eIF4E (Miyoshi et al., 1999; Youtani et al., 2000). 4E-BP2 va avoir la plus forte affinité pour eIF4E, lié ou non avec la coiffe (Abiko et al., 2007). Les trois protéines possèdent la même constante d'association, mais présentent une constante de dissociation différente, montrant un ordre d'affinité croissant 4E-BP1<4E-BP3<4E-BP2. Ptushkina et collab. ont déterminé que les acides aminés qui suivent en 3' le site consensus de liaison à eIF4E : MEC sur 4E-BP1 et LDR sur 4E-BP2 sont responsables de la différence d'affinité entre ces deux 4E-BPs (Ptushkina et al., 1999). En effet, l'arginine de la séquence LDR sur 4E-BP2 apporte une charge positive supplémentaire et augmente l'interaction avec eIF4E.

La seconde question concerne l'effet de la région N-terminale d'eIF4E sur la liaison d'eIF4E et 4E-BP. Cette région est importante pour l'association eIF4E-eIF4G mais se retrouve souvent déléteée dans les études structurales du fait de son caractère désordonné.

La région N-terminale (1-33) d'eIF4E joue un rôle inhibiteur dans l'association avec 4E-BP1 et 4E-BP2, mais pas 4E-BP3 (Abiko et al., 2007). En comparant les séquences en acides aminés des trois 4E-BPs, on remarque que la séquence de l'extrémité N-ter de 4E-BP3 est beaucoup plus courte, suggérant que la répression de l'association s'exerce sur l'extrémité N-ter des 4E-BPs. Cette différence structurale présente également une piste pour comprendre la différence qu'il existe entre les mécanismes de régulation des 4E-BPs par phosphorylation, mécanismes énoncés en I.C.2.2.

La phosphorylation des 4E-BPs se présentant comme un mécanisme majeur dans le contrôle de l'association 4E-BP-eIF4E, certaines études se sont intéressées à l'effet des phosphorylations sur la structure désordonnée de 4E-BP.

La phosphorylation de la sérine 65 augmente la rigidité structurale de 4E-BP1 en complexe avec eIF4E (Tomoo et al., 2005). Cette phosphorylation a elle seule n'est pas capable d'empêcher la liaison entre eIF4E et 4E-BP mais, d'après une étude plus récente (Tait et al., 2010), elle joue le rôle de modulateur structural intramoléculaire. La phosphorylation de la ser65 déstabilise la formation de l'hélice alpha (puisque elle est à la base de l'hélice alpha dont la formation est nécessaire pour la liaison avec eIF4E) au profit d'une conformation désordonnée qui ne peut lier eIF4E. En effet, 4E-BP1 subit une transition désordre/ordre lors de la liaison à eIF4E. Pour expliquer la hiérarchisation des phosphorylations établie par Gingras et collab. (Gingras et al., 2001a), Gross et collab. ont construit un modèle moléculaire à partir de la structure cristallographique du peptide 4E-BP1 lié à eIF4E en y ajoutant les séquences adjacentes contenant les sites de phosphorylations Thr37, Thr46 et Thr65 et Thr70. La conformation structurale obtenue suggère alors que la hiérarchie des phosphorylations s'explique par l'accessibilité des sites de phosphorylations, la première phosphorylation des sites en N-terminal permettant l'accessibilité des sites en C-terminal.

A partir de ces études biophysiques et du modèle mis en place par Youtani et collab. remettant en cause de l'effet de la phosphorylation de 4E-BP lorsqu'il est déjà associé à eIF4E (Youtani et al., 2000), il est important de souligner que l'impact des phosphorylations sur la liaison eIF4E/4E-BP semble plus fort lorsque celles-ci s'exercent sur un 4E-BP *libre* plutôt que lorsqu'il est déjà complexé à eIF4E.

Dans le paragraphe suivant seront abordées l'implication et l'importance de ces deux acteurs dans les mécanismes de transformation cellulaire et de cancérogenèse.

D. EIF4E/4E-BP et cancer

La division des cellules est le résultat de la balance entre l'expression de gènes qui stimulent et permettent la division, et ceux qui l'inhibent. Le rôle essentiel d'eIF4E dans le contrôle de l'initiation de la traduction, donc de l'expression des gènes, fait de cet acteur une protéine à forte propriété oncogénique (Sonenberg, 2008). Ce rôle place également 4E-BP dans le rôle d'un suppresseur de tumeur important (Martineau et al., 2012). Ces deux acteurs

sont soumis à de nombreuses régulations qui contrôlent leur niveau d'expression (détailé ci-dessus). La perturbation de chacune de ces régulations entraîne un dysfonctionnement dans la cellule pouvant conduire à la transformation de celle-ci.

Bien qu'eIF4E soit essentiel à la survie cellulaire, sa surexpression crée certaines dérégulations au niveau de la prolifération et de la transformation cellulaire. La surexpression artificielle de la protéine eIF4E entraîne la transformation de cellules NIH-3T3 en cellules tumorales et l'apparition d'une tumeur suite à leur injection dans des souris nudes (Lazaris-Karatzas et al., 1990). La protéine eIF4E est capable de coopérer avec les oncogènes c-myc et l'adénovirus E1A pour entraîner la transformation de fibroblastes d'embryons de rat (Lazaris-Karatzas and Sonenberg, 1992).

eIF4E joue donc le rôle d'un oncogène (Sonenberg, 2008) et génère des tumeurs dans différents tissus lorsqu'il est surexprimé (Ruggero et al., 2004). Les mécanismes exacts par lesquels eIF4E et le complexe eIF4F induisent la transformation oncogénique sont extrêmement débattus. Cependant, l'augmentation de la traduction d'un groupe d'ARNm impliqués dans des procédés cellulaires, tels que la prolifération, l'angiogenèse, ou la survie cellulaire pourrait être en partie responsable de la transformation (Konicek et al., 2008) (Silvera et al., 2010). Les ARNm potentiellement ciblés par cette régulation comprennent ceux codant pour la cyclin D1, ODC, CDK2, cMYC, Mcl-1, Bcl-2, VEGF, FGF2 or MMP9 (Clemens, 2004; Mamane et al., 2004; Hsieh and Ruggero, 2010). Ces transcrits ont de longues régions 5'UTR riches en G/C, qui forment des structures "hairpin" complexes nécessitant l'activité d'eIF4A pour permettre l'étape de scan du 40S. Ces ARNm sont appelés "ARNm faibles", parce qu'ils sont très peu traduits en conditions normales. L'hypothèse en vigueur est qu'ils pourraient l'être beaucoup plus lorsque l'activité du complexe eIF4F augmente dans les cellules.

La protéine eIF4E est surexprimée dans des lymphomes non-hodgkinien (Wang et al., 1999) et très abondante dans les cancers du sein (Miyagi et al., 1995; Anthony et al., 1996), son abondance dans ce cancer étant associée à l'agressivité de la tumeur (Li et al., 1997). eIF4E est largement retrouvé phosphorylé sur la sérine 209 dans les cellules cancéreuses. Nous avons vu dans I.C.1.3 qu'une mutation sur ce site empêche la transformation cellulaire, suggérant que la phosphorylation joue un rôle important dans le processus de cancérogenèse.

À la suite de toutes ces observations, eIF4E est devenu un indicateur du pronostic et une cible potentielle pour lutter contre les cancers (Sonenberg, 2008). De nombreuses stratégies sont mises au point en ciblant plusieurs aspects:

- la déstabilisation de l'interaction eIF4E/eIF4G,
- la déstabilisation de l'interaction d'eIF4E avec la coiffe,
- l'inhibition de la phosphorylation d'eIF4E par les MNK, puisque cette phosphorylation n'affecte pas le développement normal de l'animal,
- l'utilisation une stratégie anti-sens pour cibler eIF4E,
- ou encore la désactivation de la phosphorylation de 4E-BP par la voie mTOR (Hsieh and Ruggero, 2010).

De par son rôle inhibiteur sur l'initiation de la traduction, 4E-BP peut être considérée comme un suppresseur de tumeur (Martineau et al., 2012). La surexpression de 4E-BP1 ou 4E-BP2 réverse le phénotype tumoral associé à la surexpression d'eIF4E (Rousseau et al., 1996b). C'est l'état de phosphorylation de 4E-BP qui joue un rôle important dans les processus de transformation cellulaire et le développement des cancers. En effet, la phosphorylation de 4E-BP1 est un indicateur de la progression de la maladie dans les cancers du sein ou de la prostate par exemple, et l'analyse de cette protéine permet d'identifier des patients à haut risque (Armengol et al., 2007; Rojo et al., 2007). 4E-BP est donc également une cible thérapeutique majeure, rendant indispensable la compréhension des mécanismes fins qui régulent l'association/dissociation du complexe eIF4E/4E-BP.

Cette partie d'introduction a permis de mettre en place les connaissances nécessaires pour comprendre l'importance de la traduction coiffe-dépendante chez les eucaryotes dans le contrôle de l'expression des gènes. Après avoir introduit les multiples mécanismes mis en œuvre pour réguler la traduction des ARNm dans une cellule, nous nous sommes concentrés sur le facteur eIF4E, un acteur clé dans l'étape d'initiation de la traduction et une cible majeure du contrôle traductionnel, et son répresseur 4E-BP, le régulateur général de la synthèse protéique dans la majorité des cellules eucaryotes. Dans la seconde partie de l'introduction, nous aborderons la complexité des régulations établies pour contrôler la disponibilité d'eIF4E chez les eucaryotes, faisant intervenir des protéines 4E-BP-like, appelées aussi 4E-IPs. Cette partie permettra d'avoir une vision actualisée du réseau d'interaction entre eIF4E et ses partenaires, auquel s'intègrera Angel1 le nouvel interactant découvert au cours de cette thèse.

II. eIF4E et ses 4E-IPs, un réseau d'interactions complexes dans le contrôle post transcriptionnel de l'expression des gènes

Des 4E-BPs aux 4E-IPs

Bien qu'eIF4E ait été identifié comme un facteur d'initiation de la traduction à la fin des années 70 (Sonenberg et al., 1978), et que de nombreuses études se soient focalisées sur cette fonction, il apparaît de plus en plus clair que la fonction d'eIF4E soit plus complexe qu'un simple rôle d'interrupteur de la synthèse protéique. En effet, les années 1990 ont vu passer le statut d'eIF4E de facteur limitant pour l'étape d'initiation de la traduction à pivot central dans le contrôle de plusieurs aspects de la régulation post transcriptionnelle de l'expression des gènes.

La fonction spécifique de chaque molécule d'eIF4E dans la cellule dépend du partenaire protéique avec lequel elle est associée. En plus d'eIF4G et des 4E-BPs qui déterminent le rôle d'eIF4E dans l'étape d'initiation de la traduction globale, la découverte de nouveaux partenaires d'eIF4E dans le noyau et dans le cytoplasme a permis de pénétrer un peu plus dans la complexité du rôle biologique d'eIF4E.

Ces 4E-IPs ont été découvertes indépendamment dans de nombreuses espèces (Table 2), avec une séquence et une structure totalement différentes de celles décrites pour les 4E-BPs. La plupart partagent un site consensus similaire de liaison à eIF4E retrouvé dans les 4E-BPs et eIF4Gs : YXXXXLΦ (à l'exception de PRH, Maskin, Protein Z, CYFIP1 et BTF3 (non présenté ici)) mais ne sont aucunement reliées phylogénétiquement aux 4E-BPs ni même entre elles.

Les 4E-IPs ont des fonctions très diverses : certaines jouent le rôle de répresseur traductionnel de manière générale (p20), ou de certains ARNm spécifiques (NGD, Maskin), d'autres jouent des rôles additionnels, notamment dans le contrôle de la transcription (Bicoid), du cycle cellulaire et de l'apoptose (PML, Diap1 (drosophile)) ou encore des processus d'infections virales (Z protein). De par leur diversité évolutive et fonctionnelle, l'action de ces protéines *via* eIF4E se porte sur des mécanismes complètement différents, qui vont de la répression

traductionnelle d'ARNm spécifiques impliqués dans des processus développementaux, comme l'ovogenèse chez le xénope (Stebbins-Boaz et al., 1999) à la neurogenèse chez la souris (Jung et al., 2006). L'action de ces protéines peut également se porter sur de nouveaux rôles attribués à eIF4E touchant le stockage et la dégradation des ARNm au niveau de corps cytoplasmiques, ou bien touchant l'export nucléaire des ARNm.

Dans cette deuxième partie d'introduction, je tiens à mettre l'accent sur le fait que l'émergence des 4E-IPs a contribué à moduler le rôle d'eIF4E sur plusieurs aspect du contrôle post transcriptionnel de l'expression des gènes. Dans une cellule, l'environnement moléculaire d'eIF4E dépend essentiellement du compartiment dans lequel ce dernier est situé.

Je montrerai dans un premier temps par des exemples concrets que l'apparition de nouveaux partenaires d'eIF4E au niveau cytoplasmique a permis la mise en place d'une inhibition spécifique de la traduction, impliquant des régulations ciblées sur des mécanismes associés notamment au développement. D'autres 4E-IPs au niveau du cytoplasme vont plutôt réguler la fonction d'eIF4E au niveau des P-Bodies ou des Granules de Stress. Pour caractériser la complexité fonctionnelle de ces régulations, j'amènerai l'idée de contrôle multifonctionnel du devenir d'un ARNm, dans laquelle la régulation d'eIF4E prend tout son sens.

Dans un deuxième temps, j'exposerai l'implication des 4E-IPs au niveau du noyau, qui vont jouer sur la fonction d'eIF4E dans l'export nucléaire d'ARNm spécifiques. Je terminerai en m'intéressant de plus près à cette interaction clé/serrure qui caractérise l'association entre eIF4E et ses partenaires, et semble faire l'objet d'un mécanisme universel pour le contrôle des fonctions d'eIF4E.

4E-IP	Espèces étudiées	Motif de liaison à eIF4E	fonctions	Références
p20	Sc	YTIDELFQL	Inhibiteur de la traduction	(Altmann et al., 1997)
Maskin	X,H,M	TEADFL	Réprime la traduction des ARNm contenant CPE	(Stebbins-Boaz et al., 1999)
Neuroguidin (NGD)	H,D,C,M	YPTEKGL, YQIDKLV, YVPPRLV	Réprime la traduction des ARNm contenant CPE	(Jung et al., 2006)
Bicoid	D	YIRPYLP	Réprime la traduction de l'ARNm caudal	(Rivera-Pomar et al., 1996)
CYFIP1	H,C,M	LLLLDKRKSEC	Réprime la traduction des ARNm liés à FMRP	(Napoli et al., 2008)
Brain tumor (Brat)	D	Domaine NHL	Réprime la traduction de l'ARNm Hunchback (Hb)	(Cho et al., 2006)
Angel1	H	YGRDFLL	Non déterminée	Gosselin et al., in prep (2012)
PML	H,M	Domaine RING	Inhibe l'export nucléaire des ARNm dépendant d'eIF4E, régulateur de croissance cellulaire et apoptose	(Cohen et al., 2001)
PRH	H,M	YAPTPLL	F. de transcription à homéodomaine impliqué dans l'hématopoïèse; joue un rôle dans l'inhibition spécifique de l'export nucléaire des ARNm dépendant d'eIF4E	(Topisirovic et al., 2003)
HOXA9	H,M	YVDSFLL	Facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans la leucémogenèse; aide de manière spécifique l'export nucléaire des ARNm dépendant d'eIF4E	(Topisirovic et al., 2005)
LRPPRC	H,M	YFWPLL, YFNYLLI	Métabolisme nucléaire des ARNm; favorise l'export nucléaire des ARNm dépendant d'eIF4E	(Topisirovic et al., 2009)
4E-T (CUP)	X,H,M (D)	YTKEELL	Transporte eIF4E dans le noyau, ou P-Bodies, réprime la traduction de Hb et Bcd	(Dostie et al., 2000a; Andrei et al., 2005)
Gemin 5	H,D,M	LKLPFLK, YEAVELL	Inhibition de la traduction coiffe et IRES dépendante	(Fierro-Monti et al., 2006)
DDX3	H	YIPPHLR	Impliqué dans l'épissage et la migration des ARNm, transport nucléocytoplasmique des protéines	(Shih et al., 2008)
Protéine Z	Arenavirus humain	Domaine RING	Requis pour le cycle viral	(Kentsis et al., 2001)

Table 2 : Liste non exhaustive des partenaires d'eIF4E

Sc (*S. cerevisiae*), X (*X. laevis*), H (*H. sapiens*), M (*M. musculus*), D (*D. melanogaster*), C (*C. elegans*). Lorsque plusieurs motifs sont indiqués, c'est qu'il existe plusieurs motifs de liaison à eIF4E dans la protéine. Les 4E-IPs jouant un rôle sur la traduction sont en rouge, celles qui jouent un rôle sur l'export nucléaire eIF4E dépendant sont en bleu, et celles qui jouent un rôle dans la localisation d'eIF4E au niveau des P-bodies sont en blanc. 4E-T joue à la fois sur la traduction, l'import nucléaire d'eIF4E et la localisation d'eIF4E dans les P-bodies.

A. Régulation d'eIF4E par les 4E-IPs dans le cytoplasme

A.1. 4E-IPs et l'inhibition de l'initiation de la traduction de certains ARNm

L'apparition de nouveaux partenaires d'eIF4E a permis l'émergence de nouveaux régulateurs de la traduction, notamment d'inhibiteurs spécifiques de la traduction de certains ARNm. Trois exemples seront discutés ci-dessous pour illustrer la diversité des mécanismes qui sont mis en jeu et la signification de ces nouvelles régulations au niveau des processus physiologiques engagés.

A.1.1 Exemple de la Maskin

La découverte de la Maskin a permis l'une des premières avancées dans la compréhension des mécanismes de contrôle de la traduction d'ARNm spécifiques. La Maskin est une protéine exprimée majoritairement dans les ovocytes de Xénope, et voit son expression diminuer ensuite lors de la maturation méiotique. Les ovocytes de Xénope contiennent des ARNm maternels avec une queue poly(A) courte. Ces ARNm portent en 3'UTR deux éléments de régulation *cis* :

- un signal de polyadénylation cytoplasmique (CPE), reconnu par la protéine CPEB (Paris et al., 1991), (Hake and Richter, 1994), (Hake et al., 1998)
- un hexanucléotide AAUAAA, reconnu par la protéine CPSF (Bilger et al., 1994; Dickson et al., 1999).

Ces ARNm ne sont pas traduits en masse mais sont activés à un temps bien spécifique du développement de l'organisme. Avant maturation, les éléments *cis* en 3'UTR sont occupés par la protéine CPEB, associée à la fois avec la poly(A) polymérase Gld2 (Barnard et al., 2004) et la poly(A) spécifique ribonucléase (PARN), grâce à la protéine plateforme Symplekin (Figure 13). Ces deux enzymes sont actives dans les ovocytes, mais la PARN ayant une activité plus intense que Gld2, la queue poly(A) des ARNm reste courte (Kim and Richter, 2006). La CPEB est également associée à la Maskin, qui se lie à eIF4E par son motif de liaison TXXXXLΦ (Stebbins-Boaz et al., 1999). Elle empêche ainsi l'interaction entre eIF4E et eIF4G, et donc l'initiation de la traduction des ARNm portant un élément CPE (Figure 13). La maturation des ovocytes induite par la progestérone entraîne l'activation d'une kinase, Aurora (Andresson and Ruderman, 1998), qui phosphoryle CPEB sur sa sérine 174 (Mendez et al., 2000). Cette phosphorylation permet le recrutement de CPSF et sa stabilisation sur l'hexanucléotide, entraînant le départ de la PARN et permettant l'allongement de la queue

poly(A) par Gld2 (Kim and Richter, 2006). La queue poly(A) allongée, la PABP va pouvoir s'y fixer, recruter eIF4G et ainsi déstabiliser l'interaction eIF4E/Maskin et permettre l'initiation de la traduction (Cao and Richter, 2002).

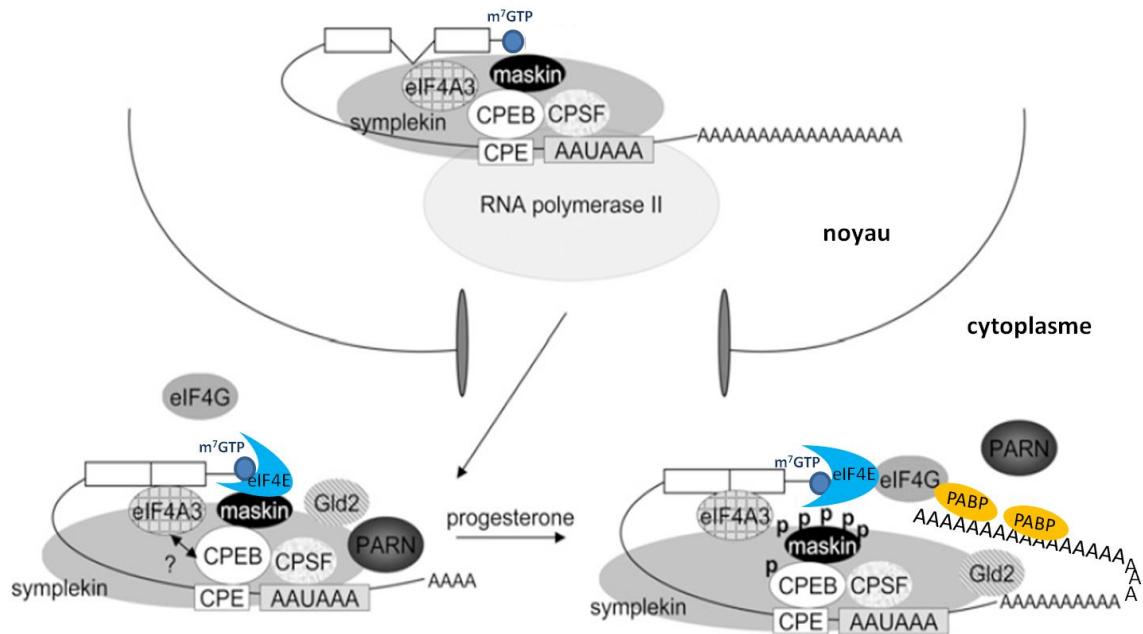


Figure 13 : Modèle de la régulation des ARNm contenant un motif CPE lors de la stimulation des ovocytes de Xénope par la progesterone (à partir de Lin et al., 2010)

Un ARNm contenant un motif CPE est reconnu par CPEB liée à la Maskin dans le noyau de manière cotranscriptionnelle ou juste après que la transcription ait eu lieu. eIF4A3 est une deadbox helicase pouvant potentiellement interagir avec CPEB mais son rôle ne sera pas détaillé ici. Après l'export de l'ARNm dans le cytoplasme, la poly(A)polymérase Gld2 et la déadénylase PARN s'assemblent en un multicomplexe avec CPEB, CPSF, Symplekin (protéine plateforme) et Maskin. La Maskin empêche la traduction en interagissant avec la surface dorsale d'eIF4E. Après stimulation à la progesterone, Aurora phosphoryle CPEB, entraînant le relargage de la PARN et l'allongement de la queue poly(A) par Gld2. Cette stimulation déclenche également la phosphorylation de la Maskin qui libère eIF4E pour eIF4G recruté par la PABP liée à la nouvelle queue poly(A).

La Maskin est ciblée sur certains ARNm qui sont impliqués majoritairement dans le contrôle des premières divisions méiotiques grâce à CPEB. L'inhibition de la traduction est réversible et fortement dépendante de la polyadénylation et des étapes de phosphorylation, notamment par CDK1, Aurora et la Calcineurine, au cours de la maturation (Pascreau et al., 2005), (Barnard et al., 2005). CPEB et la Maskin sont également présentes dans le noyau sous forme de mRNP exportées dans le cytoplasme (Figure 13), pour former un nouveau complexe avec

entre autres la PARN et Gld2, assurant ainsi une répression traductionnelle dès l'étape d'export de l'ARNm (Lin et al., 2010).

Depuis peu, l'association Maskin/eIF4E fait l'objet d'une controverse dans le sens où l'interaction de manière directe n'a jamais été montrée et que cette interaction est en réalité très faible dans un système double hybride (Kosak, 2006; Kang MK, 2011). De plus, le Y dans le motif de liaison à eIF4E YXXXXLΦ est remplacé par un T dans la séquence de la Maskin (Stebbins-Boaz et al., 1999).

Même si ce rôle est aujourd'hui contesté, la Maskin est une des premières 4E-IPs mise en évidence dans le contrôle de la traduction d'ARNm particuliers régulés spécifiquement au cours du développement. Nous allons voir dans les paragraphes suivants que d'autres 4E-IPs peuvent réguler spécifiquement la traduction de certains ARNm.

A.1.2. Neuroguidin et CYFIP1, deux 4E-IPs impliquées dans des processus de neurogénèse

De la même manière que la Maskin, la Neuroguidin (NGD) peut réguler spécifiquement la traduction d'ARNm portant le motif CPE en s'associant à CPEB et à eIF4E lorsqu'on l'injecte dans des ovocytes de Xénope (Jung et al., 2006). Dans l'embryon de Xénope, NGD est majoritairement exprimée au niveau du système nerveux embryonnaire et de la crête neurale. Si NGD est déplétée dans les embryons en utilisant une stratégie morpholinos, la fermeture du tube neural ainsi que la migration de la crête neurale sont stoppées, suggérant qu'elle joue un rôle important dans la régulation de la traduction d'ARNm contenant le CPE dans le cadre de la neurogénèse. De manière intéressante, on retrouve NGD également chez les mammifères, largement exprimée dans le système nerveux, et souvent détectée sous forme de particules ressemblant à des mRNP au niveau des axones et des dendrites, ainsi que dans les cônes de croissances et les lamellipodes. Au niveau de ces structures, elle co-localise avec eIF4E, suggérant que chez les mammifères, NGD régule également la traduction d'ARNm spécifiques de manière locale.

CYFIP1 est une autre protéine connue pour se lier à eIF4E au niveau des dendrites neuronales (Napoli et al., 2008). Cette protéine est liée chez l'humain à des syndromes neurologiques très proches du syndrome du X fragile. CYFIP1 est un peu particulière puisqu'elle ne possède pas le motif de liaison à eIF4E au niveau de la séquence primaire, mais contient un court peptide dans sa séquence primaire qui adopte une structure tridimensionnelle similaire à celle prise

par le motif consensus de liaison à eIF4E. CYFIP1 se lie à la protéine FMRP dans le cytoplasme. FMRP se lie à l'ARNm au niveau de motifs riches en G et U, ou par l'intermédiaire de petits ARN non codants, et joue un rôle important dans la plasticité synaptique et le développement du cerveau. Dans le cerveau, l'interaction FMRP-CYFIP1-eIF4E va permettre la répression de la traduction d'ARNm cibles de FMRP. Ce complexe, que l'on retrouve au niveau des synapses, est sensible à l'activité synaptique qui entraîne la dissociation de CYFIP1 et eIF4E et permet la traduction d'un pool d'ARNm spécifiques.

Ces deux protéines sont encore un exemple de l'apparition d'inhibiteurs de la traduction spécifiques de l'expression d'ARNm ciblés, au niveau d'un tissu particulier, d'une étape du développement ou encore d'une espèce particulière. Que ce soit la Maskin, la Neuroguidin ou CYFIP1, ces inhibiteurs sont dirigés sur des ARNm spécifiques par l'intermédiaire d'une autre protéine CPEB ou FMRP respectivement. Nous allons maintenant voir l'exemple d'une 4E-IP qui utilise une stratégie différente, puisqu'elle cible un ARNm particulier grâce à son domaine de liaison à l'ARN et inhibe la traduction de cet ARNm par son motif de liaison à eIF4E.

A.1.3. Exemple particulier de Bicoid

Bicoid est une protéine à homéodomaine qui joue un rôle important dans le développement antérieur de l'embryon de drosophile (revue (Rivera-Pomar et al., 1996)). C'est un facteur de transcription fondamental pour la spécification de l'axe antéropostérieur (Garcia-Fernandez, 2005). Bicoid est un cas très particulier puisqu'il est uniquement retrouvé chez les Diptères supérieurs, et est absent dans le génome des autres insectes. En effet, il dérive de la duplication du gène Hox3 au niveau des Diptères supérieurs (Rosenberg et al., 2009), et a acquis, après cette duplication, la capacité d'inhiber spécifiquement la traduction de l'ARNm caudal, dont la protéine est importante pour le développement des segments abdominaux postérieurs de l'embryon. Ce processus fait intervenir l'interaction de Bicoid avec eIF4E d'une part (*via* une séquence YXXXXLΦ) et, d'autre part, la liaison de Bicoid sur une région BRE (Bicoid response element) située dans la séquence 3' non traduite de l'ARNm *caudal* (via l'homéodomaine, HD) (Niessing et al., 2002) (Figure 14). Dans ce complexe ternaire, l'association de Bicoid et d'eIF4E empêche l'interaction eIF4E/eIF4G et donc l'initiation de la traduction de l'ARNm *caudal* sur lequel Bicoid se lie spécifiquement (Figure 16a). Depuis 2005, un nouveau modèle remet en cause la liaison de Bicoid à eIF4E et fait intervenir 4E-HP (Cho et al., 2005), un eIF4E de classe 2 qui se lie à la coiffe des ARNm

mais qui est incapable de fixer eIF4G (Rom et al., 1998). L'association simultanée de 4E-HP sur la coiffe de l'ARNm *caudal*, qui se comporte donc comme un inhibiteur compétitif d'eIF4E vis-à-vis de la coiffe, et de Bicoid sur la région BRE en 3' UTR bloque la traduction de *caudal* et favorise le développement antérieur dans la région où Bicoid est exprimée. Ce nouveau modèle est maintenant accepté au sein de la communauté scientifique.

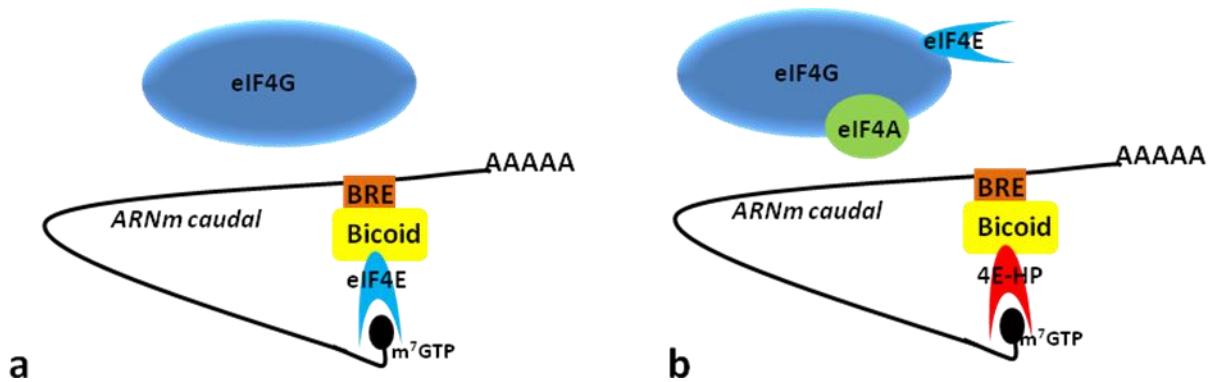


Figure 14 : Deux modèles envisagés pour la répression de la traduction de *caudal* par Bicoid dans la partie antérieure de l'embryon de drosophile.

a. Mécanisme envisagé par Niessing et al., 2002.

b. Mécanisme présenté par Cho et al., 2005.

BRE : Bicoid region element, aussi appelée BBR : Bicoid Binding Region

Cet exemple présente deux particularités majeures : La 4E-IP Bicoid fixe directement l'ARNm en 3'UTR contrairement aux exemples précédents, et le contrôle de la traduction coiffe-dépendante ne s'exerce pas par la régulation de la formation du complexe eIF4E/eIF4G, mais par le recrutement d'un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la coiffe.

Toujours chez la drosophile, une régulation similaire a été montrée sur le contrôle de la traduction de l'ARNm *Hunchback*. Cet ARNm contient une séquence NRE (nanos response Element) qui recrute un complexe formé de Pumilio, Brat et Nanos. Brat, en tant que 4E-IP, recrute la protéine 4E-HP, ce qui permet l'inhibition de la traduction de *Hunchback* au pôle postérieur de l'embryon de drosophile (Sonoda and Wharton, 2001; Edwards et al., 2003; Cho et al., 2006).

D'autres protéines se sont révélées comme étant des inhibiteurs spécifiques de l'initiation de la traduction de certains ARNm. On retrouve notamment Emx2, Otx2 et Engrailed 2 (Nedelec et al., 2004) qui sont exprimées dans le système nerveux central et qui se lient directement à eIF4E au cours de la neurogénèse. Ces protéines n'ont jamais été montrées comme pouvant reconnaître une séquence spécifique sur les ARNm mais jouent pourtant un rôle inhibiteur spécifique d'un certain stade de développement. Les mécanismes de cette sélection ne sont pas encore connus, mais il se pourrait que la spécificité résulte d'une expression tissu-spécifique et temporelle de ces protéines, ou bien d'un partenaire protéique permettant le ciblage de certains ARNm spécifiques.

A.2. 4E-IPs et régulation de la dégradation des ARNm

Dans le cytoplasme, eIF4E ne va pas seulement jouer un rôle au niveau de l'étape d'initiation de la traduction. Depuis la fin des années 1990, l'implication d'eIF4E au niveau du stockage et de la dégradation des ARNm dans le cytoplasme est devenue de plus en plus évidente. Dans ce paragraphe, je présenterai premièrement la part d'implication d'eIF4E puis le rôle de différentes 4E-IPs dans ces processus.

A.2.1. eIF4E, un rôle dans la séquestration et la stabilisation des ARNm dans le cytoplasme

La dégradation des ARNm est une étape importante de la régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. La plupart des ARNm sont soit dégradés dans le sens 3'-> 5' par l'exosome, ou dans le sens 5'->3' par d'autres facteurs de dégradation. Cette dernière étape nécessite que la coiffe soit retirée par des enzymes de "décoiffage" telles que DCP1 ou DCP2 pour laisser l'accès à des exonucléases 5'-3' (revue (Parker and Song, 2004)). Le clivage de la coiffe par ces enzymes se fait par un accès direct à la coiffe qui est protégée par eIF4E. eIF4E entre donc en compétition avec les enzymes de "décoiffage" et participe dans certaines conditions à la protection et à la stabilisation des ARNm auxquels il s'associe. La transition entre traduction et décoiffage, puis dégradation de l'ARNm se fait par déstabilisation du complexe eIF4F qui lie la coiffe (von der Haar et al., 2004).

La traduction et la dégradation des ARNm peuvent avoir lieu dans des compartiments différents. De nombreux facteurs appartenant aux voies de dégradation majeures des ARNm, telles que des déadénylases (CCR4), des exonucléases (Xrn1) et des enzymes de "décoiffage"

(DCP1, DCP2) sont localisés dans le cytoplasme des cellules de mammifères sous forme de granules discrets, appelées P-bodies, de par leur ressemblance avec les Processing-bodies décrits chez la levure (Cougot et al., 2004). Ces P-bodies sont impliqués dans le *turnover* des ARNm, dans la répression de la traduction générale et dans la répression exercée par les miRNA (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005; Pillai et al., 2005)..

Il a été montré qu'eIF4E1 et eIF4E2 se localisent dans ces P-bodies, chez *S. pombe* (Ptushkina et al., 2004) ou encore dans les cellules de mammifères (Andrei et al., 2005). La connaissance des mécanismes contrôlant le remodelage des mRNP requis pour la transition de la traduction active d'un ARNm vers la dégradation est encore très peu développée. Néanmoins, la présence d'eIF4E dans les P-Bodies marquée par l'absence d'autres facteurs d'initiation de la traduction tels qu'eIF4G, suggère qu'eIF4E joue également un rôle dans les événements de remodelage des mRNP pour cibler la dégradation d'un ARNm dans les P-Bodies.

A.2.2. 4E-T/Gemin5/DDX3, des 4E-IPs impliqués dans la modulation du rôle d'eIF4E au niveau de la dégradation des ARNm

Plusieurs 4E-IPs sont retrouvées au niveau des P-bodies. La protéine 4E-T, par exemple, possède un motif de liaison à eIF4E fonctionnel (Dostie et al., 2000a) et fait partie des composants des P-bodies, jouant un rôle clé dans la formation de ces derniers (Andrei et al., 2005). Lorsque l'expression de 4E-T est diminuée par stratégie *RNAi*, l'accumulation d'eIF4E dans les P-bodies n'est plus observée. 4E-T pourrait donc déstabiliser l'interaction entre eIF4E et eIF4G puisqu'il se lie sur le même site et recruter les ARNm au niveau des P-bodies.

La présence de déadénylases (CCR4) et d'ARN hélicase (RCK/p54) est également nécessaire pour la formation de ces P-bodies. La Gemin 5, une autre 4E-IP, colocalise avec eIF4E dans les P-Bodies. Cette protéine plateforme est impliquée dans l'assemblage des RNP (Fierro-Monti et al., 2006) par l'intermédiaire du survival motoneuron complex (SMN) à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Gubitz et al., 2002). Les auteurs proposent que l'interaction entre eIF4E et la Gemin 5, ainsi que leur localisation dans les P-bodies, servent à recruter des ARNm coiffés dans ces complexes RNP, pour les remodeler et assurer une transition entre traduction active et dégradation des ARNm. Le rôle de la Gemin 5 reste cependant assez flou. Elle peut également jouer le rôle de répresseur de l'activité traductionnelle dépendante de la coiffe ou des IRES (Pacheco et al., 2009) et est capable de se lier à la coiffe (Bradrick and

Gromeier, 2009), soulevant de nombreuses questions sur les mécanismes qui permettent à la Gemin5 de réguler la traduction.

Un dernier exemple de modulation du rôle d'eIF4E dans la dégradation des ARNm par une 4E-IP est illustré par DDX3, une ARN hélicase. DDX3, connu pour son rôle d'inhibiteur de la traduction (Shih et al., 2008), joue également un rôle dans la formation de granules de stress dépendant de son interaction avec eIF4E (Shih et al., 2012). En réponse à un stress extérieur, les cellules forment des granules de stress dont la composition varie selon les stress et le type de cellules (Anderson and Kedersha, 2008; Anderson and Kedersha, 2009). Ces granules contiennent des ARNm portant des complexes de préinitiation, avec eIF4E-eIF4G et PABP, stockent les ARNm en condition de stress pour les protéger en jouant le rôle de centre décisionnel entre stockage, dégradation ou ré-initiation de la traduction (Anderson and Kedersha, 2009). La différence entre granule de stress et P-bodies réside dans le fait que ces derniers vont dégrader l'ARNm alors qu'ils seront seulement stockés au niveau des granules de stress.

Ce mécanisme de stockage des ARNm permet à la cellule de répondre très rapidement et spécifiquement dans certaines conditions. C'est une autre manière de réguler l'initiation de la traduction, de façon réversible. Le recrutement d'eIF4E au niveau de ces structures ne dépend pas tant de sa liaison avec la coiffe des ARNm, mais plutôt des interactions protéines-protéines qui existent au niveau des mRNPs (Ferrero et al., 2012). Le rôle des 4E-IPS est donc essentiel dans la régulation de ces mécanismes de stockage.

A.3. Les complexes multifonctionnels de régulation de la traduction

Dans la première partie de l'introduction (I.A), nous avions abordé les différents mécanismes qui peuvent réguler l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle. En dehors de l'inhibition de l'étape d'initiation de la traduction, la déadénylation de l'ARNm ainsi que son décoiffage font partie des mécanismes qui empêchent sa traduction en protéines. Il n'est pas rare que dans les cellules, plusieurs de ces mécanismes soient mis en place sur un même ARNm, au même moment, pour apporter une efficacité et une spécificité supplémentaire à la régulation.

De nombreux régulateurs, tels que CPEB, Smaug, ou PUF, vont recruter en 3'UTR des ARNm des déadénylases spécifiques et des cofacteurs qui, soit inhibent la traduction (Maskin,

Cup), décoiffent l'ARNm (DCP1, DCP2) ou encore dégradent l'ARNm rapidement (exosome ou XRN1) (Figure 15, Table 3). Nous nous concentrerons uniquement dans cette partie sur les multicomplexes qui recrutent des inhibiteurs de la traduction puisque mon travail de thèse s'est concentré sur les partenaires d'eIF4E.

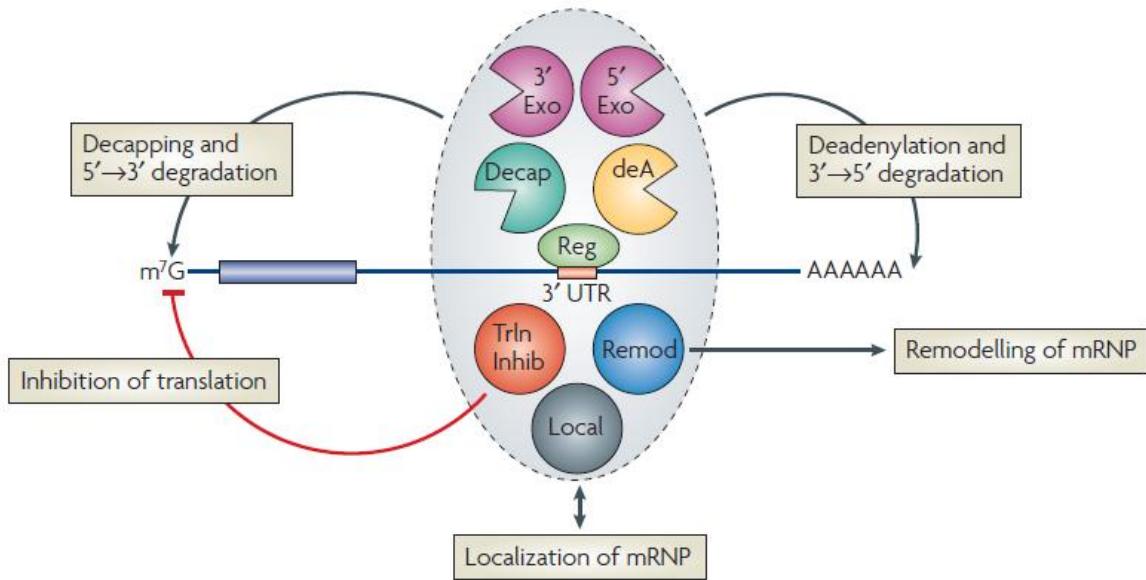


Figure 15 : Modèle de complexe multifonctionnel impliqué dans la régulation de la traduction d'un ARNm (issue de Goldstrohm et al., 2008)

Les régulateurs (Reg) peuvent contrôler la déadénylation des ARNm, leur dégradation et leur traduction en recrutant des complexes multifonctionnels sur les ARNm. Leur composition, et l'assemblage des activités enzymatiques dictent la régulation qui s'applique sur l'ARNm qui les porte. Ces complexes peuvent contenir des déadénylases, des enzymes de "décoiffage", des exonucléases, des enzymes de remodelage de mRNP (hélicases) ou encore des inhibiteurs de la traduction (voir table 3). Le recrutement de ce complexe peut se faire grâce à une seule molécule qui se lie sur un élément régulateur en 3'UTR de l'ARNm, ou grâce à des interactions combinatoires entre des régulateurs qui se lient sur différentes régions en 3'UTR. (Revue Goldstrohm et al., 2008)

Nous avons déjà vu en détail le cas de CPEB et de la Maskin qui régulent spécifiquement la traduction des ARNm contenant un CPE. C'est un exemple illustrant parfaitement cette notion de multicomplexe fonctionnel : en 3'UTR, CPEB recrute à la fois la déadénylase PARN, la poly(A) polymérase GLD2 et la maskin, inhibiteur de la traduction coiffe-dépendante. Les trois activités sont recrutées en un seul complexe sur un ARNm spécifique contenant un CPE.

D'autres régulateurs jouent un rôle important dans la formation de complexes multifonctionnels, notamment les protéines PUF. Les premières protéines PUF, découvertes chez la drosophile, Pumilio, et chez *C. Elegans*, FBF (Fem-3 mRNA-Binding Factor), ont donné le nom à la famille des protéines portant le motif Pumilio. Ce motif lie l'ARNm et est présent dans un domaine C-terminal très conservé, composé de huit répétitions en tandem. Les protéines PUF constituent une famille très conservée au cours de l'évolution, que l'on retrouve aussi bien chez la levure, l'homme et les plantes. Elles se lient sur des motifs particuliers en 3'UTR d'ARNm spécifiques, riches en UG, et répriment leur traduction (Spassov and Jurecic, 2003). Elles peuvent recruter le complexe POP2-CCR4-NOT, spécialisé dans la déadénylation et la répression traductionnelle des messagers (Goldstrohm et al., 2006), mais recrutent également en complément des enzymes de "décoiffage" (ddh1) (Denis and Chen, 2003) ou des facteurs inhibiteurs de la traduction (exemple de Brat) (Kadyrova et al., 2007).

Régulateurs	Déadénylase	Cofacteur lié à l'ARNm	Cofacteur dégradant l'ARNm	Cofacteurs inhibiteurs de la traduction	ARNm cible	références
PUF	POP2-CCR4-NOT	Nanos	DCP1	Dhh1, 4EHP, Brat	<i>hunchback</i>	(Goldstrohm et al., 2006; Kadyrova et al., 2007)
CPEB	PARN	CPSF, Symplekin		Maskin, Gld2	CPE-ARNm	(Kim and Richter, 2006)
Smaug	POP2-CCR4-NOT			CUP	<i>nanos</i>	(Semotok et al., 2005)

Table 3 : Exemple de complexes multifonctionnels impliquant des inhibiteurs de la traduction

Le complexe Pumilio/Nanos/Brain tumor (Pum/Nos/Brat) illustre bien cette capacité des protéines PUF à former des multicomplexes chez la drosophile (Table 3). Ce complexe se lie en 3'UTR du messager *hunchback*, et recrute 4E-HP (aussi appelé cup ou eIF4E2) via son interaction avec Brat (Cho et al., 2006). Cette répression traductionnelle crée un gradient

opposé de Caudal et Hunchback, qui est essentiel pour activer l'expression des gènes spécifiques de la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Dans le cas de l'ARNm *hunchback*, une régulation additionnelle contribue à inhiber sa traduction à travers un mécanisme de déadénylation régulé par Nos (Wreden et al., 1997). Nos et Pum peuvent en effet recruter différentes sous-unités du complexe de déadénylation CCR4/NOT, même s'il n'est pas encore bien établi que cette fonction déadénylase puisse jouer un rôle physiologique dans la répression de *hunchback* (Goldstrohm et al., 2007; Kadyrova et al., 2007).

L'utilisation de mécanismes multiples pour assurer une régulation traductionnelle appropriée sur un ARNm donné est un évènement récurrent dans le développement embryonnaire et illustre la complexité des modes de régulation traductionnelle mis en jeu. Réunir tous ces éléments dans un seul complexe de régulation a deux conséquences :

-si la déadénylation n'est pas suffisante pour causer une dégradation rapide de l'ARNm, d'autres fonctions, comme l'inhibition directe de la traduction permettront d'assurer un arrêt plus rapide de la traduction de cet ARNm.

-Deuxièmement, le côté multifonctionnel permet de contrôler déadénylation, traduction, et *turnover* de manière indépendante ou synchrone, en fonction des activités qui seront recrutées au sein du complexe.

Les motifs en 3'UTR des ARNm dictent quels seront les éléments régulateurs composant le complexe multifonctionnel, rendant la régulation spécifique de chaque ARNm (Goldstrohm and Wickens, 2008). Ce type de régulation est plutôt bien caractérisé chez la drosophile ou la levure, mais reste encore peu étudié chez l'homme. La présence de centaines de protéines de liaison à l'ARN et de miRNAs dans le génome humain laisse pourtant suggérer que la régulation spécifique est plus répandue que ce qui est généralement pensé (Castello et al., 2012). Pour comprendre comment les ARNm sont régulés, il faudra pouvoir identifier les séquences régulatrices dans les régions non codantes des ARNm ainsi que les protéines qui les lient et leur rôle sur la régulation traductionnelle.

Ces éléments seront importants dans le cadre de ma thèse pour comprendre les possibles régulations mises en jeu lors de l'interaction entre eIF4E et la nouvelle 4E-IP que nous avons découverte. En effet, cette dernière est apparentée à la famille des CCR4 et peut interagir avec une des protéines de la famille PUF (CNOT8).

B. Régulation d'eIF4E par les 4E-IPs dans le noyau

B.1. Localisation et fonction d'eIF4E

De manière commune, eIF4E est caractérisé comme étant le déclencheur de l'étape limitante de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. De plus en plus d'études montrent qu'une fraction significative d'eIF4E (jusqu'à 68%) (Iborra et al., 2001) est observée dans le noyau (*toutes les études qui suivent se sont majoritairement portées sur eIF4E1*). Ces observations ont été faites chez la drosophile (Cohen et al., 2001), chez le Xénope (Strudwick and Borden, 2002), et dans de nombreuses lignées cellulaires telles que les Hela R19 (human epitheloid carcinoma cells) (Dostie et al., 2000b) ou les NIH 3T3 (Lejbkowicz et al., 1992). La localisation d'eIF4E dans le noyau apparaît donc conservée chez les eucaryotes, de la levure aux mammifères. Dans des cellules Hela, l'import d'eIF4E dans le noyau est effectué par 4E-T (Dostie et al., 2000a). Nous avons vu plus haut que 4E-T lie eIF4E et joue un rôle dans sa localisation au niveau des P-bodies. 4E-T permet aussi le transport d'eIF4E du cytoplasme au noyau *via* la voie de l'importine $\alpha\beta$, et joue ainsi son rôle de régulateur d'eIF4E en contrôlant sa localisation (Figure 16). Une fois dans le noyau, eIF4E ne peut plus participer à la traduction qui a lieu dans le cytoplasme. La localisation nucléaire d'eIF4E est aussi régulée par 4E-BP1. Dans des fibroblastes de souris (mouse embryonic fibroblast), 30% de la protéine 4E-BP1 se trouve localisée dans le noyau et participe à la séquestration nucléaire d'eIF4E (Rong et al., 2008) (Figure 16).

Cependant, de nombreuses études montrent que la séquestration d'eIF4E dans le noyau ne sert pas seulement à empêcher eIF4E d'agir dans l'initiation de la traduction, mais permet également à eIF4E de jouer un rôle dans l'export spécifique de certains ARNm (Culjkovic et al., 2005; Culjkovic et al., 2007; Topisirovic et al., 2009). eIF4E est présent dans 3 fractions du noyau (Figure 17) : la fraction nucléoplasmique, les eIF4E nuclear bodies (ou speckles (Dostie et al., 2000b)) dans lesquels on retrouve des ARNm et des facteurs d'épissages, où eIF4E va jouer son rôle dans l'export nucléaire, et les PML bodies, dépourvus d'ARNm (qui seront détaillés par la suite).

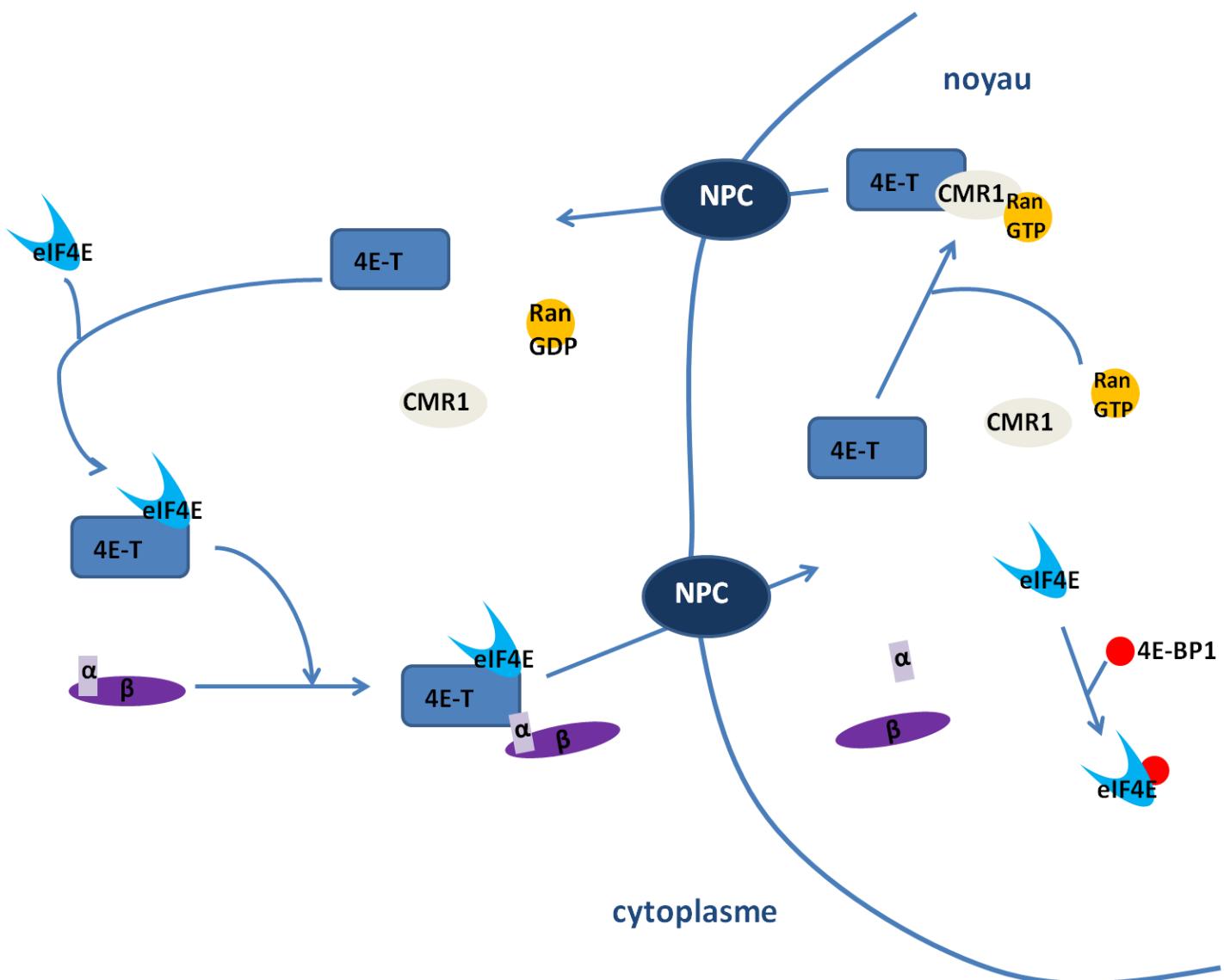


Figure 16 : Régulation de la localisation nucléaire d'eIF4E

eIF4E est prise en charge par son partenaire *4E-T* dans le cytoplasme. *4E-T* recrute le complexe importine α/β qui catalyse l'entrée d'*eIF4E* dans le noyau par le pore nucléaire (Nuclear Pore complexe). Dans le noyau, *eIF4E* peut se lier à *4E-BP1*, qui participe à sa séquestration nucléaire. *4E-T* est réexporté dans le cytoplasme par l'intermédiaire du cofacteur cellulaire *CMR1* et l'enzyme *RanGTP*. Adapté de (Dostie et al., 2000a) et (Rong et al., 2008)

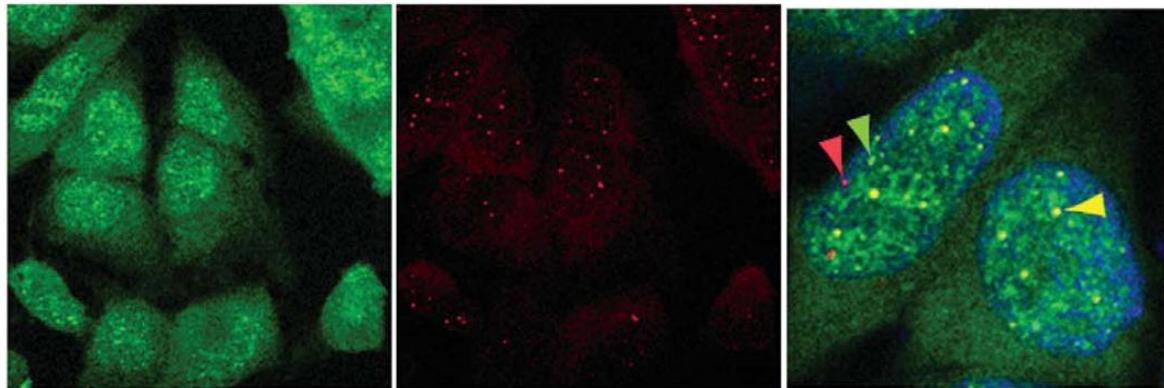


Figure 17 : eIF4E bodies et PML bodies colocalisent dans le noyau (issue de Topisirovic et al., 2009)

Images prises au microscope confocal sur des cellules U2OS. eIF4E et PML sont marquées respectivement par immunofluorescence en vert et en rouge. La flèche rouge indique les PML bodies, la verte les eIF4E bodies et la jaune, la colocalisation entre ces deux derniers.

Contrairement à son rôle dans l'initiation de la traduction, la fonction d'eIF4E dans l'export des ARNm est encore assez mal comprise. Généralement, la fonction d'eIF4E est décrite au niveau traductionnelle pour conférer à eIF4E ses propriétés oncogéniques (voir première partie de l'introduction). Pourtant, la surexpression d'eIF4E ne mène pas à une augmentation de la synthèse protéique de l'ensemble des ARNm (Rousseau et al., 1996b; Clemens and Bommer, 1999) mais de seulement certains transcrits eIF4E-sensibles (Cyclin D1, ODC, VEGF, etc..) (Sonenberg and Gingras, 1998). Cette sensibilité a été attribuée au fait qu'ils portaient en 5'UTR une séquence spécifique très complexe. Cependant, des études clés ont montré que la surexpression d'un mutant d'eIF4E incapable de se lier à eIF4G (W73A), donc de promouvoir la traduction, est capable d'induire la transformation des cellules de la même manière que la surexpression d'eIF4E WT (Rousseau et al., 1996b; Cohen et al., 2001; Topisirovic et al., 2002). Ils montrent qu'eIF4E s'associe entre autres avec le messager de la cycline D1 dans le noyau et promeut son export dans le cytoplasme. L'augmentation de l'expression de la cycline D1 se fait donc indépendamment du site de liaison à eIF4E important pour la traduction des messagers (Rousseau et al., 1996b).

eIF4E régule ainsi l'export nucléaire de plusieurs ARNm spécifiques impliqués dans la survie, la prolifération, et la progression du cycle cellulaire (cyclin D1, Pim1, ODC) grâce à un motif en 3' UTR de 50 à 100 nucléotides qui a une structure secondaire très conservée, appelé 4E-SE (4E-sensitivity element) (Culjkovic et al., 2005; Culjkovic et al., 2006). Cet élément 4E-

SE, ainsi que la capacité d'EIF4E à fixer la coiffe, sont essentiels pour la distribution subcellulaire des ARNm mais aussi pour la formation des EIF4E nuclear bodies qui contiennent EIF4E et ses messagers cibles (Culjkovic et al., 2006). Les ARNm des gènes dits de "ménage" tels que ceux codant pour l'Actine ou la GADPH ne sont pas retrouvés dans ces EIF4E nuclear bodies, suggérant qu'il existe bien un ciblage spécifique de certains ARNm (Culjkovic et al., 2005). À l'heure actuelle, 13 facteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la survie et la prolifération sont connus comme étant des ARNm dont l'export peut être régulé par EIF4E (Culjkovic et al., 2006).

L'export dépendant d'EIF4E possède des caractéristiques particulières qui lui permettent de transporter les ARNm spécifiques de façon indépendante des autres ARNm. La voie générale d'export des ARNm emprunte la voie NXF1/TAP, dans laquelle le facteur majeur de liaison à la coiffe est CBC (cap binding complex, composé de deux protéines CBP20 et CPB 80). L'export des ARNm 4E-SE se fait de manière complètement indépendante de NXF1/TAP ou CBC, en passant par CRM1, une voie d'export utilisée par les U small nuclear RNA (UsnRNA), ce qui le rend sensible à la leptomycine B (Culjkovic et al., 2006). Lorsque le niveau d'EIF4E est bas, les ARNm contenant le 4E-SE peuvent néanmoins être transportés par la voie NXF1/TAP. Ainsi, l'export dépendant d'EIF4E est un moyen pour les cellules de répondre rapidement en augmentant l'expression de certains gènes de manière coordonnée, en passant par une voie d'export autre que la voie "par défaut" d'export des ARNm (Culjkovic et al., 2006) (Figure 18, p 69).

L'export dépendant d'EIF4E permet une production plus efficace des protéines codées par les ARNm contenant le 4E-SE, en augmentant leur quantité dans le cytoplasme. L'action d'EIF4E sur la traduction et l'export des ARNm peut être découpée, même si ces deux mécanismes sont tous deux dépendants de l'interaction EIF4E/coiffe. En effet, la surexpression d'EIF4E entraîne l'augmentation de l'export de l'ARNm pour la cyclin D1 sans affecter son niveau de traduction (Rousseau et al., 1996b). Au contraire, la surexpression d'EIF4E entraîne l'augmentation de la traduction des transcrits VEGF mais pas de leur export (Clemens and Bommer, 1999). Dans le cas d'ODC et Pim1, les ARNm sont à la fois plus exportés et plus traduits (Rousseau et al., 1996b; Hoover et al., 1997; Culjkovic et al., 2005; Culjkovic et al., 2006). De cette façon, EIF4E peut réguler spécifiquement, de manière coordonnée et combinatoire, l'expression de facteurs de survie et de prolifération grâce à ces régions régulatrices situées en 3' (4E-SE pour l'export) et en 5' UTR (pour la traduction) (Culjkovic

2006). Il est proposé qu'eIF4E soit à la base d'un régulon pour contrôler la prolifération cellulaire, c'est-à-dire qu'un ensemble de messagers soit sous le contrôle d'eIF4E grâce aux séquences régulatrices qu'ils portent dans leurs régions non codantes (Culjkovic et al., 2007).

B.2. 4E-IPs et régulation de l'export des ARNm eIF4E-sensitive

Comme pour l'initiation de la traduction, l'export dépendant d'eIF4E est soumis à de nombreuses régulations par des 4E-IPs qui sont exprimées majoritairement dans le noyau. La plupart de ces 4E-IPs sont des facteurs de transcription qui font partie de la famille des protéines à homéodomains.

B.2.1 La protéine à homéodomaine PML, une 4E-IP inhibitrice générale de l'export des ARNm eIF4E-dépendant

Le partenaire nucléaire d'eIF4E le mieux défini est peut être la promyelocytic leukemia protein (PML) (Campbell Dwyer et al., 2000; Lai and Borden, 2000; Cohen et al., 2001). On ne la retrouve exprimée que chez les mammifères (Goddard et al., 1991) et elle est connue pour être un régulateur négatif de la croissance cellulaire (Mu et al., 1994). Elle se caractérise par la présence d'un domaine RING en N-terminal, requis pour de nombreuses fonctions physiologiques de PML dans l'arrêt de la croissance, l'apoptose (Borden et al., 1995) (Borden et al., 1996) (Le et al., 1996) mais aussi pour sa liaison avec eIF4E. En effet, PML ne possède pas de motif de liaison à eIF4E traditionnel et se lie à la surface dorsale d'eIF4E grâce à son RING domaine.

Dans la plupart des cellules de mammifères, PML est localisée dans des complexes nucléaires multiprotéiques appelés PML nuclear bodies, où elle colocalise avec eIF4E ((Lai and Borden, 2000) figure 17). L'intégrité des eIF4E nuclear bodies est indépendante de la présence de PML, tandis que celle des PLM bodies est par contre dépendante de l'intégrité des eIF4E nuclear bodies (Cohen et al., 2001). La surexpression de PML induit un arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Borden, 2002), notamment en induisant une diminution de l'export de l'ARNm codant pour la cyclin D1. *In vitro*, l'association de PML avec eIF4E fait diminuer de 100 fois la capacité d'eIF4E à fixer la coiffe des ARNm (Cohen et al., 2001; Kentsis et al., 2001). Cette perte d'affinité pour la coiffe dans les cellules est corrélée avec la perte des fonctions d'eIF4E dans l'export des ARNm (Cohen et al., 2001). PML régule donc

négativement l'export nucléaire médié par eIF4E en diminuant son affinité pour la coiffe des ARNm, notamment lors de stress, et en formant des PML nuclear bodies dépourvus d'ARNm (Figure 21). Puisque PML est exprimée dans tous les types cellulaires, elle se positionne comme un inhibiteur général de la fonction nucléaire d'eIF4E chez les mammifères. PML est également capable *in vitro* d'inhiber la fonction d'eIF4E dans la traduction (Kentsis et al., 2001), suggérant que dans les rares cas où PML est retrouvée dans le cytoplasme, elle pourrait moduler la traduction des ARNm eIF4E-sensibles.

B.2.2. La protéine LRPPRC, une 4E-IP cofacteur d'eIF4E dans l'export des ARNm

Une récente étude (Topisirovic et al., 2009) a mis en évidence l'existence d'un cofacteur d'eIF4E qui pourrait être impliqué dans l'export des ARNm. LRPPRC est une protéine riche en leucine, impliquée dans le métabolisme des ARNm et associée aux mRNP nucléaires (Mili et al., 2001). Cette protéine interagit par l'intermédiaire d'un motif de type YXXXXLΦ avec eIF4E, lui-même associé avec les ARNm eIF4E-sensibles, dans les eIF4E nuclear bodies (Figure 18).

LRPPRC régule de manière positive l'export des ARNm contenant le 4E-SE, et peut potentialiser l'interaction d'eIF4E avec ces ARNm en interagissant à la fois avec le 4E-SE et avec eIF4E. La surexpression de LRPPRC entraîne la redistribution d'eIF4E dans le noyau, c'est à dire la délocalisation d'eIF4E des PML bodies. A l'inverse, la perte de LRPPRC entraîne une diminution du niveau d'eIF4E nucléaire. LRPPRC est donc un régulateur positif de l'export nucléaire dépendant d'eIF4E et contrôle l'activité d'eIF4E en modulant sa localisation, notamment en le mettant à l'écart de son inhibiteur PML.

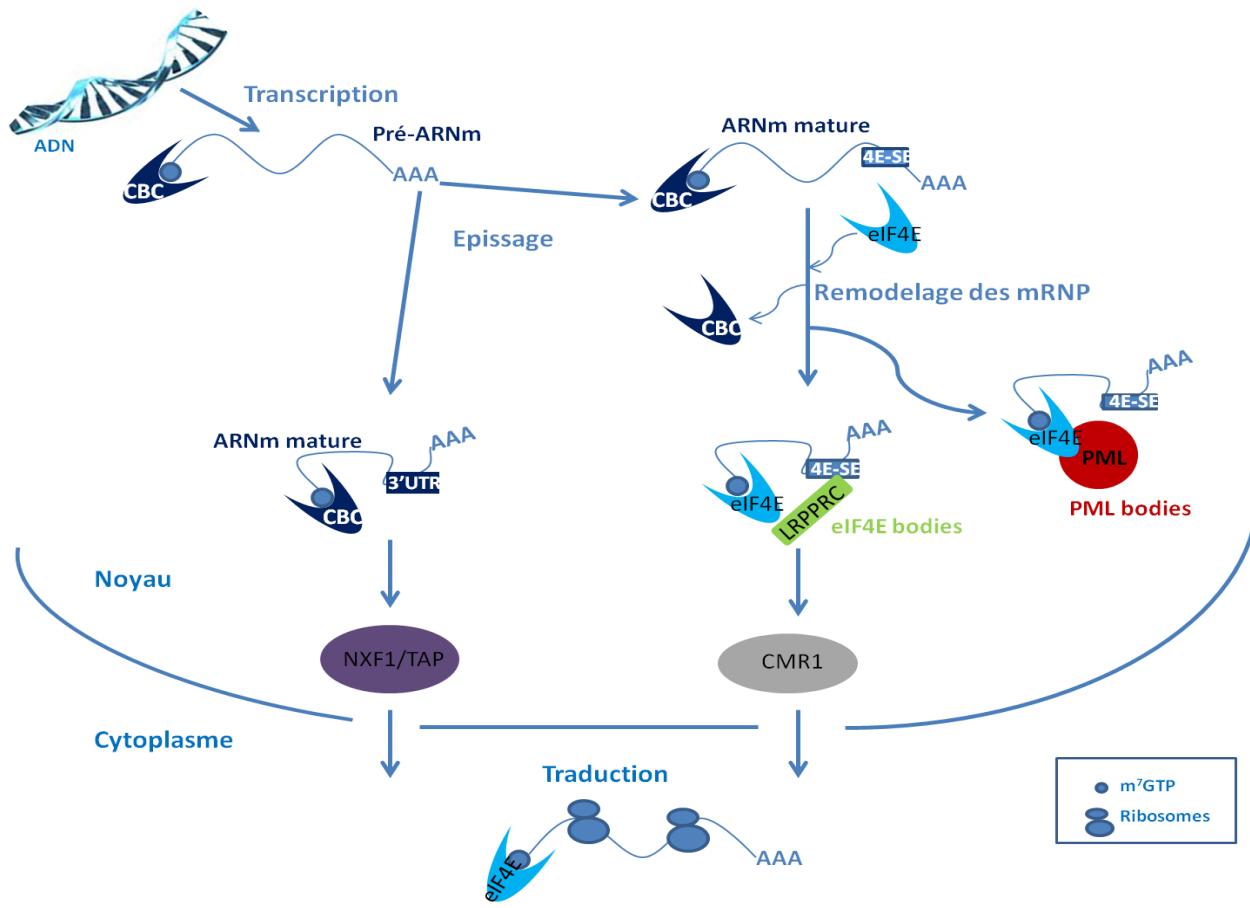


Figure 18 : Modèle récapitulatif de l'export nucléaire par défaut des ARNm et l'export nucléaire des ARNm eIF4E dépendant.

Les ARNm portant l'élément 4E-SE en 3'UTR sont transcrits puis maturés de la même manière que les autres ARNm. La CBC est ensuite remplacée par eIF4E sur la coiffe des ARNm eIF4E-dépendant. Ils peuvent alors être stockés dans les PML bodies, où PML inhibe l'export nucléaire, ou être exportés dans le cytoplasme sous forme de mRNP grâce à CMR1. Les ARNm ne comportant pas l'élément 4E-SE seront exportés par le complexe NXF1/TAP. Adapté de (Topisirovic et al., 2009)

B.2.3. PRH-HOXA9, deux 4E-IPs régulatrices de l'export dépendant d'eIF4E

PRH et HOXA9 sont toutes deux des facteurs de transcription à homéodomains (HD) exprimés dans les cellules hématopoïétiques, jouant un rôle dans l'hématopoïèse. Dans les cellules hématopoïétiques, PRH est fortement exprimée dans les cellules progénitrices des lymphocytes B ainsi que dans la lignée pluripotente érythromyeloïde, et est peu exprimée lors de la différenciation des lignées hématopoïétiques (Jayaraman et al., 2000). En dehors de ce système, PRH est exprimée seulement dans un nombre limité de tissus, tels que le foie, le poumon, le thymus et les cellules endothéliales. En plus de son rôle de répresseur

transcriptionnel, PRH joue le rôle de répresseur post-transcriptionnel de l'expression de certains gènes en modulant l'activité d'EIF4E (Topisirovic et al., 2003). Elle colocalise avec les EIF4E nuclear bodies et utilise son motif de liaison à EIF4E en s'associant directement sur sa surface dorsale. La surexpression de PRH entraîne la disparition des EIF4E nuclear bodies et la répression sélective de l'export des ARNm EIF4E-dépendant (Topisirovic et al., 2003). Son mécanisme d'action est différent de celui utilisé par PML puisque l'association PRH/EIF4E ne déstabilise pas l'affinité d'EIF4E pour la coiffe. PRH agit en exerçant une compétition pour le site de liaison à EIF4E avec d'autres 4E-IPs, régulateurs positifs de l'export dépendant d'EIF4E, comme LRPPRC ou encore HOXA9 qui joue un rôle important au niveau de l'hématopoïèse chez l'adulte. La surexpression de PML bloque la différenciation et l'immortalisation des progéniteurs myéloïdes.

HOXA9 possède également un motif de liaison à EIF4E, et colocalise avec EIF4E dans le cytoplasme et dans le noyau. Il est capable d'augmenter à la fois la traduction et l'export des ARNm sensibles à EIF4E (Topisirovic et al., 2005) indépendamment de son activité sur la transcription, et tout comme PRH, l'interaction EIF4E/HOXA9 ne déstabilise pas l'affinité d'EIF4E pour la coiffe. HOXA9 et PRH présentent plus ou moins la même affinité pour EIF4E. Il est donc possible que la compétition entre HOXA9 et PRH pour le site de liaison à EIF4E dans les lignées myéloïdes contribue au mécanisme moléculaire de la modulation de l'export des ARNm dépendant d'EIF4E par les protéines à HD.

Il existe plus de 200 membres de la famille des protéines à HD qui possèdent un site putatif de liaison à EIF4E (Topisirovic et al., 2005). Parmi eux, de nombreux régulateurs de l'export nucléaire EIF4E-dépendant ont été identifiés, tels que PML, qui va jouer le rôle d'inhibiteur général de l'export, ou PRH et HOXA9, qui vont jouer un rôle régulateur spécifique dans certains tissus. Ces régulateurs peuvent moduler l'export et parfois simultanément l'expression de transcrits impliqués dans la prolifération, le cycle cellulaire ou encore les mécanismes de survie *via* le contrôle des fonctions d'EIF4E. Cette régulation de l'export des ARNm EIF4E-dépendants et de leur traduction permettrait une meilleure plasticité cellulaire dans la réponse immédiate des cellules à un stress ou à des conditions environnementales particulières, sans avoir à reprogrammer la transcription. Au regard de la spécificité de certains régulateurs, de leur actions antagonistes, et du nombre potentiel de nouvelles 4E-IPs dans les protéines à HD, il est possible que la régulation de l'activité d'EIF4E par ces protéines se fasse de manière commune, et qu'elles utilisent cette fonction pour établir un pattern d'expression des gènes

spatio-temporel nécessaire dans l'embryogénèse et la morphogénèse. De plus, ces protéines ayant une expression dans un tissu particulier, chaque régulateur modulerait l'activité d'EIF4E de façon tissu spécifique, modulant ainsi la croissance et la survie des cellules en développement ou dans les tissus adultes (revue (Topisirovic and Borden, 2005).

En résumé, eIF4E est une cible centrale pour réguler la prolifération et la survie cellulaire. La régulation d'EIF4E est redondante et multifactorielle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. eIF4E agit en effet à au moins 3 niveaux différents de la régulation de l'expression des gènes. Au niveau nucléaire, eIF4E coordonne l'export et donc la surexpression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie. Dans le cytoplasme, il joue un rôle central dans l'étape d'initiation de la traduction mais est également impliqué au niveau des P-bodies et des granules de stress, jouant ainsi sur la stabilité et la séquestration de certains transcrits. Ces fonctions sont fondamentalement liées au fait qu'eIF4E est capable de lier la coiffe des ARNm, mais sont régulées par des mécanismes différents qui sont tous initiés par la fixation d'un partenaire sur la surface dorsale d'EIF4E. Les 4E-IPs créent de véritables réseaux de régulations post transcriptionnelles via eIF4E, qui parfois se superposent, et qui permettent aux cellules de fournir une réponse rapide aux conditions développementales et environnementales. Il est donc crucial de connaître ces 4E-IPs et leur fonction régulatrice sur eIF4E, notamment parce qu'elles vont moduler le rôle oncogénique d'EIF4E.

C. La surface dorsale d'EIF4E, un site très convoité!

C.1 YXXXXL, la clé évolutive pour accéder à eIF4E?

Les analyses de cristallographie et les comparaisons de séquences ont montré que l'interaction entre eIF4E et ses partenaires implique dans la plupart des cas la présence d'un motif YXXXXLΦ sur le partenaire. Une mutation sur le Y ou le L est suffisante pour empêcher l'interaction entre eIF4E et son partenaire (Mader et al., 1995). La Maskin est la seule des 4E-IPs contenant un motif consensus de type YXXXXLΦ à porter un motif modifié, le Y étant remplacé par un T. Le groupement OH de la thréonine pourrait être suffisant pour jouer le rôle de la tyrosine dans l'interaction avec eIF4E. Cependant, l'interaction

eIF4E/Maskin a été montrée comme étant très faible et reste assez controversée (Kosak, 2006).

La plupart des études structurales ont été menées sur les deux partenaires principaux d'eIF4E : 4E-BP et eIF4G. Comme présentés précédemment, les peptides 4E-BP et eIF4G s'associent plus ou moins de la même manière sur la surface dorsale d'eIF4E, en subissant une transition d'une structure désordonnée vers une conformation en L, comprenant une hélice alpha et une chaîne étendue (Marcotrigiano et al., 1999). Les peptides occupent la même poche sur la surface dorsale convexe d'eIF4E, dans laquelle on retrouve le W73^{eIF4E}, essentiel pour l'interaction d'eIF4E avec eIF4G et 4E-BP (Matsuo et al., 1997).

Peu d'études structurales ont été menées sur les autres 4E-IPs, mais au regard de la conservation du motif, de l'impact des mutations sur les acides aminés Y et T du motif, ainsi que celle sur le W73 dans la poche dorsale d'eIF4E (Matsuo et al., 1997), il est certain que ce motif est essentiel pour l'interaction et il est fort probable que les 4E-IPs s'associent de la même manière au niveau de la surface dorsale d'eIF4E.

Certaines 4E-IP ne possèdent pas le motif YXXXXLΦ. CYFIP1 par exemple se lie sur la même région d'eIF4E en possédant une séquence qui adopte la même conformation que le motif consensus, et interagit avec eIF4E de manière exclusive (Figure 19 c-d) (Napoli et al., 2008). D'autres 4E-IP vont interagir d'une façon totalement différente, avec un RING domaine (Protéine Z, PML) au niveau d'un nouveau site de liaison à eIF4E (Volpon et al., 2010) (Figure 19a-b).

La liaison sur la surface dorsale d'eIF4E se présente donc comme le procédé de régulation majeur d'eIF4E même si les protéines portant le domaine RING font exception. Malgré que la présence d'un motif consensus de type YXXXXLΦ soit essentielle pour lier eIF4E sur la plupart des 4E-IPs, la capacité de lier eIF4E s'acquiert également par d'autres types de motif (exemple RING domaine, ou motif CYFIP1), ce qui ouvre un champ de possibilités beaucoup plus vaste dans la recherche de potentielles 4E-IPs.

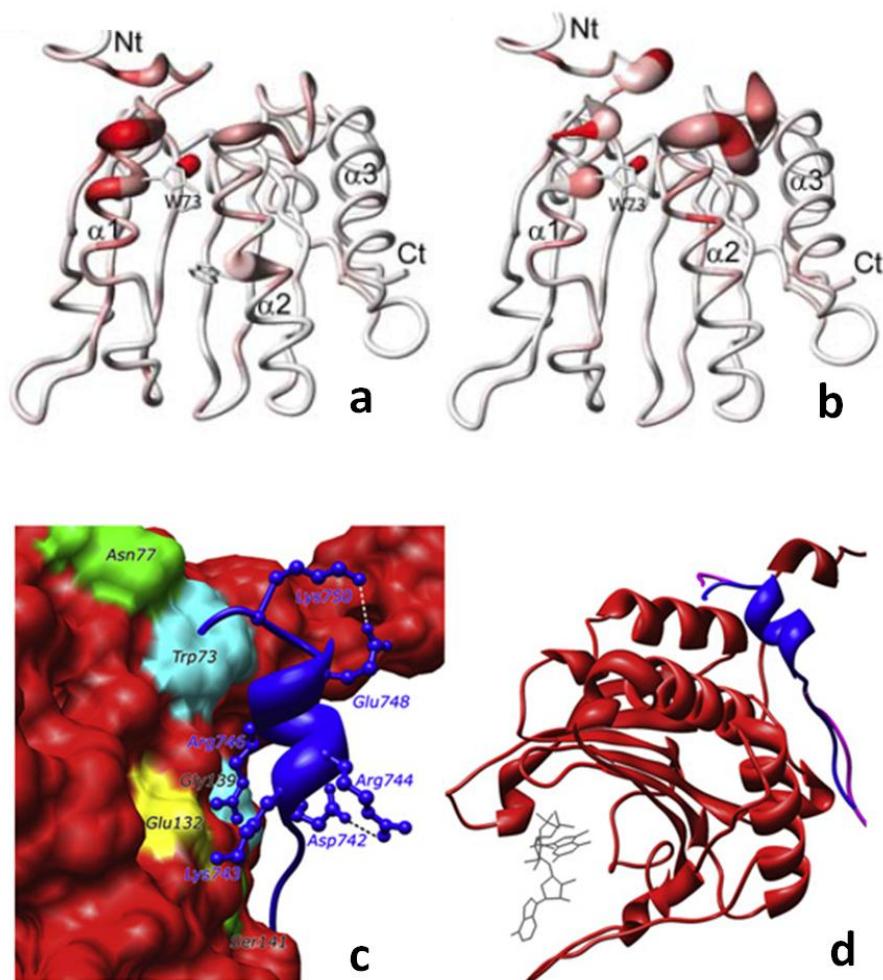


Figure 19 : Divergence dans les modalités d'interaction avec eIF4E : CYFIP1 et Protéine Z

a-b La protéine Z et eIF4G interagissent avec des domaines distincts d'eIF4E. Détermination par RMN de la surface d'interaction sur eIF4E lorsqu'il forme un complexe avec la protéine Z (a), ou avec un peptide d'eIF4G (b). En rouge sont notés les résidus d'eIF4E qui sont affectés par l'interaction.

c-d CYFIP1 se lie à eIF4E de la même manière que les 4E-BPs. (c)Modèle d'interaction du peptide CYFIP1 (bleu) avec la surface dorsale convexe d'eIF4E (rouge). (d)Prédiction structurale du complexe formé entre le peptide CYFIP1 (bleu) ou le peptide 4E-BP contenant le motif YXXXXLΦ avec eIF4E (rouge) et la coiffe (structure grise).

Comme détaillé ci-dessus, les 4E-IPs modulent la fonction d'eIF4E dans des processus biologiques totalement différents. Le manque de relation phylogénétique entre les différentes 4E-IPs, leurs rôles additionnels dans d'autres processus parfois très éloignés, et la variabilité du motif utilisé pour interagir avec eIF4E (Table 2) indiquent que l'apparition de la liaison à

eIF4E s'est faite de manière indépendante, dans différents groupes taxonomiques, sur des molécules préexistantes jouant un rôle dans de nombreux processus cellulaires ou viraux. Cette dispersion des 4E-IPs en terme de fonction et de phylogénie a rendu leur découverte souvent hasardeuse.

C.2 4E-IPs wanted

La plupart des 4E-IPs ont été mises en évidence par des analyses fonctionnelles (ex : Bicoid, PML, PRH), des analyses de protéomique quantitative (ex: Gemin5), des analyses de m⁷GTP pull down ou de RNP pull down suivies par des analyses de spectrométrie de masse (ex: LRPPRC). Certaines analyses ont utilisé la recherche bio-informatique du motif YXXXXLΦ dans des protéines appartenant à la même famille qu'un partenaire d'eIF4E déjà validé (protéine à HD). Cette dernière technique a permis de mettre en évidence 200 partenaires putatifs d'eIF4E (Topisirovic et al., 2005), dont certains comme la protéine HOXA9 ont été validés.

Le motif YXXXXLΦ a beau être un élément quasi obligatoire pour l'interaction avec eIF4E, il est néanmoins insuffisant pour partir à la recherche de nouveaux partenaires d'eIF4E dans le protéome humain. En effet, en recherchant cette séquence dans Uniprot, on retrouve plus d'un tiers des protéines du protéome humain contenant ce motif. En exemple, la protéine LRPPRC possède dans sa séquence 3 motifs YXXXXLΦ mais seulement deux de ses sites sont fonctionnels pour l'interaction avec eIF4E (Topisirovic et al., 2009).

Des études biophysiques plus poussées (Niedzwiecka et al., 2002) ont montré que des peptides d'une quinzaine d'acides aminés contenant le motif de liaison à eIF4E des protéines eIF4G1, eIF4G2, 4E-BP1 avaient une affinité différente pour eIF4E de l'ordre 10⁻⁷ M⁻¹, avec par ordre décroissant d'affinité : eIF4G1>4E-BP1>eIF4G2. Les acides aminés autour du motif d'interaction jouent donc un rôle important dans l'interaction avec eIF4E, en modulant leur affinité pour eIF4E. Le motif consensus d'interaction YXXXXLΦ n'est par conséquent pas suffisant pour déterminer si une protéine sera une 4E-IPs ou non. La redéfinition de ce motif d'interaction, prenant en compte une dizaine d'acides aminés contenant le motif YXXXXLΦ, nous a permis d'améliorer la sélectivité du criblage et de trouver 14 familles se présentant comme partenaires potentiels d'eIF4E. La validation d'une de ces familles sera présentée dans la partie des résultats et fait l'objet d'une publication (Gosselin et al, en préparation).

C.3 Effet des 4E-IPs sur la liaison à la coiffe

eIF4E est une protéine qui exerce sa fonction indépendamment de toute activité biochimique. Elle tire sa fonction de sa capacité à lier la coiffe des ARNm mais aussi des partenaires avec lesquels elle interagit. Les 4E-IPs n'ont pas la même capacité à moduler l'affinité d'eIF4E pour la coiffe. PML, avec son RING domaine, est une exception et va réduire l'affinité d'eIF4E pour la coiffe d'environ 100 fois (Cohen et al., 2001). Au contraire, HOXA9 et PRH n'affectent que modestement l'affinité d'eIF4E pour la coiffe (moins de 10 fois) (Topisirovic et al., 2003; Topisirovic et al., 2005). A l'inverse de ces protéines, l'affinité d'eIF4E pour la coiffe va augmenter lorsqu'il s'associe avec eIF4G et 4E-BP (von der Haar et al., 2004). Par exemple, un fragment d'eIF4G de 100 résidus va augmenter l'affinité d'eIF4E de levure pour la coiffe de 10 fois (Ptushkina et al., 1999) tandis que les études menées avec un plus petit peptide 4G sur l'eIF4E d'humain et de souris montrent une augmentation de l'affinité par deux (Friedland et al., 2005). La liaison de 4E-BP1 et eIF4G sur eIF4E entraîne en réalité un changement de structure au niveau d'eIF4E qui se retrouve dans une conformation plus réceptive pour fixer la coiffe (Volpon et al., 2006; Siddiqui et al., 2012). Lorsqu'eIF4E est liée à la coiffe, l'affinité pour eIF4E des peptides eIF4G et 4E-BPs augmente (Shen et al., 2001; von der Haar et al., 2004; Tomoo et al., 2005).

L'effet des 4E-IPs sur la liaison d'eIF4E à la coiffe, en dehors de leur affinité respective pour eIF4E, va être important pour déterminer le rôle de l'interaction entre eIF4E et ses partenaires. Selon la taille du peptide utilisé pour 4E-BP et eIF4G, l'effet sur la liaison à la coiffe sera différent (Marcotrigiano et al., 1999; Ptushkina et al., 1999). Il est donc crucial d'aborder structuralement les interactions eIF4E/4E-IPs dans leur ensemble, et pas seulement au niveau du motif conservé, ceci pour évaluer quelles sont les régulations complexes qui déterminent la compétition entre chaque partenaire et les conséquences que vont avoir ces interactions sur la fonction d'eIF4E.

Objectifs de la thèse

La régulation fine des mécanismes traducentiels est impliquée dans de grandes fonctions cellulaires, telles que le cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération, la survie et la mort cellulaire, ou encore, au cours du développement embryonnaire. La perte de contrôle de la traduction est associée à des pathologies comme le cancer (Robert and Pelletier, 2009) ou encore dans des maladies neurologiques (Costa-Mattioli et al., 2009). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le facteur d'initiation eIF4E est l'un des acteurs moléculaires de la traduction le plus étudié, notamment parce qu'il joue un rôle critique dans l'étape d'initiation de la traduction, mais également parce qu'il présente un fort potentiel oncogénique. Dans la cellule, il est soumis à de multiples régulations, majoritairement par le biais de ses nombreux partenaires. Malgré un nombre de données structurales et fonctionnelles disponibles abondant, il reste de nombreuses zones d'ombre concernant la régulation des interactions entre eIF4E et ses partenaires.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur ces interactions en développant 2 axes de réflexion :

- Dans la première partie de ma thèse, je me suis focalisée sur l'étude structurale des interactions entre eIF4E et ses partenaires. Mon premier objectif a été de caractériser de manière structurale l'interaction entre eIF4E et 4E-BP pour répondre à une des questions majeures concernant l'association eIF4E/4E-BP, à savoir si les extrémités de 4E-BP, en dehors du motif central, prennent part à la formation du complexe. Ces résultats ont été publiés dans Nucleic Acid Research (Gosselin et al., 2011). Dans un second temps, j'ai abordé une étude sur les différences d'affinités des trois classes d'eIF4E pour leurs deux partenaires principaux, eIF4G et 4E-BP en recherchant des différences structurales entre les trois eIF4E qui permettraient d'expliquer ces propriétés.
- Mon deuxième axe de réflexion au cours de cette thèse s'est orienté vers la régulation spécifique d'eIF4E grâce à l'apparition de nouveaux partenaires au cours de l'évolution, se basant sur la découverte d'un nouveau partenaire d'eIF4E : Angel1. Mon objectif a été de caractériser ce nouveau partenaire d'eIF4E et d'évaluer le rôle de l'interaction entre eIF4E et cette nouvelle 4E-IP. Les résultats sont présentés dans le cadre d'un manuscrit en préparation et de résultats complémentaires.

Chapitre I : Études des relations structure/fonction au cœur des régulations de l'étape d'initiation de la traduction

Dans l'introduction, nous avons mis l'emphase sur le fait que le contrôle traductionnel est majoritairement exercé au niveau de l'étape d'initiation de la traduction, en grande partie par l'association du facteur eIF4E avec différents partenaires sous la forme d'une interaction de type clé/serrure, où la clé correspond au motif de type YXXXXLΦ, et la serrure à la surface convexe dorsale d'eIF4E. Dans ce chapitre de résultats, nous avons étudié les propriétés structurales (A) du répresseur général de la traduction 4E-BP et (B) des différentes formes d'eIF4E à la base des propriétés d'association entre eIF4E et ses partenaires eIF4G et 4E-BP. À partir de ces données, nous remettrons en cause le côté trop réductionniste de la conception de l'interaction entre la surface convexe dorsale d'eIF4E et le motif YXXXXLΦ pour caractériser l'interaction entre eIF4E et ses partenaires.

A. Analyse structurale du complexe eIF4E/4E-BP

Article 1 : Gosselin P., Oulhen N., Jam M., Rzonca J., Cormier P., Czjzek M., Cosson B.(2011). "The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E : New structural insights by SAXS". Nucleic Acids Res 39(8) : 3496-3503.

Ce premier travail a pour objectif de caractériser la structure du répresseur général de la traduction 4E-BP lorsqu'il s'associe à eIF4E afin d'éclaircir les mécanismes mis en jeu pour réguler la formation de ce complexe.

Avec la technique de cristallographie, la nature désordonnée de la protéine 4E-BP n'a permis qu'une étude structurale partielle du complexe eIF4E/4E-BP puisque seule la partie centrale de 4E-BP (acides aminés 47-66) contenant le motif consensus de reconnaissance pour eIF4E (YxxxxLφ) se structure (Marcotrigiano et al., 1999; Tomoo et al., 2005). Il est donc couramment admis que cette région centrale subit une transition désordre/ordre et joue un rôle dans l'interaction eIF4E/4E-BP, le reste de la protéine restant désordonné, même lorsque 4E-BP est associé à eIF4E (Fletcher et al., 1998). Néanmoins, le rôle des phosphorylations de 4E-BP sur la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP (Oulhen et al., 2009) ainsi que les mécanismes fins qui régulent l'association/dissociation entre eIF4E et 4E-BP (Youtani et al., 2000) ne sont pas encore totalement compris. Il est donc important de reconsidérer la structure de 4E-BP lorsqu'il est lié à eIF4E, notamment parce que plusieurs études indiquent qu'il

pourrait exister des contacts entre 4E-BP et eIF4E, en dehors de l'interaction entre le peptide central de 4E-BP et la surface dorsale convexe d'eIF4E (Tomoo et al., 2006; Mizuno et al. 2007).

Pour remédier à ce manque de données structurales sur la protéine 4E-BP pleine longueur, nous avons utilisé une méthode originale d'analyse structurale de diffusion aux petits angles (Small Angles X-ray Scattering). Cette méthode permet d'aborder en solution la structure de protéines intrinsèquement désordonnées, très flexibles, ou celle de gros complexes moléculaires, en déterminant l'enveloppe tridimensionnelle de ces molécules.

Les résultats obtenus en SAXS démontrent une nette compaction de 4E-BP lorsqu'il s'associe à eIF4E. L'analyse de ces données structurales, combinée à l'analyse des données de cristallographie et de RMN publiées sur ce complexe (Matsuo et al., 1997; Marcotrigiano et al., 1999), met en évidence que les parties adjacentes du motif central de 4E-BP jouent un rôle dans l'interaction eIF4E/4E-BP et permet de construire un nouveau modèle d'interaction entre eIF4E et 4E-BP. Ce modèle met en jeu des interactions de type "fuzzy", ou dynamiques, qui participent à la formation du complexe.

"fuzzy complex" (Tompa et al., 2008) est un terme qui définit un nouveau concept d'interaction entre deux protéines dont au moins une possède un domaine désordonné. Ce domaine prend part à l'interaction sous forme de contact dynamique sans pour autant pouvoir être défini par une conformation structurale classique (c'est à dire qu'il n'y a pas de degré de structure secondaire mais plutôt une conformation en brin bêta, qui ne peut être détectée par les méthodes d'analyses structurales classiques).

Discussion

Cette vision de l'association entre eIF4E/4E-BP apporte de nouvelles perspectives dans la compréhension de la régulation de la formation du complexe. En effet, la mise en évidence d'interactions dynamiques entre eIF4E et 4E-BP implique que les extrémités de 4E-BP jouent un rôle dans l'affinité de 4E-BP pour eIF4E ainsi que dans la stabilisation du complexe. La régulation par phosphorylation de 4E-BP sur des sites se trouvant distants du motif de reconnaissance à eIF4E prend alors plus de sens, pouvant ainsi perturber les interactions dynamiques qui se créent entre les deux partenaires. Depuis le début des années 1980, la liaison d'eIF4E avec ses partenaires est souvent réduite à une simple interaction de type clé/serrure, du fait de la présence du motif de liaison à eIF4E YXXXXLΦ sur la plupart de

ces partenaires. Prenant en compte mes résultats et ceux d'autres études tout aussi récentes, il me semble important de ne pas réduire les interactions entre eIF4E et ses partenaires à la simple interaction entre le motif YXXXXLΦ et la surface dorsale convexe d'eIF4E. Parallèlement à notre étude, Paku et collab. ont montré par des analyses de SPR et d' ITC (Isothermal Titration Calorimetry) qu'il existe un deuxième motif conservé sur la partie C-terminale de 4E-BP de séquence PGVTS/T (résidus 79-83), permettant de stabiliser l'interaction avec eIF4E de façon auxiliaire en interagissant avec la partie N-terminale d'eIF4E (Paku et al., 2012). La configuration de 4E-BP sur eIF4E qu'ils proposent est différente de celle que nous avons modélisée, mais permet également d'envisager un repliement de 4E-BP autour d'eIF4E. Notre étude et celle de Paku, par des moyens d'analyses différents, ont pu mettre en évidence l'existence d'interactions stabilisatrices entre eIF4E et 4E-BP en dehors de la région centrale de 4E-BP.

Un deuxième motif sur l'extrémité N-terminale d'eIF4G est également impliqué dans l'interaction eIF4E/eIF4G de séquence SDVVL (résidus 597-601) (Umenaga et al., 2011). Umenaga et collab. établissent ici l'importance de ce deuxième motif de liaison sur eIF4G qui agit de manière auxiliaire, mais indispensable à la stabilisation de la liaison eIF4E/eIF4G. En effet, les constantes d'association et de dissociation avec eIF4E sont deux à trois fois plus fortes pour un peptide 4E-BP1 qu'un peptide eIF4G contenant ce deuxième site, ce qui suggère qu'eIF4G a moins d'affinité pour eIF4E que 4E-BP mais présente une résistance plus forte à la dissociation du complexe. La liaison entre la surface dorsale d'eIF4E et le motif d'interaction consensus YXXXXLΦ des partenaires est essentielle, mais d'autres liaisons engagées dans la formation du complexe vont déterminer les constantes d'association et de dissociation entre les différents partenaires. La capacité d'une molécule à lier eIF4E à un temps donné dépend également de l'issue de la compétition entre les différents partenaires de l'environnement moléculaire d'eIF4E. Cette compétition pourra être modulée par des processus de phosphorylation, de dégradation ou encore de localisation différentielle des partenaires.

Cette nouvelle vision apporte de nombreuses pistes pour rechercher d'éventuelles modifications supplémentaires sur 4E-BP ou sur eIF4E qui puissent déstabiliser la formation du complexe. Ces résultats ouvrent également un axe de réflexion sur la nature désordonnée de 4E-BP et sur le lien structure/fonction qui caractérise cette protéine. Une réflexion sur l'avantage du désordre dans la structure de 4E-BP, et de sa signification en terme de régulation et de rôle physiologique sera présentée à la suite de cet article.

The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS

Pauline Gosselin^{1,2,3,*}, Nathalie Oulhen^{1,2,3}, Murielle Jam^{3,4,5}, Justyna Ronzca^{3,4,5},
Patrick Cormier^{1,2,3}, Mirjam Czjzek^{3,4,5} and Bertrand Cosson^{1,2,3}

¹UPMC Univ Paris 06, UMR 7150, Mer et Santé, Equipe Traduction Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff (SBR), 29680 Roscoff, ²CNRS, UMR 7150, SBR, 29680 Roscoff,

³Université Européenne de Bretagne, Bretagne, ⁴UPMC Univ Paris 06, UMR 7139, Végétaux marins et biomolécules, SBR, 29680 Roscoff and ⁵CNRS, UMR 7139, SBR, 29680 Roscoff, France

Received October 25, 2010; Revised December 3, 2010; Accepted December 7, 2010

ABSTRACT

eIF4E binding protein (4E-BP) inhibits translation of capped mRNA by binding to the initiation factor eIF4E and is known to be mostly or completely unstructured in both free and bound states. Using small angle X-ray scattering (SAXS), we report here the analysis of 4E-BP structure in solution, which reveals that while 4E-BP is intrinsically disordered in the free state, it undergoes a dramatic compaction in the bound state. Our results demonstrate that 4E-BP and eIF4E form a ‘fuzzy complex’, challenging current visions of eIF4E/4E-BP complex regulation.

INTRODUCTION

Translation is a complex process that is critical for gene regulation during development, differentiation, nervous system function, aging and disease. In eukaryotes, translation of mRNA begins with specific recognition of the 5'-cap structure by the highly conserved eukaryotic Initiation Factor 4E, eIF4E, a master switch in translation initiation that participates in recruiting mRNAs to the ribosome (1). This cap-dependent initiation process is mainly regulated by the eIF4E binding protein (4E-BP), a small protein of ~13 kDa, which plays the role of an important repressor of translation.

4E-BP is known to prevent the association of eIF4E with the large scaffolding protein eIF4G that acts as a docking site for several proteins required to bridge the ribosome and the mRNA. 4E-BP shares with eIF4G the eIF4E-binding motif YXXXXLΦ (where X is any amino acid and Φ is a hydrophobic residue) (2) that interacts with the convex dorsal surface of eIF4E. Binding of 4E-BP to eIF4E is classically described as resulting from

the interaction between the 4E-BP central consensus motif and eIF4E, which is dependent upon the phosphorylation status of 4E-BP (3,4). Nevertheless, the regulation of the association/dissociation (5) as well as the molecular mechanisms occurring during eIF4E/4E-BP complex formation are not fully understood yet, even if eIF4E and its repressor 4E-BP are to date some of the most characterized chemically and biophysically cap-dependent initiation factors. A new structural study of the eIF4E/4E-BP complex is therefore important to better understand the regulation of cap-dependent initiation.

Previous high-resolution X-ray crystallography revealed that the eIF4E recognition motif contained in the 4E-BP1 peptide (residues 51–67) undergoes a folded transition upon binding to eIF4E forming an L-shaped structure consisting of an extended chain region and a short α -helix (6). Until now, the unfolded nature of 4E-BP outside of the central peptide has been an obstacle for conventional structural methods and consequently no structure of the eIF4E/4E-BP full length complex has been obtained. Nuclear magnetic resonance (NMR) approaches have concluded in a mostly or completely unstructured 4E-BP1 in both free and bound states (7), and have shown in a very indirect manner that the binding footprint of 4E-BP on eIF4E might be larger than the one established by crystallography (8). Nevertheless, it is generally considered that only the central peptide of 4E-BP plays a major role in the eIF4E/4E-BP complex formation, and that consequently, flexible sections that flank the central peptide of 4E-BP do not.

Interestingly, recent data showed that 4E-BP, unlike eIF4G, is still able to interact with eIF4E when the eIF4E-binding site is occupied by the small pharmacologic compound 4EGi-1 (for eIF4E/eIF4G interaction inhibitor) (9). These data are difficult to integrate if 4E-BP

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 98 29 23 23; Fax: +33 2 98 29 23 24; Email: gosselin@sb-roscoff.fr
Present address:

Nathalie Oulhen, Department of Molecular and Cell Biology and Biochemistry Brown University, Providence RI 02912, USA.

remains disordered when associated with eIF4E. Therefore, since this statement is in contradiction with biochemical data (9) and the eIF4E/4E-BP complex formation remains not well understood, we decided to reconsider the folding status of 4E-BP associated with eIF4E. We applied the appropriate and increasingly used method for the structural analysis in solution, namely small angles X-ray scattering (SAXS). SAXS has proven to be a fundamental tool for the study of biological molecules in solution (10–13). The originality of this method lies in the fact that it can provide structural information on molecules exhibiting some intrinsic disorder, flexibility or heterogeneity, which usually constitutes a major obstacle for the other classical structural methods. Applying this technique to study the eIF4E/4E-BP complex, we observed for the first time the entire structure at low resolution of the complex eIF4E/full-length 4E-BP and show a dramatic compaction of 4E-BP while it interacts with eIF4E. The combination of our results to other previous structural analysis, allowed us to build a new model of interaction, involving a much larger binding footprint of 4E-BP on eIF4E.

MATERIALS AND METHODS

Proteins expression and purification

The construction of the plasmid pAr encoding eIF4E1 from *mus musculus* has already been described (14) and the protocol to produce and purify eIF4E1 tagged FLAG was performed as described herein. The cloning of *Strongylocentrotus purpuratus* Sp4E-BP was performed using a *S. purpuratus* cDNA library. The 342-bp fragment corresponding to the Sp4E-BP coding region was amplified by PCR and inserted into the pFO4 vector digested with BamH1 and EcoR1. 4E-BP, with an Histidine tag, was overexpressed in the BL21 (DE3) strain *Escherichia coli* (Novagen). Cellular pellet from bacteria were resuspended in 5 volumes buffer A (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 80 mM imidazole, pH 8). Cells were lysed using French Press with an amplitude of 1.6. The lysate was then incubated 30 min at 4°C with 1% Triton (Sigma) and clarified by centrifugation at 10 000g for 30 min. The clarified supernatant was then injected on an affinity column, packed with a chelating sepharose Fast Flow Resin preloaded with Ni²⁺ ions (Amersham Pharmacia Biotech), previously equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and the protein was eluted with a gradient of imidazole from 80 to 500 mM. Eluates were analyzed by SDS-PAGE for the presence of the desired product. The fractions containing the recombinant product were combined, and concentrated using Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10 kDa). The protein was then loaded onto a Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech) and eluted in buffer C (50 mM Phosphate, 300 mM NaCl, pH 8). The proteins were concentrated with Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10 kDa) and the concentration of the purified proteins was estimated with a Nanodrop ND-1000.

After production and purification, 1.5 mg of eIF4E1 was incubated for 1 h with 500 µl of m⁷GTP sepharose beads (Amersham Pharmacia Biolabs) in buffer CAP (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, pH 7.7). After washing, the beads were incubated for 1 h in buffer CAP containing 1 mg/ml of BSA, 0.5% Igepal with 4 mg of 4E-BP. After extensive washing, the complex was eluted from the affinity column with 200 µM of free m⁷GTP in buffer CAP. After concentration with Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10 kDa), the complex was then loaded onto a Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech) and eluted in buffer CAP. The peak containing the complex was concentrated with an Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10 kDa). The quality of the purified proteins was analyzed by SDS-PAGE (Supplementary Figure S1). As expected we observed two bands with the sample containing the complex of eIF4E and 4E-BP. Quantification with the image analysis software ImageQuant reveals a ratio of 2.1 between the two bands corresponding, respectively, to eIF4E and 4E-BP, consistent with a stoichiometry ratio of 1:1 since 4E-BP is two times smaller than eIF4E.

SAXS experiments

SAXS experiments were carried out twice on the beamline ID14-3 at the European Synchrotron facility (ESRF), Grenoble, France and on the beamline X33 at the DORIS-III storage ring at DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron), Hamburg, Germany. Data have been treated on both beamlines, showing essentially the same results. However, the higher brilliance of the beam at the ESRF consequently was more suitable for analyzing our protein concentrations, which is why the data shown here only come from the beamline ID14-3. On ID14-3, the wavelength was 0.931 Å and the sample-to-detector distance was 1.67 m, leading to scattering vectors q ranging from 0.1 to 5 nm⁻¹. Due to the low concentration of some of our samples (~1 mg/ml), the data beyond 0.25 Å⁻¹ were statistically not exploitable and were therefore truncated in order to enhance the analysis quality. The scattering vector is defined as $q = 4\pi/\lambda \sin \theta/2$, where 2θ is the scattering angle. The detector used was an X-ray detector Pilatus 1 M from Dectris coupled to a CCD camera and 10 successive frames of 10 s exposure time were recorded for each sample. Each frame was carefully checked for possible bubble formation or radiation-induced aggregation. If such effects were not observed, the individual frames were averaged. A 4.8 mg/ml solution of BSA was measured as a reference and for calibration procedures. Up to five different concentrations of each protein sample were measured to test for consistency and eventually detect and eliminate concentration dependent effects. Background scattering was quantified before and after each protein measurement by measuring the corresponding buffer, which is then subtracted from the protein patterns using the Primus suite (15). All experiments were performed at 16°C.

Data evaluation. For high concentrations of 4E-BP, the experimental SAXS data were not linear in the Guinier

plot of the low q region, indicating that the proteins undergo aggregation. We only used the scattering profile for concentrations below 6 mg/ml. The radius of gyration, R_g , was derived by the Guinier approximation: $I(q) = I(0)\exp(-q^2 R_g^2/3)$ up to $qR_g < 1.0$. The radii of gyration, R_g , calculated for different 4E-BP concentrations display concentration dependence at high concentration, indicating the presence of attractive interactions of the particles in solution. The R_g was approximated for a theoretical concentration of 0 mg/ml. The R_g calculated for different complex eIF4E/4E-BP concentrations display no concentration dependence and indicate the absence of interaction in solution. The program GNOM (16) was used to compute the pair-distance distribution functions $P(r)$. This approach gives the maximum dimension of the macromolecule D_{\max} and offers an alternative calculation of R_g , which is based on the entire scattering curve. Data evaluation for free eIF4E is reported in the [Supplementary Data](#).

Ab Initio modeling of the overall shapes. The overall shapes of all assemblies were restored from the experimental data by three independent programs (detailed in [Supplementary Data](#)): DAMMIN, GASBOR and DAMMIF (17). The scattering profiles were used up to $q_{\max} = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$. Nine low-resolution models obtained from different runs were compared using the program DAMAVER (18) to give an estimate of the reproducibility of the results inferred from the *ab initio* shape calculation and to construct the average model representing the general structural features of all the reconstruction filtered by DAMFILT.

The 'drag' option of the program Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) was then used to position manually the crystal structure of eIF4E (19) into the low-resolution envelope of eIF4E obtained by SAXS measurements ([Supplementary Figure S2](#)). The same method was applied to position the crystal structure of the complex eIF4E/ 4E-BP peptide (20) into the low-resolution

envelope of the complex eIF4E/4E-BP, respectively (Figure 2c). To establish this crystal structure, Tomoo *et al.* (20) used a 4E-BP peptide containing the amino acids from 36 to 70 but only the residues 47–66 are finally present in the structure because they were the only ones visible on the electron density. The Protein Data Bank accession codes for eIF4E and eIF4E/4E-BP peptide crystal structures are respectively 1L8B and 1WKW.

These structural superimpositions of the partial crystal structures and the low resolution solution structures obtained by SAXS measurements demonstrate that the overall shape of the eIF4E/4E-BP complex does not coincide with the shape of eIF4E free in solution but clearly results from the association of 4E-BP and eIF4E. The goodness of fit for all atomic models, as well as the low resolution models, was determined using the χ^2 discrepancy (15) reported in the experimental data (Table 1).

Construction of the structural model of 4E-BP embracing eIF4E—construction of the structural model of 4E-BP embracing eIF4E. The residues of yeast eIF4E that were affected by the binding of 4E-BP have been identified by NMR titration measurements in ref. (8). We have transferred these residues onto eIF4E1 crystal structure from mouse by structural superimposition of the respective three-dimensional (3D) structures. Since no specific secondary or tertiary structuration of 4E-BP is assumed within the fuzzy complex, the most extended residue conformation (i.e. β -strand) was chosen to mimic the intrinsically unstructured 'arms' of 4E-BP. Consequently, starting from the crystal structure of eIF4E in complex with the 4E-BP1 peptide (20), the according N- and C-terminal residues were sequentially added to the central 4E-BP peptide with standard extended β -strand conformation following the residues on eIF4E that were affected by 4E-BP binding, using the interactive graphical software TURBO (21). Residues were added, covering the external surface of eIF4E, until 'free dangling' ends of 4E-BP were produced. The ending residues were chosen arbitrarily to be situated five residues beyond the surface

Table 1. Experimental and model SAXS parameters

Proteins	Exp. $I(0)^a$	Conc. (mg/ml) ^b	Estimated Mr (kDa) ^c	Mr ^d (kDa)	Number of amino acids	R_g (GNOM) ^e	R_g (Guinier) ^e	D_{\max}^f (nm)	$X^{(\text{over})}$	$X^{(\text{crys})}$	Damaver NSD ^g
4E-BP	4883	1.86	20	12.8	117	4.86 ± 0.22	4.88 ± 0.17	16.0 ± 0.8	0.430	NA	2.50 ± 0.14
eIF4E	4256	1.26	26.6	25.05	217	2.34 ± 0.11	2.23 ± 0.44	6.8 ± 0.6	0.433	1364	ND
eIF4E/4E-BP Complex	5922	1.11	41.9	37.058	334	3.60 ± 0.03	3.52 ± 0.04	12.1 ± 0.6	1.360	NA	1.40 ± 0.08
BSA	40247	4.8		66.3	582	ND	3.1 ± 0.2	9.0 ± 0.4	ND	ND	ND

^aValues for $I(0)$ have been extrapolated by the Guinier approximation from the experimental scattering profiles.

^bConcentration of the protein used for the calculation of the estimated Mr.

^cRelative molecular mass estimated from $I(0)$ and the concentration of the protein through BSA calibration.

^dRelative molecular mass predicted from the sequence.

^e R_g (Guinier), R_g (GNOM), radius of gyration given by the Guinier approximation, and calculated by the program GNOM, respectively, given in nm.

^fMaximum dimension of the macromolecules.

^g $X^{(\text{over})}$ Discrepancy between the SAXS profile and its fit by the overall shapes-models calculated by DAMMIF, and $X^{(\text{crys})}$ the average discrepancy of the best atomic models estimated with the program CRYSTAL ([Supplementary Data](#)). ND, not determined; NA, not appropriate.

^aAverage of the normalized spatial discrepancies (NSD) obtained by Damaver for the different *ab initio* models generated by DAMMIF, DAMMIN and GASBOR.

of eIF4E and no molecular contact closer than 4.0 Å with eIF4E was designed. Glycine residues are well known to be involved in hinge regions. Considering that the central binding peptide of 4E-BP is flanked by two sequential glycines (G38 and G39) on the N-terminal side and by repeated glycines at positions 79, 86 and 88 on the C-terminal side, these glycine residues were chosen to perform rotational adjustments for the extended arms of 4E-BP to follow the external surface of eIF4E without producing sterical clashes. Sterical clashes were evaluated by distance—any atom of a residue was checked to be no closer than 3.0 Å.

RESULTS

In our study, as a representative translational repressor, we used the 4E-BP protein from the sea urchin (*S. purpuratus*), a sister group to chordates (22), that has only one 4E-BP. In vertebrates, the ancestral gene for 4E-BP underwent duplication giving rise to three 4E-BPs (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) in mammals. Both 4E-binding motif and phosphorylation sites of 4E-BPs are strongly conserved in distantly-related species (22) as well as the entire sequence of the protein (Supplementary Figure S5). Moreover, we previously conducted an extensive functional analysis showing that variants mimicking hyperphosphorylation of Sp 4E-BP and its mammalian counterpart displayed similar properties (5). The wild-type version of these proteins represses translation to a similar extent when added in a mammalian reticulocyte lysate (Supplementary Figure S4), indicating that Sp 4E-BP is functional to inhibit mammalian eIF4E.

Disorder predicted from the primary sequence

Intrinsically disordered protein prediction is a necessary prerequisite for the complete understanding of protein folding. Initially, we analyzed the primary sequence of *S. purpuratus* 4E-BP (Sp 4E-BP, Supplementary Figure S3) using various algorithms that predict disorder, in order to localize consensus disordered regions as described in ref. (23). This approach showed that 4E-BP is a mostly intrinsically disordered protein. Only a short central domain, containing the eIF4E-binding motif (YDRNFLM) that displayed a hydrophobic cluster, is predicted to be structured. We observed the same pattern for the human 4E-BP1 (data not shown). The central domain predicted to be structured in our analysis corresponds to the one that undergoes a folded transition in an α -helix upon binding to eIF4E in the crystal structure (6,20).

Solution structure of the free 4E-BP

To determine the solution structure of 4E-BP, we used SAXS analysis. The 4E-BP scattering profile (Figure 1a) was obtained as described in Methods. The Kratky profile (Figure 1a, inset), derived from the scattering profile, had a plateau-shaped appearance typical of unfolded proteins or extended molecules (24). Analysis of the scattering curve for low q gave a radius of gyration (R_g) of 4.88 nm determined by the Guinier approximation,

suggesting that the protein possesses a very extended state with a maximum distance of 16.0 nm (Table 1). In comparison, a typical globular protein of same molecular mass, such as for example Neocarzinostatin (25), has a R_g value of 1.4 nm. The overall envelope of 4E-BP was calculated *ab initio* from its scattering profile using DAMMIF and the most typical shape is provided Figure 1b. The program DAMAVER allowed us to align the *ab initio* models and gave us an average envelope of 4E-BP free in solution displaying a normalized spatial discrepancy (NSD) of 2.50 (Table 1). The numerous independent runs yielded recurrent features consistent with an extended three-branched shape. Conceptually, a structure with three branches can only be formed if there is a folding in the central region of the disordered protein, consistent with the prediction of a central structured region. This would imply that, in solution, the central region of 4E-BP is to some extent pre-structured, facilitating the interaction with eIF4E by protecting the hydrophobic region containing the eIF4E-binding site.

4E-BP compacts upon binding to eIF4E

This successful SAXS analysis of 4E-BP then led us to determine the eIF4E/4E-BP complex structure using full length recombinant 4E-BP. SAXS analysis of the complex produced the scattering curve (Figure 2a), with the Kratky profile in the inset, consisting of an approximate bell-shaped curve typical of a largely folded conformation (24). The binding affinities of homologous proteins (non-phosphorylated 4E-BPs for human eIF4E) are high

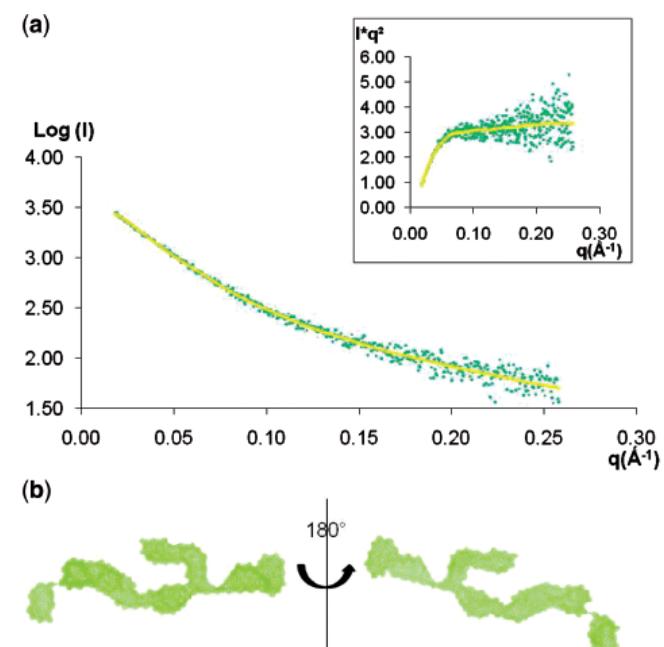


Figure 1. Structure of 4E-BP free in solution. (a) Experimental SAXS profile of 4E-BP (green dots) fitted by the scattering curves calculated with the program DAMMIF (yellow). Inset: Kratky plot $[I(q)q^2]$ versus q with a plateau illustrating specifically the unfolded nature of 4E-BP. (b) Example of the most typical shape of 4E-BP, as obtained by DAMMIF, shown in two orientations rotated by 180°.

(estimated K_D values of 10^{-8} – 10^{-9}) (26), and suggest that, after gel filtration of the formed complex, we are not in presence of an equilibrium between the free and the complexed proteins in solution. Moreover, the calculated molecular mass of the scattering particles of the complex, derived from the experimental forward scattering intensity $I(0)$ that was measured (Table 1), is in total agreement with the expected molecular mass, validating the fact that only the complex is present in solution. Analysis of the scattering curve in the low q region with the Guinier approximation gave an R_g of 3.52 nm with a maximal distance (D_{\max}) of 12.1 nm (Table 1). We first controlled that the R_g and D_{\max} of the complex were superior to the ones we obtained for eIF4E (R_g Guinier = 2.23 nm; D_{\max} = 6.8 nm) (Table 1). We then compared these values to the ones obtained from the scattering curve of 4E-BP free in solution. R_g and D_{\max} of the complex were

clearly inferior, thus demonstrating that the complex eIF4E/4E-BP is much less extended than 4E-BP itself. These results show that the 4E-BP in complex with eIF4E is more compact than free in solution and undergoes partial refolding upon interaction with eIF4E. The overall envelopes of the complex were calculated *ab initio* from its scattering profile using DAMMIF and subsequently compared with the program DAMAVER that computes the NSD value for the obtained shapes. The various calculations led to similar forms with an average of the NSD values (1.40) significantly lower than the average found for 4E-BP free state (2.50) (Table 1), providing additional evidence that 4E-BP undergoes a compaction in the bound state. The recurrent shape of the complex was composed of three modules (Figure 2b), one central that always displays the same shape, and two others with slightly different orientations relative to the central

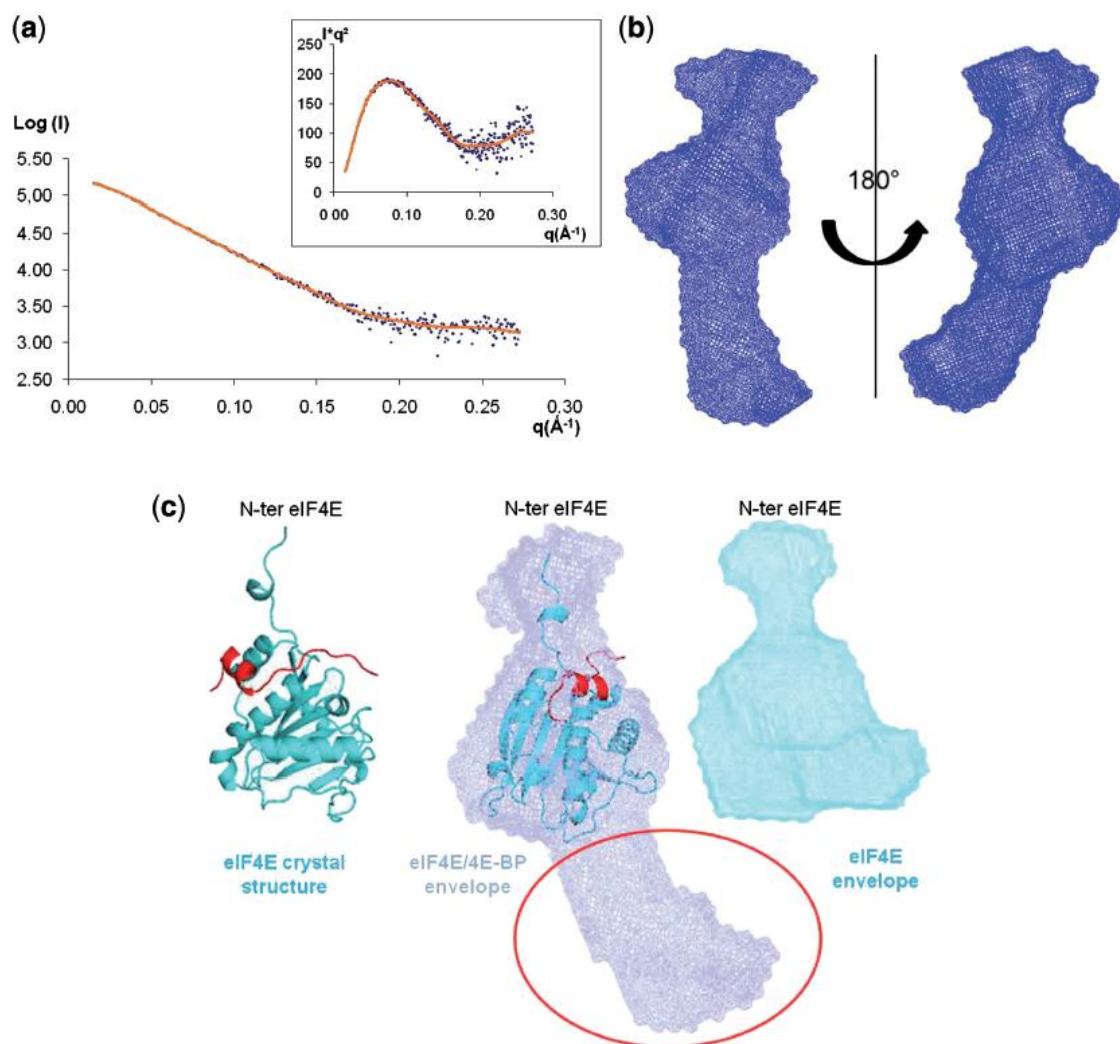


Figure 2. Structure of 4E-BP bound to eIF4E in solution. (a) Experimental SAXS profile of the complex 4E-BP/eIF4E (blue dots) fitted by the scattering curves calculated with the program DAMMIF (brown). Inset: Kratky plot $[I(q)q^2]$ versus q showing a typical profile of a partially unfolded protein. (b) Example of the most typical shape of the complex 4E-BP/eIF4E, as obtained by DAMMIF, shown in two orientations rotated by 180° . (c) Example of the most typical shape of the complex 4E-BP/eIF4E displayed in a blue transparent surface representation, superimposed with the crystal structure of eIF4E lacking the 30 amino acids on N-terminal (blue) and complexed with the 4E-BP peptide (red) (PDB number: 1WKW) (20). The position of the N-terminal extremity has been determined in the Supplementary Figure S2. The red circle indicates the position of the extended extremities of 4E-BP full-length. In cyan blue is displayed the average low resolution model for the free eIF4E.

shape in the different runs, characteristic of disordered regions. The most typical shape of the complex obtained with DAMMIF is illustrated in Figure 2b. We superimposed the crystal structure of eIF4E lacking the N-terminal 30 residues fragment, complexed with a 4E-BP peptide (20) (Figure 2c), by rotation and translation to fit the envelope. The atomic structure of eIF4E superimposed adequately and unambiguously with the central module of the low-resolution model. The N-terminal 30 residues fragment of eIF4E has never been observed in the eIF4E crystal structure due to its high flexibility. Consequently, we determined that these N-terminal residues constitute the adjacent module, using SAXS data collected for recombinant full length eIF4E free in solution (Supplementary Figure S2). The third module (red circle, Figure 2c) therefore could not be attributed to the crystal structure of eIF4E, and obviously belonged to 4E-BP.

DISCUSSION

The intrinsically disordered nature of 4E-BP in solution has hampered its full-length structure determination in the past (6,7). We have applied an original structural method which is receiving a growing interest, that gives access to low-resolution structures of biological molecules in solution (10). By comparing the experimental SAXS scattering curves of eIF4E and 4E-BP alone with the one for the purified eIF4E/4E-BP complex and by deriving *ab initio* solution structures, we have gained new structural insight into the determinant interactions for complex formation.

The SAXS envelope obtained for the complex is constituted by three modules, in which we localized eIF4E. Given that the central peptide of 4E-BP is known to interact with eIF4E at the dorsal molecular surface of the eIF4E cap-binding pocket (6,20), we conclude that the parts adjoining each side of the central motif also interact along eIF4E and that the extremities of 4E-BP form a disordered portion corresponding to the third module of the SAXS envelope (Figure 2c). Therefore, the interaction of eIF4E with the central peptide and its adjoining sides causes the partial folding of 4E-BP and supports the fact that 4E-BP reorganizes and compacts when it interacts with eIF4E. In this picture, 4E-BP, as an intrinsically disordered protein, has the advantage to 'catch' more easily eIF4E with its extended arm-like structures. Using its extremities to embrace eIF4E, 4E-BP would then strengthen the interaction while forming a fuzzy complex (27): a 'fuzzy complex' is constituted of at least one intrinsically unstructured/disordered protein. The parts of the complex that contribute productively to binding and function are structurally ill-defined, and cannot be described by a classical single conformational state. Comparing with complexes of ordered and globular proteins, intrinsically disordered proteins employ distinct molecular principles of protein–protein recognition and the interfaces are more hydrophobic and often cover a much larger part of the surfaces of the protein (28). Taking all together, our

data strongly suggest that the interaction between eIF4E and 4E-BP not only relies on the central peptide, as currently thought, but that the binding footprint of 4E-BP appears to be larger and should involve contacts outside of this sequence.

A previous NMR study (8) has indirectly determined the potential sites on eIF4E that are affected when 4E-BP binds eIF4E. From these data, we designed a model of interaction between eIF4E and 4E-BP taking into account the compaction of 4E-BP upon binding to eIF4E (Figure 3). Following the potential 4E-BP binding sites on eIF4E identified by NMR, we were able to add the N- and C-terminal stretches of 4E-BP onto the crystal structure of the peptide complex, designing residues until 4E-BP extremities reached the eIF4E boundaries (roughly from residues 25 to 88, Figure 3a). We further observe that this model fits perfectly with the SAXS complex surface (Figure 3b).

In addition, multiple sequence alignments of 4E-BP sequences from distantly-related species (Supplementary Figure S5) reveal that the amino acids from 30 to 86 are highly conserved with >90% identity between the species. The apparent evolutionary pressure towards conservation of primary structure within these regions supports the notion that not only the L-shaped central domain [residues 47–66, (20)] but also its adjoining sides have a functional significance. Thus, these flanking parts of the central motif (residues 30–46 and 67–86) may provide a physical link through dynamic contacts with eIF4E. In the C-terminal extremity, only one or two residues are conserved (105–107) apart from the mTOR-signaling (TOS) (29) motif at the very end of the sequence. In contrast, residues of the N-terminal region, plus the RAIP motif (named after its sequence) (29), are mostly conserved suggesting that the N-terminal extremity would be more interesting for investigating potential avidity hot spots involved in the interaction with eIF4E, as suggested by Abiko *et al.* (30).

This new model of interaction helps to reinterpret data that could not be explained by binding of the 4E-BP central peptide alone to eIF4E. For instance, it could explain why in presence of 4EGi-1 (9), 4E-BP still binds to eIF4E while eIF4G cannot bind. Indeed, a NMR study (31) showed that eIF4G establishes extensive contacts with the normally disordered N-terminal extremity of eIF4E, in addition to the binding of the consensus motif. In contrast, our model of full-length 4E-BP with eIF4E rather covers the structured part of eIF4E and does not appear to interact with the disordered N-terminal part. This is in agreement with the observation that there is an apparent overlapping but non-identical binding site of eIF4G and 4E-BPs (31).

The vision of a larger footprint brings also new insights for the understanding of the association/dissociation of the complex controlled by 4E-BP phosphorylation that is not fully understood yet (5). Indeed, it was shown by Oulhen *et al.* (5) that the phosphorylation of the following sites, namely T37, T46, S65, T70 on 4E-BP, was necessary but not sufficient to prevent the association between eIF4E and 4E-BP, contrary to what was currently thought. Our model gives thus new leads to investigate

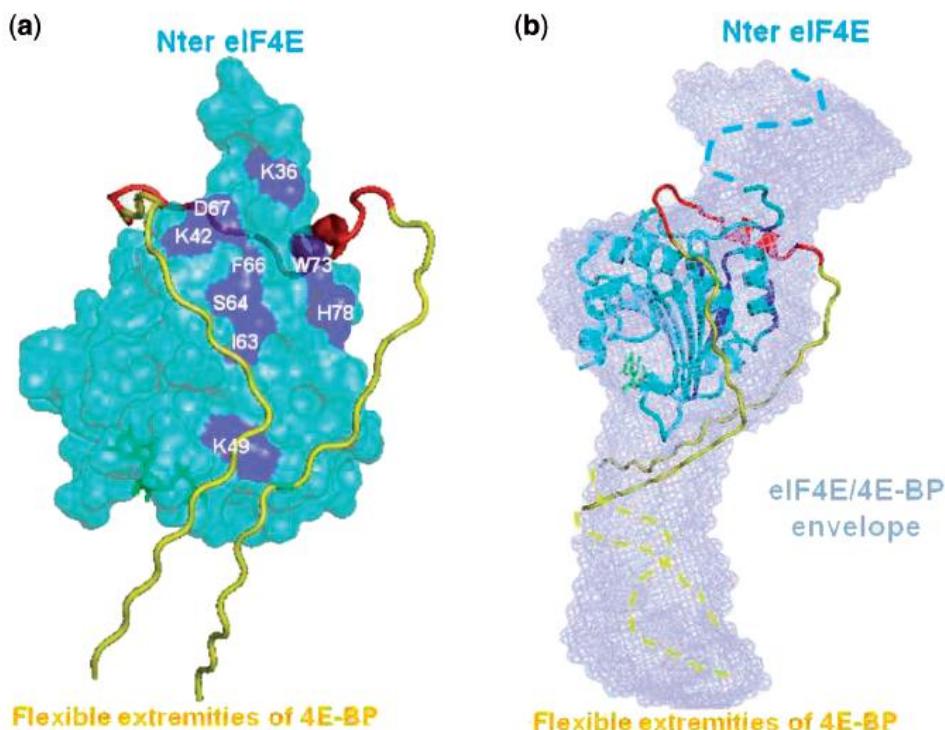


Figure 3. Structural model of 4E-BP embracing eIF4E. (a) eIF4E crystal surface (lacking the 30 amino acids on N-terminal) is represented in cyan blue, on which the 4E-BP binding sites established by NMR are indicated in dark blue (labeled residues are the one visible from this orientation). The 4E-BP1 peptide (residues 47–66) (20) (red helix) has been prolonged in N- and C-terminal with standard extended β -strand conformation in yellow until five residues beyond the surface of eIF4E to visualize the entrance in the third module of the complex SAXS envelope. The cap (m^7 GTP) is represented in green. (b) The structural model built in (a) is superimposed with the SAXS envelope of the eIF4E/4E-BP full-length complex. The eIF4E crystal structure is displayed in cartoons instead of surface in (a) and rotated by 90°. The blue dotted-line represents the disordered module of the 30 amino acids on the N-terminal of eIF4E, missing on the crystallographic structure. The yellow dotted-line symbolized 4E-BP extremities that constitute the disordered section corresponding to the third module of the complex SAXS envelope.

potential modifications, well outside of the central motif, that would participate and would be essential in the release of 4E-BP from eIF4E.

As a crucial translational repressor, the demonstration that unstructured free 4E-BP reorganizes subsequent to eIF4E binding changes the current vision of the regulation of the eIF4E/4E-BP complex formation and stabilization, and gives new perspectives for the understanding of translational control.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank N. Sonenberg, M. Bidinosti and G. Wessel for critical reading of the article. We also thank the staff members of the beamline ID14-3, particularly A. Round, at the European Synchrotron Radiation Facilities, Grenoble, France, for beam time and technical assistance. We acknowledge A. Kikhney, A. Zozulya and D. Svergun for the use of and assistance with the X33 SAXS beamline of the European Molecular Biology Laboratory outstation, Deutsches Electronen Synchrotron, Hamburg.

FUNDING

UPMC Univ Paris 06 grants (BQR); Ligue Nationale contre le Cancer (Délegations Départementales Finistère, Morbihan, Vendée et Côte d'Armor to B.C.); Conseil Régional de Bretagne and Conseil Général du Finistère. Funding for open access charge: Institutional funding (CNRS/UPMC).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Sonenberg,N. and Hinnebusch,A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731–745.
2. Mader,S., Lee,H., Pause,A. and Sonenberg,N. (1995) The translation initiation-factor Eif-4e binds to a common motif shared by the translation factor Eif-4-gamma and the translational repressors 4e-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4990–4997.
3. Pause,A., Belsham,G.J., Gingras,A.C., Donze,O., Lin,T.A., Lawrence,J.C. Jr and Sonenberg,N. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, **371**, 762–767.
4. Gingras,A.C., Kennedy,S.G., O'Leary,M.A., Sonenberg,N. and Hay,N. (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.*, **12**, 502–513.
5. Oulhen,N., Boulben,S., Bidinosti,M., Morales,J., Cormier,P. and Cosson,B. (2009) A variant mimicking hyperphosphorylated

- 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS ONE*, **4**, e5070.
6. Marcotrigiano,J., Gingras,A.C., Sonenberg,N. and Burley,S.K. (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell*, **3**, 707–716.
7. Fletcher,C.M. and Wagner,G. (1998) The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein. *Protein Sci.*, **7**, 1639–1642.
8. Matsuo,H., Li,H., McGuire,A.M., Fletcher,C.M., Gingras,A.C., Sonenberg,N. and Wagner,G. (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 717–724.
9. Moerke,N.J., Aktas,H., Chen,H., Cantel,S., Reibarkh,M.Y., Fahmy,A., Gross,J.D., Degterev,A., Yuan,J. and Chorev,M. (2007) Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell*, **128**, 257–267.
10. Hura,G.L., Menon,A.L., Hammel,M., Rambo,R.P., Poole,F.L. 2nd, Tsutakawa,S.E., Jenney,F.E. Jr, Classen,S., Frankel,K.A., Hopkins,R.C. *et al.* (2009) Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat. Methods*, **6**, 606–612.
11. Longhi,S., Receveur-Brechet,V., Karlin,D., Johansson,K., Darbon,H., Bhella,D., Yeo,R., Finet,S. and Canard,B. (2003) The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18638–18648.
12. Pang,S.S., Berry,R., Chen,Z., Kjer-Nielsen,L., Perugini,M.A., King,G.F., Wang,C., Chew,S.H., La Gruta,N.L., Williams,N.K. *et al.* (2010) The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor. *Nature*, **467**, 844–848.
13. Rosenberg,O.S., Deindl,S., Sung,R.J., Nairn,A.C. and Kuriyan,J. (2005) Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell*, **123**, 849–860.
14. Pyronnet,S., Imataka,H., Gingras,A.C., Fukunaga,R., Hunter,T. and Sonenberg,N. (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnkl to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.*, **18**, 270–279.
15. Konarev,P.V., Volkov,V.V., Sokolova,A.V., Koch,M.H.J. and Svergun,D.I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, **36**, 1277–1282.
16. Svergun,D.I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.*, **25**, 495–503.
17. Franke,D. and Svergun,D.I. (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.*, **42**, 342–346.
18. Volkov,V.V. and Svergun,D.I. (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 860–864.
19. Niedzwiecka,A., Marcotrigiano,J., Stepinski,J., Jankowska-Anyszka,M., Wyslouch-Cieszynska,A., Dadlez,M., Gingras,A.C., Mak,P., Darzynkiewicz,E., Sonenberg,N. *et al.* (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J. Mol. Biol.*, **319**, 615–635.
20. Tomoo,K., Matsushita,Y., Fujisaki,H., Abiko,F., Shen,X., Taniguchi,T., Miyagawa,H., Kitamura,K., Miura,K. and Ishida,T. (2005) Structural basis for mRNA Cap-binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods. *Biochim. Biophys. Acta*, **1753**, 191–208.
21. Roussel,A. and Cambillau,C. (1991) TURBO-FRODO. *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*. Silicon Graphics, Mountain View, CA, p. 89.
22. Morales,J., Mulner-Lorillon,O., Cosson,B., Morin,E., Belle,R., Bradham,C.A., Beane,W.S. and Cormier,P. (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.*, **300**, 293–307.
23. Leyrat,C., Gerard,F.C., de Almeida Ribeiro,E. Jr, Ivanov,I., Ruigrok,R.W. and Jamin,M. (2010) Structural disorder in proteins of the Rhabdoviridae replication complex. *Protein Pept. Lett.*, **17**, 979–987.
24. Putnam,C.D., Hammel,M., Hura,G.L. and Tainer,J.A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.*, **40**, 191–285.
25. Perez,J., Vachette,P., Russo,D., Desmadrid,M. and Durand,D. (2001) Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all-beta protein investigated by small-angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.*, **308**, 721–743.
26. Youtani,T., Tomoo,K., Ishida,T., Miyoshi,H. and Miura,K. (2000) Regulation of human eIF4E by 4E-BP1: binding analysis using surface plasmon resonance. *IUBMB Life*, **49**, 27–31.
27. Tompa,P. and Fuxreiter,M. (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 2–8.
28. Meszaros,B., Tompa,P., Simon,I. and Dosztanyi,Z. (2007) Molecular principles of the interactions of disordered proteins. *J. Mol. Biol.*, **372**, 549–561.
29. Beugnet,A., Wang,X. and Proud,C.G. (2003) Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40717–40722.
30. Abiko,F., Tomoo,K., Mizuno,A., Morino,S., Imataka,H. and Ishida,T. (2007) Binding preference of eIF4E for 4E-binding protein isoform and function of eIF4E N-terminal flexible region for interaction, studied by SPR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 667–672.
31. Gross,J.D., Moerke,N.J., von der Haar,T., Lugovskoy,A.A., Sachs,A.B., McCarthy,J.E. and Wagner,G. (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, **115**, 739–750.

SUPPLEMENTARY METHODS

Disorder prediction using the D-score—The amino acid sequence of *Strongylocentrotus purpuratus* 4E-BP was submitted to different algorithms available through WEB servers (MD2st, DorA, IUPred, Globplot2, RONN, FoldUnfold, DisEMBL, DisEMBLloops, DisEMBLHotloops, Disopred, OnD-crf, VLXT, VL3).

Sp 4E-BP sequence:

MSAPAASRQLSAGRDI PSKRVTVNDP SQLPHDYSTTPGGTLFSTTPGGTRIIYDRNFL
NMRNSPLSQTPPKNLPSI PGVTCPEVGAGAEKPNGARKTATKT DPAEDQFQMDI

For each prediction, each residue is ranked in a binary manner as ordered or disordered using the default thresholds set in the WEB servers and without accounting for the statistical weights provided by some servers. A score of 0 is attributed to each residue predicted to be disordered, whereas a score of 1 is attributed to each one predicted to be in a structured region. For each residue, the values obtained from the different predictors are added and divided by the number of used algorithms in order to normalize the score. The calculated D-score varies from 0 to 1, and consensus disordered regions are arbitrarily defined as regions with a normalized D-score < 0.50.

eIF4E solution structure analysis—The protein sample of eIF4E aggregated during concentration steps, probably due to a weak solubility in the CAP buffer. Consequently only low concentrations were exploitable leading to low resolution data that were not sufficient to carry out ab initio modeling. To measure the overall average shape for an eIF4E protein in solution, with the aim to compare it to the ab initio model obtained for the complex and assure that it is not simply the envelope of eIF4E free in solution, we collected data for eIF4E3 (one of the three isoforms of eIF4E (Joshi et al., 2004)) from sea urchin, which shares 33% of identity with eIF4E1 mouse. eIF4E1 and eIF4E3 shared the same Rg and Dmax reported Table 1.

eIF4E structure—Using Pymol, the atomic structure of eIF4E (PDB number : 1L8B) was positioned into the average overall shape (DAMMIF) of eIF4E obtained by SAXS measurement on eIF4E3 (Supplementary Fig.2b). In the crystal structure (Marcotrigiano et al., 1997), 30 amino acids at the N-terminal extremity of eIF4E are missing, due to structural flexibility of this region. We therefore used the program TURBO-Frodo (Roussel A, 1989) to add these residues as poly-alanine onto the atomic structure. This general-purpose molecular modeling environment allowed us to add by hand 30 residues on the N-terminal extremity. Four different of all possible conformations were modeled, each having a probability of 25% to exist, in order to simulate the flexibility of this eIF4E region (Supplementary Fig.2a). This new structural model including a mimic of the disordered 30 amino acids was superimposed with the SAXS envelope of eIF4E, generated by DAMMIF (Supplementary Fig.2b).

The program CRYSTAL (Svergun D.I., 1995) was used to calculate the theoretical SAXS profiles of the atomic structures and to compare them with the experimental scattering profiles (Supplementary Fig.2c), namely to compare the sea urchin eIF4E3 SAXS profile with mouse eIF4E1 crystallographic structure with or without the added 30 residues. The model including the 4 conformations of the 30 N-terminal residues to simulate flexibility led to a better overall fit (1,364) and the predicted Rg value (2.21 nm) was much closer to the one obtained by experimental SAXS measurements (2.34 nm). We show that the N-terminal extremity of eIF4E is very flexible, in accordance with an increased Rg value obtained for the entire

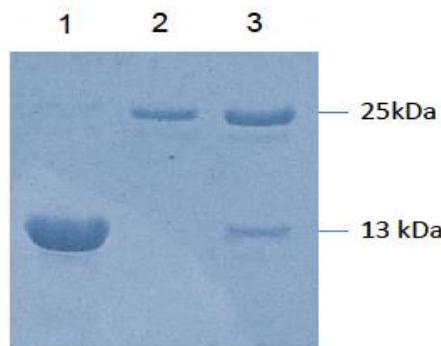
protein in solution as compared to that of the crystal structure missing this region but also that the overall envelope determined with eIF4E3 is representative of an eIF4E shape in solution.

SAXS ab initio programs : The DAMMIN (Svergun, 1999) method calculates the scattering intensities of a particle composed of a finite number of dummy beads and minimizes the exposed surface of the particle to the solvent. DAMMIF (Franke D., 2009) implements a new algorithm which speeds up model reconstruction by a factor of 25-40 in comparison with DAMMIN. GASBOR (Svergun D. I., 2001) searches a chain-compatible spatial distribution of an exact number of dummy residues, which corresponds to the C α atoms of protein amino acids.

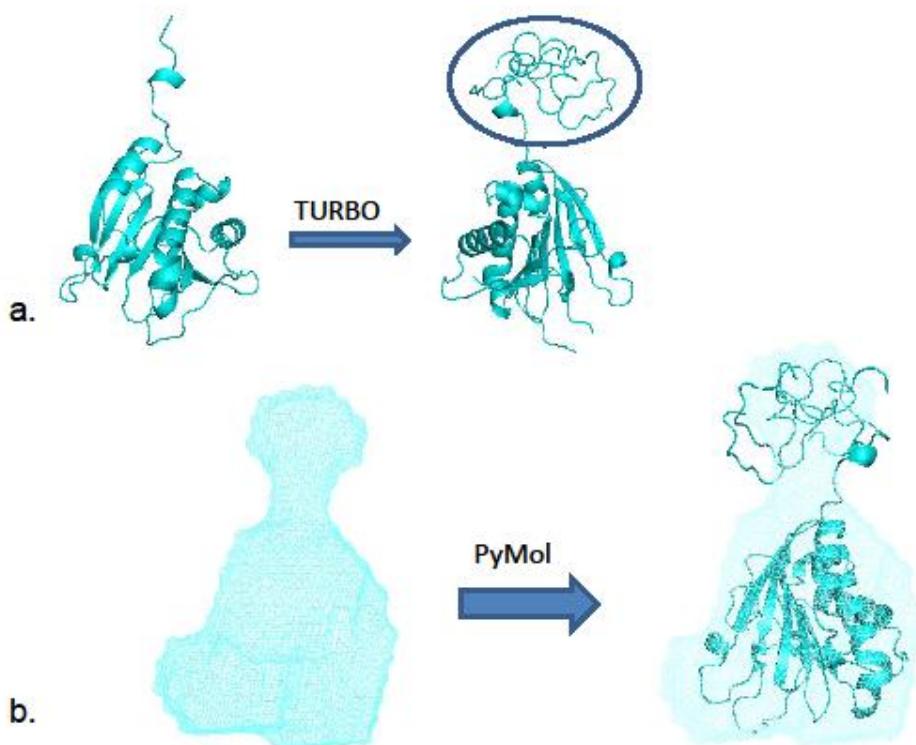
REFERENCES

- Franke D, Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Cryst* 42 : 342-346.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41** : p. 95-98
- Joshi, B., Cameron, A., and Jagus, R. (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem.* **271**(11) : p. 2189-203.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1997) Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell.* **89**(6) : p. 951-61.
- Roussel A, Cambillau C (1989) TURBO-FRODO. Silicon Graphics Geometry Partners Directory Mountain View, CA : Silicon Graphics
- Svergun D I, Pethoukov MV, Koch MH (2001) Determination of domain structure of proteins from X- ray solution scattering. *Biophys J* 80 : 2946-2953
- Svergun DI, Barberato C, Koch MH (1995) CRYSTOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28 : 768-773
- Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* 76 : 2879-2886

SUPPLEMENTARY DATA

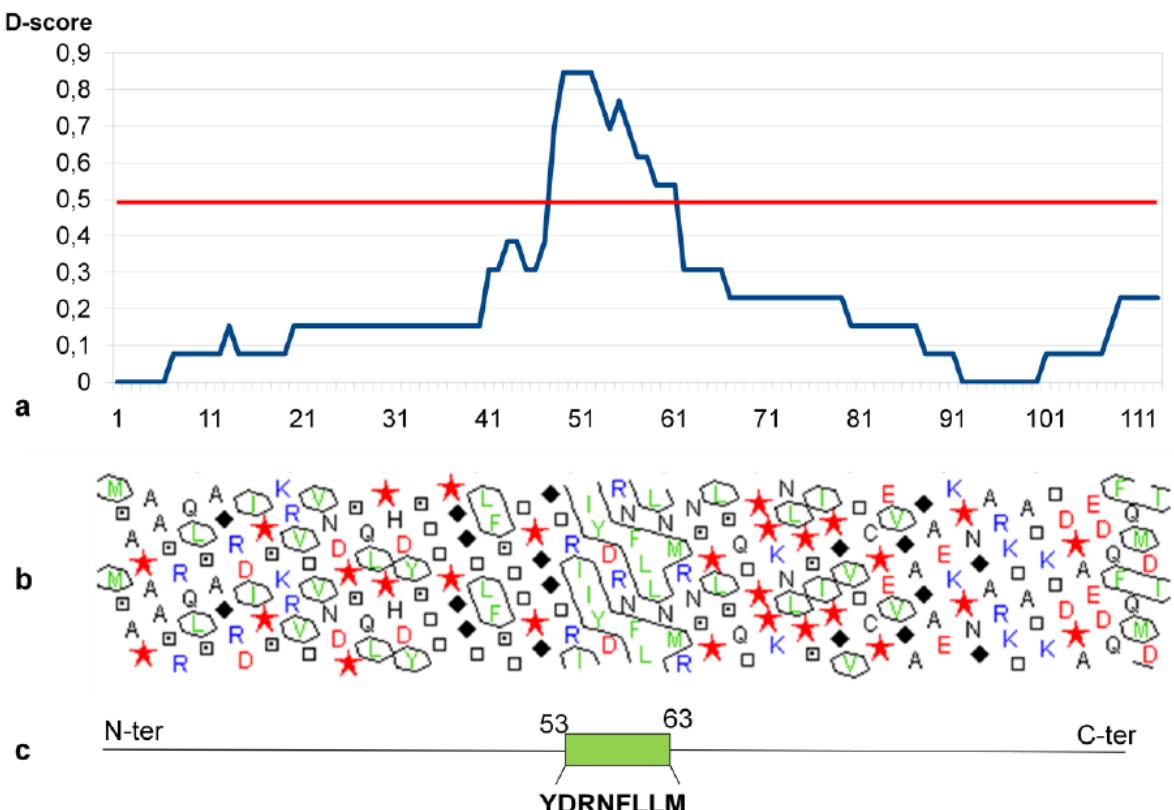


Supplementary Fig.1: Coomassie staining of 4E-BP, eIF4E and the complex eIF4E/4E-BP
 SDS denaturing polyacrylamide gel at 15%. Lanes were loaded with 1 μ l of each protein with a concentration of 7mg/ml, 1mg/ml and 1,8mg/ml respectively for (1), (2) and (3). 4E-BP(1) has been purified by Ni-sepharose column followed by a gel filtration. eIF4E(2) and the complex eIF4E/4E-B(3) have been purified by m⁷GTP pull-down followed by a gel filtration.



Supplementary Fig.2: Solution structure of eIF4E.

- Cristallographic structure of eIF4E1 where the 30 aminoacids on the N-ter are missing due to the fact that this disordered region is a problem for crystallization. The 30 amino acids of the Nter extremities have been added using the program TURBO, with which we created different orientations to simulate the flexibility of this region (blue circle).
- Low resolution model of eIF4E display in cyan blue obtained by SAXS, superimposed with the TURBO model created from eIF4E cristallographic structure.

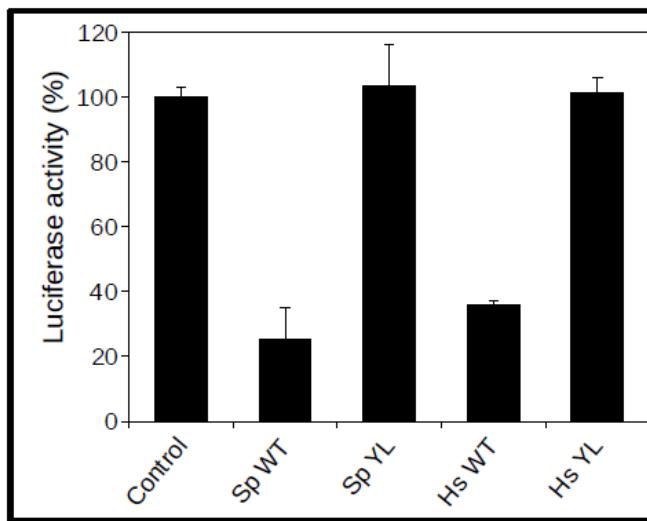


Supplementary Figure 3: Disorder predicted from the primary sequence of 4E-BP

a. Score for disorder (D-score) as a function of residue number. Consensus disordered regions are defined as regions with a D-score <0,50 (below the red line). The score has been calculated on the *Strongylocentrotus purpuratus* 4E-BP sequence as described in the supplementary methods.

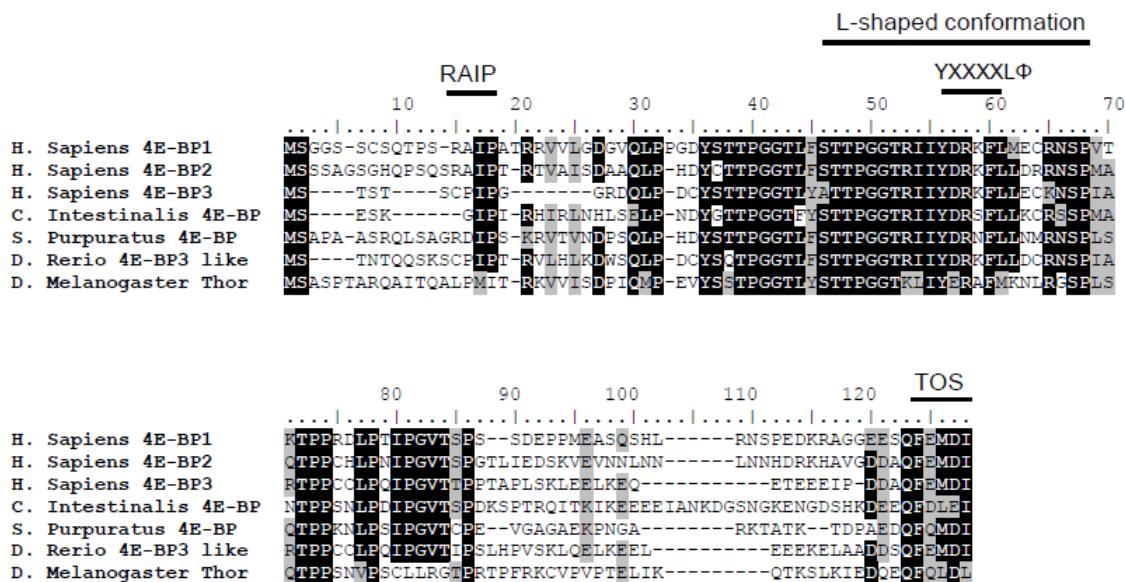
b. Hydrophobic Cluster Analysis of Sp 4E-BP sequence. The amino acid sequences are represented (in duplicate) along diagonals from upper left to lower right with the one-letter amino acid code except that black diamonds indicate glycine, squares indicate threonine, squares with central dots indicate serine, and stars indicate proline residues. Sets of adjacent hydrophobic residues in green are encompassed by contour lines.

c. Location of the disordered regions (black line) and the structured domain (green box) containing the eIF4E-binding motif YDRNFLLM in Sp 4E-BP sequence. Numbers above the box indicate the boundaries of the consensus disordered regions.



Supplementary fig. 4 : Sea urchin (Sp) 4E-BP and Human (Hs) 4E-BP1 repress translation in a mammalian system.

Recombinant 4E-BP proteins and capped / polyadenylated luciferase mRNA were produced as described previously (Oulhen, PlosOne, 2009). 5 fmol of reporter mRNA was incubated in rabbit reticulocyte lysate (Promega) with 200 ng of recombinant Sp 4E-BP, Hs 4E-BP1, or their variants -respectively Sp YL and Hs YL- that do not interact with eIF4E (Oulhen, PlosOne, 2009). Translation with the control protein (GST) was arbitrarily set to 100%. Error bars represent the standard deviation of triplicates.



Supplementary fig.5:Alignement of 4E-BP proteins

The three human 4E-BPs, Ciona intestinalis 4E-BP, Strongylcentrotus Purpuratus 4E-BP, Danio Rerio 4E-BP3 like, Drosophila melanogaster Thor were aligned with Bi Edit. Accession numbers of human proteins are: 4E-BP1 (NP_004086), 4E-BP2 (Q13542), 4E-BP3 (NP_003723) on NCBI. The Accession number is NP_001077103 for Strongylcentrotus Purpuratus (NCBI), NP_955977 for Danio Rerio (NCBI), NP_477295 for Drosophila melanogaster(NCBI), 299279 for Ciona intestinalis (<http://genome.jgi-psf.org/Cloin2/>). Identical and conserved amino acid residues are on black and grey background, respectively. The common eIF4E binding motif indicated by YxxxxLΦ (where x is any amino acid and Φ is an hydrophobic residue), the RAIP motif and the TOS (TOR signalling) site are denoted with a line above.

Les avantages du désordre face à l'évolution

Les 4E-BPs sont reconnues comme les régulateurs principaux de la fonction d'EIF4E et jouent un rôle crucial dans la cellule. Dans cet article, nous avons montré que 4E-BP subit un repliement induit par son interaction avec EIF4E.

Le repliement induit procure de nombreux avantages pour les interactions entre une protéine et son partenaire, ce qui explique la conservation des protéines intrinsèquement désordonnées au cours de l'évolution. Le premier avantage est **la grande plasticité** de la protéine, qui lui permet d'adapter sa morphologie à sa cible. Avec ses extrémités N et C-terminales, 4E-BP va pouvoir "embrasser" EIF4E par l'établissement de contacts dynamiques. À surface d'interaction égale, les interactions entre une protéine désordonnée et un partenaire ordonné impliquent souvent beaucoup plus de contacts à l'interface que pour deux protéines structurées (Meszaros et al., 2007). La fonction de reconnaissance d'une protéine va ainsi pouvoir être maintenue malgré des mutations possibles, ce qui rend ces interactions plus robustes au cours de l'évolution, par rapport à celles impliquant des protéines bien structurées. La flexibilité de 4E-BP lui permet de se structurer de manière spécifique après son association avec EIF4E mais aussi de se dissocier rapidement malgré l'association spécifique. Cette plasticité peut également se retrouver du côté du partenaire structuré, qui subit des réarrangements structuraux subtils afin de mieux s'adapter à ses multiples partenaires (Oldfield et al., 2008). En effet, la liaison entre EIF4E et 4E-BP induit une stabilisation d'EIF4E qui possède également une région désordonnée en N-terminal. Cette interaction le maintient dans une conformation favorisant sa liaison avec la coiffe (Siddiqui et al., 2012).

Les IDP (intrinsically disordered proteins) sont souvent qualifiées de **protéines chaperonnes** lorsqu'elles interagissent de manière transitoire avec leurs partenaires (Tompa and Csermely, 2004) (Tompa and Kovacs, 2010). Il a été suggéré par Carroll et collab. que 4E-BP puisse jouer le rôle de chaperon d'EIF4E, notamment parce que la co-expression d'EIF4E et de 4E-BP permet un niveau d'expression plus élevé d'EIF4E que lorsqu'EIF4E est surexprimé seul (Carroll et al., 2006). Dans ce modèle, 4E-BP stabilise EIF4E et assure son repliement tridimensionnel correct pour qu'il puisse se lier à la coiffe, comme le montre les études biophysiques de Siddiqui et al. (Siddiqui et al., 2012).

Le grand rayon de capture des protéines désordonnée, plus grand que celui des protéines structurées qui ont un espace conformationnel restreint, leur permet en outre de se lier plus vite à leur partenaire, selon un mécanisme appelé *fly-casting* (Shoemaker et al., 2000). La conformation de 4E-BP libre observée par SAXS et le R_g (Rayon de giration) de la molécule laissent imaginer que 4E-BP se lie faiblement dans un premier temps à une relative grande distance d'eIF4E. Il se rapproche ensuite d'eIF4E permettant ainsi l'interaction du motif YXXXXLΦ de 4E-BP avec la surface convexe d'eIF4E.

Cette grande plasticité confère en général aux protéines désordonnées la capacité de se lier à de **multiples partenaires** dans la cellule. Un des exemples les plus flagrants concerne la protéine P53. Cette dernière possède un domaine C-terminal très flexible qui va adopter des conformations différentes en fonction des partenaires de la protéine. Ce domaine se replie en hélice en présence de S100, en feuillet en présence de Sirtuine, ou encore en structure étendue irrégulière en présence de CBP ou de la cycline A2 (Oldfield et al., 2008). À l'heure actuelle, aucun autre partenaire de 4E-BP n'a été déterminé, mis à part la kinase Raptor qui permet sa phosphorylation. Pourtant, 4E-BP possède une structure très flexible qui laisse penser qu'il puisse s'adapter à toutes sortes de partenaires. Cette réflexion ouvre une question majeure qui ajoute un niveau de complexité en terme de régulation de la traduction : **existe-t-il d'autres partenaires de 4E-BP? Si non, quels sont les mécanismes qui empêchent ce dernier de se lier à d'autres protéines?**

Régulation et rôle physiologique

Parmi les modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter les protéines, la phosphorylation concerne le plus souvent des protéines ou des régions intrinsèquement désordonnées (Iakoucheva et al., 2004). C'est donc en toute logique qu'il a alors été découvert que la plupart des fonctions des protéines intrinsèquement désordonnées qui subissent un repliement induit concernent des processus cellulaires essentiels, tels que la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, ou encore la régulation de la traduction.

Malgré le désordre qui la caractérise, la protéine 4E-BP présente une séquence très conservée au cours de l'évolution (Gosselin et al., 2011), que ce soit au niveau du site de liaison à eIF4E, des sites de phosphorylation cibles de la voie mTOR mais aussi d'une grande partie de la séquence, suggérant que le désordre confère un avantage sélectif à la protéine. L'hypothèse évolutive la plus probable est qu'un 4E-BP ancestral soit apparu très tôt au niveau

des eucaryotes pour inhiber la traduction en réponse à des stress nutritifs ou environnementaux (Hernandez et al., 2010).

Les relations complexes associées à la phosphorylation, la dégradation et l'état stable de 4E-BP sont encore mal comprises. Plusieurs études ont notamment rapporté des données contradictoires concernant la dégradation et la stabilité du 4E-BP hyperphosphorylé versus le 4E-BP hypophosphorylé. Dans les oeufs d'oursin, la phosphorylation de 4E-BP déclenchée par la fécondation entraîne la dégradation de ce dernier (Cormier et al., 2001). Dans les cellules lymphocytaires, 4E-BP1 hyperphosphorylé est ubiquitiné et en partie dégradé par clivage (Elia et al., 2008). A l'inverse, 4E-BP1 de rat devient plus stable quand il est phosphorylé en réponse à l'insuline dans les adipocytes (Lin et al., 1995). Une toute dernière étude montre que dans des cellules où l'expression d'eIF4E est fortement réduite, 4E-BP1 hypophosphorylé est ubiquitiné et dégradé par le protéasome lorsqu'il n'est pas lié à eIF4E (Yanagiya et al., 2012).

On peut se demander si l'ubiquitination et la dégradation ne sont pas liées à l'état désordonné de 4E-BP, au moins dans les cellules humaines. En effet, lorsqu'il est en complexe avec eIF4E, 4E-BP hypophosphorylé se compacte et forme des contacts dynamiques avec eIF4E, perdant ainsi son côté très flexible et désordonné (Gosselin et al., 2011). Cette stabilisation de 4E-BP pourrait empêcher son ubiquitination, au-delà du fait que l'association eIF4E/4E-BP limite l'accessibilité à 4E-BP. De plus, la phosphorylation de la sérine 65, qui ne peut se faire que lorsque les autres sites sont phosphorylés (Gingras et al., 2001a; Ayuso et al., 2010), augmente la rigidité de 4E-BP1 (Tait et al., 2010). Le 4E-BP hyperphosphorylé présente donc une structure plus rigide, ce qui le protégerait de la dégradation alors même qu'il n'est plus associé à eIF4E.

Ces observations impliquent qu'il existe au moins deux niveaux de régulation en ce qui concerne l'association eIF4E/4E-BP : la phosphorylation va permettre la régulation fine de la formation du complexe en modulant l'affinité de 4E-BP pour eIF4E. Elle crée potentiellement des répulsions électrostatiques, mais surtout perturbe la transition désordre/ordre de 4E-BP par la phosphorylation de la ser65 (Tait et al., 2010). Ceci est en accord avec le modèle de Youtani et al. qui propose que seule la phosphorylation du 4E-BP *libre* aura un effet sur l'association de 4E-BP avec eIF4E (Youtani et al., 2000). Cette régulation interviendrait

majoritairement lors de phase de croissance, de prolifération cellulaire ou de stimulations extérieures, de stress métabolique, activant la voie mTOR.

En revanche, les conditions dans lesquelles le second niveau de régulation par la dégradation de 4E-BP se met en place sont moins claires et semblent plutôt intervenir dans le cadre de la régulation de l'homéostasie traductionnelle. Dans certains cancers, l'augmentation d'eIF4E est souvent corrélée avec une augmentation de 4E-BP1 (Kremer et al., 2006; Braunstein et al., 2007). À l'inverse, lorsque des cellules expriment très faiblement eIF4E, 4E-BP1 hypophosphorylé et instable est dégradé (Yanagiya et al., 2012). Le niveau d'expression d'eIF4E contrôle donc le niveau d'expression de 4E-BP1 de manière à maintenir l'homéostasie traductionnelle dans la cellule. La question qui se pose alors est : est-ce que le niveau d'eIF4E peut varier physiologiquement, en dehors de conditions dérégulées comme dans les cancers? Et donc, est-ce que la dégradation du 4E-BP hypophosphorylé est un mécanisme physiologique dans les cellules humaines?

Dans certaines situations physiologiques, comme la fécondation chez l'oursin, les mécanismes mis en œuvre pour réguler le niveau d'expression de 4E-BP corrélatent de manière positive dégradation et phosphorylation de 4E-BP, suggérant que ces mécanismes sont différents chez certaines espèces et ont pu évoluer au cours de l'évolution. Ces observations ouvrent de nombreuses perspectives pour l'étude et la compréhension des régulations traductionnelles s'exerçant sur 4E-BP.

B. Étude de la relation structure/fonction des trois formes d'eIF4E

Dans l'introduction, nous avons abordé les différences fonctionnelles entre les trois formes d'eIF4E, qui résident principalement dans leur capacité divergente à interagir avec leurs partenaires eIF4G et 4E-BP. À l'heure actuelle, les propriétés à l'origine de cette différence ne sont pas déterminées. Nos résultats précédents ayant démontré que la surface d'interaction entre eIF4E et 4E-BP ne se limitait pas seulement à la surface convexe dorsale d'eIF4E, nous nous sommes concentrés sur l'étude structurale des trois formes d'eIF4E cherchant à mettre en évidence des différences de structure pouvant être à l'origine des différences d'affinités des trois classes d'eIF4E pour leurs ligands.

Introduction

Il existe 3 classes d'eIF4E très conservées au cours de l'évolution (Joshi et al., 2004). Ces trois classes diffèrent par leur distribution au sein des espèces, par leur profil d'expression au sein d'un même organisme et par leur capacité à interagir avec leurs partenaires 4E-BP et eIF4G (Table 1). De plus, seul eIF4E1 est capable de restaurer le phénotype létal d'un mutant d'eIF4E1 chez la levure (Joshi et al., 2004).

Alors que le rôle d'eIF4E1 est de mieux en mieux caractérisé, les rôles d'eIF4E2 et eIF4E3 sont encore mal compris. L'apparition et la conservation de ces nouvelles formes d'eIF4E au cours de l'évolution laissent penser que les 3 formes d'eIF4E jouent chacune un rôle spécifique dans la régulation de la traduction des ARNm. Alors que les propriétés d'association des eIF4E avec eIF4G et/ou le répresseur traductionnel 4E-BP ont été établies chez les mammifères (Joshi et al., 2004), aucune autre donnée n'est disponible quant à la capacité des différents eIF4E à interagir avec 4E-BP et eIF4G dans d'autres organismes. Il est donc crucial de déterminer si ces propriétés d'association sont conservées au cours de l'évolution, pour comprendre le rôle ancestral des différentes formes d'eIF4E dans le contrôle de la régulation traductionnelle.

Depuis la fin des années 1990, le développement précoce de l'embryon d'oursin s'est révélé être un modèle puissant pour l'étude des régulations traductionnelles (Nasmyth, 2001),(Hunt, 2002). Le décryptage du génome de l'oursin (Morales et al., 2006) a permis de mettre en évidence l'existence de la machinerie complète de traduction, notamment celle des 3 formes d'eIF4E : eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3. La situation évolutive de l'oursin à la base des deutérostomes et le fait que son génome n'ait pas subi de duplication en font un modèle de

choix pour l'étude des propriétés des différentes formes d'elf4E, et de leurs rôles potentiels au niveau du développement embryonnaire. En effet, le génome de l'oursin ne possède que trois gènes codant respectivement pour chacune des formes d'elf4E, un seul gène codant pour 4E-BP et un autre pour elf4G (Morales et al., 2006).

Notre objectif a été de mettre au point des outils pour évaluer les niveaux d'expressions des différents elf4E chez l'oursin au cours du développement embryonnaire, mais également de tester les propriétés d'association de chaque elf4E avec elf4G et 4E-BP. Des anticorps spécifiques de chaque forme d'elf4E oursin ont été fabriqués chez le lapin puis testés sur différents extraits cellulaires d'oursin. Malheureusement, aucun des anticorps produits n'a semblé reconnaître spécifiquement un des elf4E endogènes. Le clonage des 3 formes d'elf4E d'oursin a permis la production de protéines recombinantes en bactéries. Ces trois protéines recombinantes interagissent avec la coiffe de manière similaire entre les trois elf4E. Les tests d'interaction *in vitro* ont permis de déterminer qu'elf4E3 interagit avec elf4G mais pas avec 4E-BP. Désireux de comprendre quelles sont les propriétés structurales qui pourraient régir les différences d'association entre les trois formes d'elf4E, nous avons produit et cristallisé la protéine elf4E3 d'oursin afin d'obtenir sa structure cristallographique. En effet, si les structures cristallographiques d'elf4E1 (Marcotrigiano et al., 1997) et d'elf4E2 (Rosettani et al., 2007) sont disponibles, la structure d'elf4E3 n'a encore jamais été établie. Les elf4E ont une séquence et une structure très conservée au cours de l'évolution : elf4E1, elf4E2, et elf4E3 d'oursin partagent respectivement 61%, 67% et 55% d'identité avec leurs homologues murins (Morales et al., 2006). La caractérisation structurale d'elf4E3 a pour but de mettre en évidence les éléments de séquence responsables des différences d'affinité des elf4E pour 4E-BP et elf4G, en comparant avec les structures des elf4E1 et elf4E2 déjà disponibles. Après avoir obtenu des résultats de diffraction préliminaires, les conditions de production d'elf4E3 ont été révisées et la production de nouveaux cristaux est toujours en cours.

Matériels et méthodes:

Constructions— Les séquences d'oursin de GST-4EBP, GST-elf4G correspondant à un fragment d'elf4G contenant le motif d'interaction à elf4E ont été clonées précédemment par le laboratoire dans le plasmide pGEX-4T. Les séquences His elf4E1, 2, 3 d'oursin ont été clonées dans le plasmide pET32(a) (tag His-Trx (thioredoxine)) par digestion BamH1-EcoR1 de constructions elf4E-pFO4 déjà réalisées dans le laboratoire.

Anticorps spécifiques anti-eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3 d'oursin— La production d'anticorps spécifiques a été assurée par Thermo Fischer. Les peptides utilisés pour immuniser les lapins ont été choisis pour être spécifiques de chaque forme d'eIF4E : HEDIVKDGKGKD (pour eIF4E1), EYKTHTDSLKDRSSFR (pour eIF4E2) et YKPHHQHDSFEKNRP (pour eIF4E3). La purification des anticorps à partir des sérumms immuns de lapin a été effectuée par Virginie Glippa et Bertrand Cosson.

Protéines GST—Les protéines GST recombinantes sont produites dans des bactéries BL21 à 37°C dans du milieu 2YT (Pour 1L : 16g de tryptone, 10g de yeast extract, 5g de NaCl, pH7) avec 50µg/ml d'ampicilline jusqu'à ce que la DO à 600nm atteigne 0,5. Ces bactéries sont alors induites avec 1mM IPTG pendant 4h à 37°C. Pour 100ml de culture, le culot est resuspendu dans 5ml de PBS (Sigma) contenant des antiprotéases (10µg/ml de leupeptine et aprotinine, P8849 au 1/100 (Sigma)) pour 100ml de culture, puis les cellules sont lysées à la presse de French (amplitude 1,6). 1% de Triton (Sigma) est ensuite ajouté avant d'incuber le lysat sur roue 30 min à 4°C et le centrifuger à 10000rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et incubé avec 50µl de billes tassées Glutathion sépharose (GE healthcare) pendant 2h à 4°C. Les billes ont été préalablement lavées deux fois avec du PBS (centrifugation à 1000 rpm). Après 2h00, une centrifugation de 5 min à 1000rpm à 4°C est effectuée. Les billes sont lavées 3 fois avec 1 ml de PBS. 50µl de tampon d'élution (50mM Tris HCl, 10mM glutathione réduite, pH8) sont ajoutés avant d'incuber le tout à 4°C pendant 10 min sur roue puis centrifuger ensuite 5 min à 1000 rpm pour récupérer le surnageant. Ces étapes d'élution sont répétées 3 fois. 7µl du surnageant à l'étape de lyse des bactéries, après centrifugation et après incubation sur billes sont prélevés auxquels sont ajoutés 2µl du Laemmli 5X. 4µl de chaque élution sont mixés avec 6µl du Laemmli 1X (Laemmli) puis les échantillons sont déposés en SDS PAGE coloré au bleu de Comassie R.

Protéines His— Pour 100ml de culture de bactéries induites, le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon IMAC (50mM Hepes, 500mM NaCL, 10% glycérol) contenant des antiprotéases (10µg/ml de leupeptine et aprotinine, P8849 au 1/100). Les cellules sont lysées avec la presse de French (amplitude 1,6). 1% de Triton (Sigma) est ajouté avant d'incuber sur roue 30 min à 4°C. Le lysat est alors centrifugé à 10000rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et incubé avec 50µl de résine Nickel (Qiagen), préalablement lavée dans le tampon IMAC, pendant 2h à 4°C sur roue. 2 lavages sont effectués avec du tampon IMAC contenant 5mM d'imidazole et un dernier lavage avec du tampon IMAC contenant 20mM d'imidazole. Trois élutions successives dans 50µl de tampon IMAC contenant 250 mM d'imidazole sont effectuées. 7µl du surnageant à l'étape de lyse des bactéries, après centrifugation et après incubation sur billes sont prélevés auxquels sont ajoutés 2µl du Laemmli 5X. 4µl de chaque élution sont mixés avec 6µl du Laemmli 1X (Laemmli) puis les échantillons sont déposés en SDS PAGE coloré au bleu de Comassie R.

GST pull down—Après production et purification, un microgramme de GST, GST-eIF4G, GST-4E-BP est incubé pendant 1h30 avec 20µl de billes Glutathion sépharose dans 400µl de PBS. Après deux lavages au PBS et un lavage avec du tampon CAP contenant 0,5% d'igepal et 1mg/ml de BSA, les billes sont incubées à 4°C pendant 2h00 avec 400µl de Tampon CAP, 0,5% igepal, 1mg/ml de BSA et de l'extrait bactérien contenant His-eIF4E1, His-eIF4E2 ou His-eIF4E3 d'oursin de façon à ajouter un microgramme de la protéine recombinante. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon CAP et bouillies dans 20µl du Laemmli 1X. 15µl est déposé sur gel SDS-PAGE pour chaque interaction pour analyser en Western Blot.

m7GTP pull down—Pour les interactions eIF4E avec la coiffe, 1µg de eIF4E1, eIF4E2, et eIF4E3 contenu dans de l'extrait bactérien avec ou sans 1µg de protéines GST/GST-4EBP/GST-eIF4G sont incubés avec 30µl de billes m7GTP dans 400µl de tampon CAP pendant 2h00 à 4°C. Après lavage des billes, celles-ci sont resuspendues dans 30µl du Laemmli 1X et 15µl est déposé sur gel SDS-PAGE pour être analysé en western Blot.

Western Blot— Les protéines sont déposées un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Elles sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose 0.22-µm par transfert semi-sec. Les protéines de fusion GST sont révélées en utilisant un anticorps polyclonal anti-GST (Santa Cruz) au 1/2000ème. Les protéines de fusion HIS sont révélées en utilisant un anticorps polyclonal anti-HIS (Novagen) au 1/1000ème. Les anticorps spécifiques d'eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 purifiés sont incubés au 1/500ème. Les anticorps sont dilués dans une solution de tris-HCL (pH7.6), 1% BSA, 0.1% Tween 20). Les membranes sont incubées 2h à température ambiante avec l'anti-GST et l'anti-His, et sur la nuit à 4°C avec les anticorps spécifiques des 3 eIF4E. Pour révéler le complexe antigène-anticorps par chimioluminescence, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris (Dako). La membrane est révélée à l'ECL+ en suivant les instructions du fabricant (Amersham) sur un Typhoon trio GE Healthcare.

SAXS—Les expériences de SAXS et l'utilisation du logiciel pymol ont été détaillées dans Gosselin et al., 2011.

Cristallisation—(mise au point par Justyna Rzonca) Les premiers tests de cristallisation ont été menés à 292K à l'aide d'une méthode de diffusion de vapeur en mode goutte-assise (sitting drop) dans une plaque 96 puits (Corning). Le test de cristallisation a été réalisé avec le test au sulphate d'ammonium de chez Qiagen, dans une plaque 96 puits (Corning no. 3551, one well sitting drop). Un robot (Honeybee961) a été utilisé pour pipeter les gouttes contenant 300nl de protéines en solution (~ 6.5 mg.ml⁻¹ dans le tampon C (50mM Taps pH 8.5, 100 mM Trisodium citrate)) mixés avec 150 nl de la solution réservoir. Après une identification visuelle de la meilleure condition initiale de cristallisation, celle-ci a été optimisée dans une plaque Lindro 24 puits avec la technique de diffusion de vapeur en mode goutte-suspendue (hanging drop). Les gouttes ont été préparées sur des lamelles siliconées en mélangeant 2µl de protéine en solution avec 1µl de la solution du puit, et l'équilibration a été réalisée avec 200µl de la solution réservoir à température ambiante (19°C). La solution réservoir utilisée correspond à 1,7M de Sulphate d'ammonium et 0,1M Bicine pH 8.0.

clonage eIF4E3ΔNTer— Le clonage d'eIF4E3 d'oursin tronqué en N-ter a été réalisé à partir du plasmide eIF4E3-pFO4. Le fragment eIF4E3ΔNTer a été amplifié par PCR, en utilisant une amorce 4E3Nter30 : CGC-GGA-TCC-GCA-CAG-GAG-GAG-GTG-TTC-CCA-CTC-AAC et 4E3R : TTA-AAG-CTG-CTT-CGC-AAA-TGC-ATC-TAT-CAG-TCT-AG. Après une double digestion BamH1/EcoR1, le fragment eIF4E3ΔNTer est ligué dans un plasmide pFO4 digéré de la même manière par BamH1/EcoR1.

Résultats

Expression des différentes formes d'eIF4E au cours du développement embryonnaire de l'oursin

La base *Strongylocentrotus Purpuratus* (<http://spbase.org>)(Cameron et al., 2009) permet d'avoir accès aux séquences du génome de l'oursin *S. purpuratus* et à des données d'expression établies par microarray. Dans cette étude de microarray, cinq sondes spécifiques ont été choisies par gène afin d'établir la quantité de transcrits présents à un temps donné au cours des premières 72 heures du développement de l'embryon d'oursin. Le profil d'expression de chaque gène est ensuite établi en combinant l'ensemble des signaux provenant de chaque sonde (chaque signal est normalisé pour les variations intra et inter-array). L'abondance relative d'un ARNm à différents stades de développement peut être étudiée. En revanche, la comparaison de l'abondance de différents ARNm ne peut être établie en raison des différences entre les ensembles de sondes pour chaque ARNm .

J'ai recherché l'expression des gènes eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3 dans la base de données Sp base. Les trois eIF4E sont présents sous la forme de transcrits au cours des 72h après fécondation (Figure 20). eIF4E1 est exprimé assez faiblement jusque 15 heures après fécondation. Au delà, la quantité de transcrits d'eIF4E1 présents dans l'embryon va augmenter jusqu'à devenir 4,5 fois plus importante au stade 72 heures (stade pluteus) (Figure 20.a). La quantité de transcrits codant pour eIF4E2 va doubler 30h après fécondation (stade gastrula précoce) puis revient à son niveau d'expression initiale dès le stade 48 heures (Figure 20.b). eIF4E3, en revanche, est exprimé à son plus fort niveau dès la fécondation et voit son nombre de transcrits diminuer de moitié à partir de 48 heures post-fécondation (Figure 20.c). L'expression des gènes eIF4E1, eIF4E2 et eIFE3, en terme de transcrits présents à un moment donné du développement, ne va pas être la même suivant la forme d'eIF4E observée. Il est donc possible qu'au cours du développement embryonnaire de l'oursin, les trois eIF4E jouent des rôles différents dans les mécanismes de régulation traductionnelle.

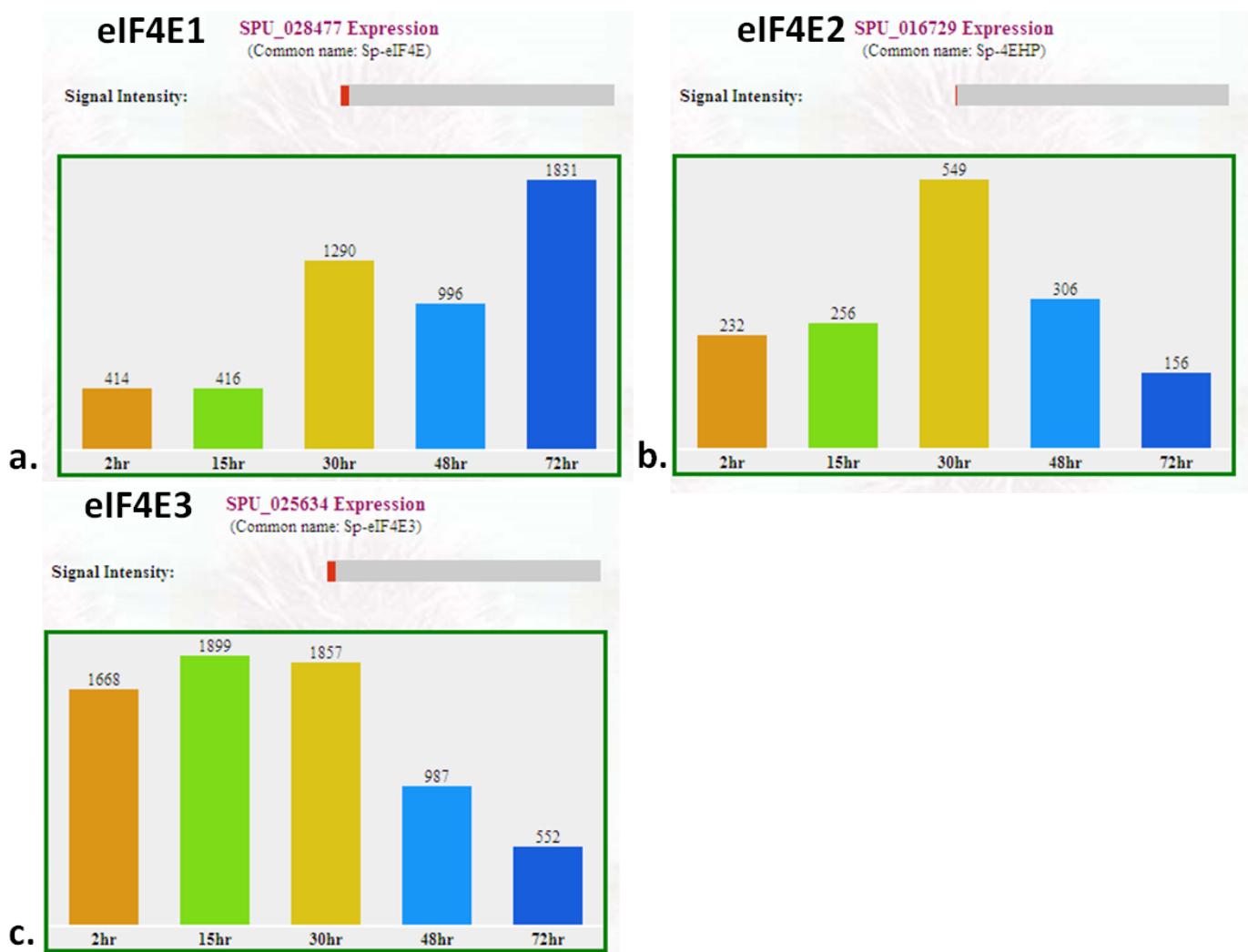


Figure 20 : niveau d'expression des transcrits codant pour les différents eIF4E évalué par microarray (Sp Base).

Profil d'expression des gènes établi par microarray représenté par l'intensité du signal en fonction du temps. Le temps après fécondation est indiqué en heures sous les histogrammes et l'intensité du signal à chaque stade est indiquée par des valeurs numériques au-dessus de chaque barre.(a) profil d'expression d'eIF4E1 (eIF4E).(b) profil d'expression d'eIF4E2 (4E-HP).(c)profil d'expression d'eIF4E3. (<http://spbase.org>)

Le taux d'expression d'un gène n'est pas seulement contrôlé par le niveau de transcription et de dégradation de son ARNm, mais également par la capacité de cet ARNm à être traduit. Les trois formes d'eIF4E étant présentes sous la forme de transcrits exprimés de manière différentielle au cours du développement de l'embryon d'oursin, il nous a semblé intéressant

de regarder le profil d'expression des protéines eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 au cours du développement embryonnaire et de suivre l'expression de chaque eIF4E au cours des premières heures après fécondation. Trois anticorps spécifiques des trois formes d'eIF4E ont été fabriqués à partir de peptides synthétiques spécifiques (voir matériels et méthodes). Aucun des anticorps purifiés n'a semblé reconnaître spécifiquement un des eIF4E dans un extrait d'oursin (résultats non montrés). Le taux d'expression des gènes eIF4E1, eIF4E2, et eIF4E3 en terme de production de protéine au cours du développement embryonnaire de l'oursin n'a donc pas pu être évalué à ce jour.

Affinités des eIF4E pour la coiffe et leurs partenaires eIF4G et 4E-BP

Pour évaluer les propriétés d'interactions des trois eIF4E avec la coiffe et avec leurs partenaires, les trois séquences d'eIF4E oursin ont d'abord été clonées dans un plasmide pFO4, permettant de produire les protéines avec un tag histidine (His) en N-terminal, composé de six répétitions His. Seule la protéine eIF4E3 a pu être purifiée, les deux autres se retrouvant sous des formes insolubles dans les corps d'inclusions.

Les trois gènes ont ensuite été reclonés dans un plasmide pET 32(a), qui permet la production de protéines taguées avec une répétition histidine et une thioredoxine (Trx). Cette petite protéine de 12 kDa aide en général à une meilleure solubilisation des protéines recombinantes. Les protéines sont ensuite surexprimées dans des bactéries Rosetta et purifiées sur colonne de Nickel (figure 21.a). Après quantification, 1µg de chaque protéine est incubé avec des billes m⁷GTP pour évaluer la capacité de ces protéines recombinantes à interagir avec la coiffe (Figure 21.b). Les trois formes d'eIF4E interagissent avec la coiffe de manière similaire. La spécificité d'interaction avec le m⁷GTP par plusieurs lavages contenant du GTP non méthylé n'a pas été testée.

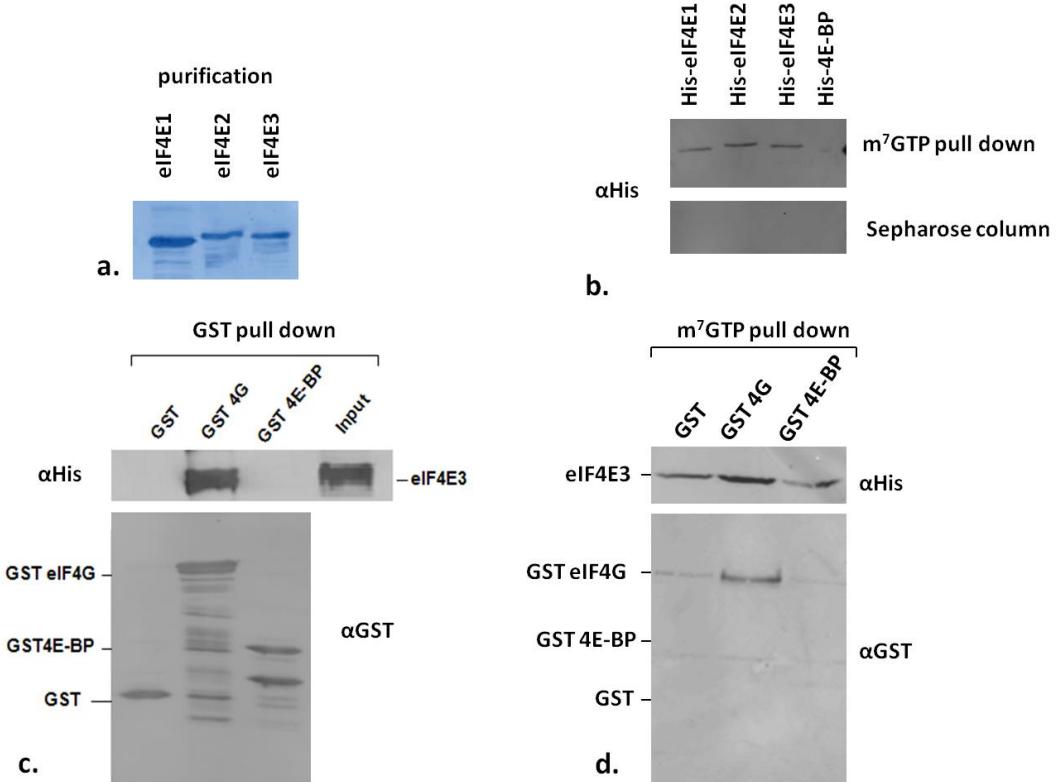


Figure 21 : Caractérisation des propriétés d'association des 3 eIF4E avec leurs partenaires

a. *Purification des protéines recombinantes taguées His-Trx.* 5 μ l de chaque protéine sont déposés sur gel d'électrophorèse, coloré ensuite en bleu de coomassie. Les quantités relatives des protéines sont estimées par quantification avec ImageQuant. b. *Interaction avec la coiffe des protéines eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3.* 1 μ g de chaque protéine est incubé avec des billes m⁷GTP-sepharose ou des billes sepharose. 1 μ g de protéine His-4E-BP est utilisé comme contrôle négatif. Après plusieurs lavages, la présence des protéines sur les billes est analysée par western Blot. (c.d). eIF4E3 interagit avec eIF4G mais pas avec 4E-BP. c. Les protéines GST, GST-4E-BP et GST-eIF4G sont fixées sur des billes glutathion sépharose et des extraits bactériens (Input) contenant la protéine eIF4E3 d'oursin surexprimée sont ajoutés sur chaque colonne. Les interactions sont analysées par western blot avec un anticorps anti His pour marquer eIF4E3 fusionnée à l'histidine et la thioredoxine et un anti GST pour révéler les protéines fusionnées à la GST. d. m⁷GTP pull down sur des extraits bactériens surexprimant eIF4E3 dans lequel on a ajouté 1 μ g de GST, GST-eIF4G, GST-4E-BP.

L'affinité des différentes formes d'eIF4E pour leurs partenaires eIF4G et 4E-BP a ensuite été testée par m⁷GTP pull down et par GST pull down (Figure 21c). Alors que les protéines recombinantes eIF4E1 et eIF4E2 ne semblent pouvoir interagir spécifiquement ni avec eIF4G ni avec 4E-BP (résultats non montrés), la protéine recombinante eIF4E3 est capable d'interagir avec un fragment d'eIF4G contenant le site d'interaction à eIF4E mais pas avec la protéine 4E-BP. Ces résultats sont en accord avec ce qu'il a été montré pour eIF4E3 souris

(Joshi et al., 2004). Une mauvaise conformation des protéines recombinantes eIF4E1 et eIF4E2 pourrait expliquer le fait que celles-ci sont incapables de lier leurs partenaires, bien qu'elles soient capables de fixer la coiffe.

Structure d'eIF4E3

eIF4E3 semble avoir conservé au cours de l'évolution ses propriétés d'association avec eIF4G et 4E-BP. La caractérisation structurale des formes d'eIF4E seules et en complexe avec 4E-BP ou eIF4G est nécessaire pour établir les différences structurales à l'origine de leurs propriétés d'association. Alors que la comparaison des structures d'eIF4E1 et d'eIF4E2 a déjà été effectuée (Rosettani et al., 2007), la structure cristallographique d'eIF4E3 n'a pour le moment jamais été étudiée.

Dans cette étude, nous avons produit et purifié la protéine His-eIF4E3sp. Une première analyse de la structure globale de la protéine a été réalisée en SAXS (small Angles X-Ray Scattering) (Figure 22a). À l'aide du logiciel Pymol, les enveloppes d'eIF4E3 et d'eIF4E1 souris ont été superposées, montrant que la conformation d'eIF4E3 d'oursin en solution était quasiment identique à celle d'eIF4E1 murin (Figure 22b). Ces premiers résultats démontrent que seules des méthodes structurales plus résolutives, comme la cristallographie, peuvent permettre de détecter des différences structurales plus fines entre les formes d'eIF4E.

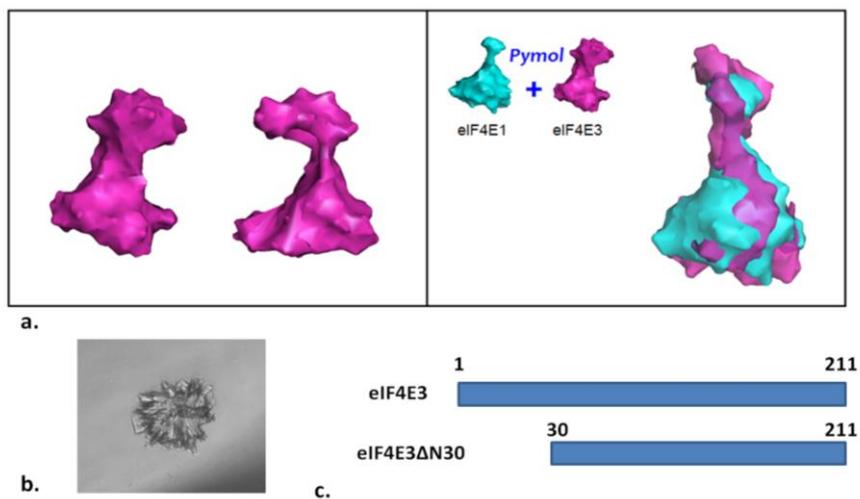


Figure 22 : Caractérisation de la structure d'eIF4E3

a. A gauche, enveloppe en 3D d'eIF4E3 d'oursin obtenue en SAXS. A droite, superposition avec Pymol de l'enveloppe d'eIF4E3 d'oursin (rose) avec l'enveloppe d'eIF4E1 souris (bleu fluo). b. Premiers cristaux obtenus avec la forme plein longueur d'eIF4E3. c. Constructions utilisées pour la production de la protéine recombinante eIF4E3.

La cristallisation d'eIF4E3 a été réalisée selon la technique de diffusion de vapeur en mode goutte-suspendue. Les premiers cristaux obtenus (Figure 22b) ont été analysés au synchrotron de Grenoble (European Synchrotron Radiation Facility) et ont montré un faible pouvoir diffractant, ne permettant pas d'obtenir la structure cristallographique de la protéine. La plupart des structures d'eIF4E disponibles ayant été obtenues sur des formes d'eIF4E tronquées de 30 acides aminés en N-terminal, du fait de leur forte flexibilité qui peut déstabiliser la structure du cristal, la forme d'eIF4E3 tronquée en N-terminal de 30 acides aminés a été clonée (Figure 22c). La production de ce nouveau mutant s'est révélée plus difficile que celle de sa forme pleine longueur. Les mises au point de la production sont encore en cours. Le clonage d'une nouvelle forme tronquée avec un nombre plus réduit d'acides aminés déletés en N-terminal sera peut être nécessaire, puisque la partie N-Terminale semble jouer un rôle important dans la solubilisation de la protéine.

Discussion

La découverte des différentes classes d'eIF4E (Joshi et al., 2004) et des nombreux isoformes de chaque classe, pouvant être exprimées dans une même espèce (exemple : *C. Elegans*), a révolutionné la vision du rôle d'eIF4E dans le contrôle de la traduction. En effet, il n'est plus possible de prédire la fonction à partir de la séquence primaire d'un membre de la famille des eIF4E, puisqu'il existe un niveau de diversité fonctionnel très important entre les différents membres de la famille (revue (Hernandez and Vazquez-Pianzola, 2005)). Les eIF4E peuvent cependant être regroupées en trois classes, qui présentent des propriétés particulières d'association avec eIF4G et 4E-BP au moins chez les mammifères (Joshi et al., 2004). L'expression spécifique de tissus (Joshi et al., 2004) et de stades de développement (Cho et al., 2006) des différents eIF4E implique que chaque classe d'eIF4E joue un rôle particulier dans la régulation traductionnelle, et potentiellement au cours du développement.

L'étude de l'expression des gènes eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 par microarray au cours du développement embryonnaire de l'oursin montre que les 3 transcrits sont présents et exprimés de manière différentielle selon les stades de développement. La différence d'expression des transcrits suggère qu'il existe une fonction particulière pour chaque forme d'eIF4E au cours du développement. La mise au point de nouveaux anticorps spécifiques sera cruciale pour répondre à cette question, mais également pour identifier le rôle de chaque eIF4E dans la

régulation de la traduction, en évaluant par exemple leur niveau de recrutement dans les polysomes, ou encore les partenaires avec lesquels ils forment des complexes.

Dans le but de vérifier si les propriétés d'association des différents eIF4E avec eIF4G et 4E-BP sont conservées au cours de l'évolution, nous avons testé ces interactions avec des protéines de *S.purpuratus* et montré qu'eIF4E3 est capable d'interagir avec eIF4G et la coiffe, mais pas avec 4E-BP. Cette particularité étant observée chez deux espèces relativement distantes, l'oursin et la souris, cela suggère que ces propriétés d'association sont apparues très tôt dans l'évolution des deutérostomes et ont été conservées. Les protéines recombinantes eIF4E1 et eIF4E2 ne nous ont pas permis de conclure sur leurs propriétés d'interaction avec eIF4G et 4E-BP. Cependant, une autre étude a démontré que chez la drosophile, eIF4E2 n'interagit pas avec eIF4G (Cho et al., 2006). Cette observation est en accord avec ce qui a pu être montré avec eIF4E2 humain et murin (Rom et al., 1998; Joshi et al., 2004). Les mêmes propriétés d'association des différents eIF4E avec leur partenaires sont donc retrouvées dans des espèces relativement éloignées au niveau phylogénétique. Pour cette raison, ces caractéristiques semblent être spécifiques de chaque classe d'eIF4E et semblent conservées au cours de l'évolution.

L'interaction entre eIF4E et ses partenaires est souvent visualisée comme une interaction clé/serrure, où la serrure correspond à la surface convexe dorsale d'eIF4E. Le fait que les trois classes d'eIF4E présentent des propriétés d'association différentes implique qu'il existe en réalité plusieurs types de serrures caractéristiques de chaque classe d'eIF4E. A la suite de Gosselin et al. (2011), nous avons cependant discuté le fait que d'autres régions au niveau des partenaires sont également importantes pour l'interaction avec eIF4E. Les "serrures" de chaque eIF4E déterminent les interactions avec 4E-BP, qui joue le rôle de répresseur traductionnel, et/ou avec eIF4G qui permet l'initiation de la traduction, et donc confèrent la fonction de chaque eIF4E. Sous cet angle, eIF4E2 joue le rôle d'inhibiteur compétitif d'eIF4E1, puisqu'il lie la coiffe et seulement 4E-BP, alors qu'eIF4E3 semble être un activateur traductionnel, puisqu'il ne peut être régulé par 4E-BP. De par leur expression différentielle de tissu ou de stade de développement, l'apparition des différents eIF4E a permis d'augmenter la finesse et la complexité du niveau de régulation traductionnelle.

Les trois formes d'eIF4E présentent une structure globale très conservée, montrant que seules des variations fines de la structure peuvent être à la base de la relation structure/fonction de chaque eIF4E. La comparaison des structures d'eIF4E1 et d'eIF4E2 a permis de mettre en

évidence que la fonction d'EIF4E2 diffère de celle d'EIF4E1 du fait que le site d'EIF4E liant la coiffe adopte une conformation différente. Cette comparaison indique également que les acides aminés impliqués dans l'interaction avec 4E-BP ou EIF4G sont différents (Rosettani et al., 2007) (détailé dans l'introduction I.C.1.2). Cependant, ces différences dans le site de liaison de la surface convexe dorsale d'EIF4E ne suffisent pas à expliquer les différences de partenaires. La caractérisation de la serrure, c'est à dire du site au niveau de la surface dorsale convexe d'EIF4E sur lequel va se lier le motif YXXXXLΦ, n'est donc à elle seule pas suffisante. Ces observations concordent avec le fait que d'autres régions d'EIF4E vont jouer un rôle dans l'interaction avec 4E-BP ou EIF4G (Gosselin et al., 2011; Umenaga et al., 2011; Paku et al., 2012). Il est donc crucial d'aborder la structure des EIF4E dans son ensemble. L'obtention de la structure cristallographique d'EIF4E3 reste un point essentiel pour déterminer les éléments structuraux à l'origine de la fonction des EIF4E. Après plusieurs mis au point de production et de cristallisation, de nouveaux cristaux sont en cours de production. La détermination du lien structure/fonction des EIF4E apportera des données importantes, à la fois pour déterminer le rôle de chaque EIF4E dans la cellule, mais également pour le développement de traitements thérapeutiques contre le cancer qui cherchent à modifier l'interaction EIF4E/EIF4G mais pas EIF4E/4E-BP.

Chapitre II : Identification et caractérisation d'une nouvelle 4E-IP : Angel1

A. A la recherche de nouvelles 4E-IPs : découverte de la protéine Angel1 comme nouveau partenaire d'eIF4E

Dans cette troisième partie seront présentés les résultats qui ont permis la découverte et la caractérisation d'un nouveau partenaire d'eIF4E : Angel1. Dans un premier temps, je présenterai le criblage mis au point pour découvrir de nouvelles 4E-IPs et la validation d'Angel1 comme nouveau partenaire d'eIF4E qui font l'objet d'un article (Gosselin et al., en préparation). Dans un deuxième temps, j'introduirai quelques caractéristiques de la famille CCR4 à laquelle Angel1 appartient et je présenterai les données préliminaires sur la caractérisation fonctionnelle de ce nouvel acteur. Je terminerai par une discussion sur le rôle potentiel d'Angel1 et sur les perspectives que ce nouvel acteur apporte en terme de compréhension de la régulation d'eIF4E.

Article 2 : Gosselin P., Martineau Y., Morales J., Czjzek M., Gauffeny I., Morin E., Le Corguillé G., Pyronnet S., Cormier P., Cosson B.(2012). "Tracking a redefined eIF4E-binding motif reveals a new eIF4E-interacting partner : the orphan protein Angel1, member of the CCR4 family." (en préparation)

Ce travail a pour objectif de trouver de nouveaux partenaires d'eIF4E, puis de valider et caractériser l'interaction de l'un d'entre eux avec eIF4E : la protéine Angel1, membre de la famille des CCR4.

Une des étapes cruciales dans la traduction d'un ARNm concerne le recrutement du complexe d'initiation sur la coiffe en 5'UTR des ARNm, principalement orchestrée par eIF4E. Le recrutement de ce complexe dépend majoritairement de la disponibilité d'eIF4E et de sa capacité à interagir avec eIF4G. Ainsi, la présence d'inhibiteurs compétitifs capable de se lier à eIF4E sur le même site qu'eIF4G contribue largement à réguler l'association entre eIF4E et eIF4G mais peut aussi moduler d'autres fonctions d'eIF4E, telles que l'export nucléocytoplasmique des ARNm, ou leur stockage dans P-bodies (voir introduction). De nombreuses études ont mis en évidence près d'une quinzaine de facteurs cellulaires qui partagent avec les

4E-BPs et eIF4Gs le motif de liaison à eIF4E (YXXXXLΦ) et participent à la séquestration du eIF4E libre (Gebauer and Hentze, 2004; von der Haar et al., 2004; Richter and Sonenberg, 2005). Ces régulateurs, aussi appelés eIF4E-interacting partners (4E-IPs), tels que la Maskin, Bicoid, DDX3 ou encore la Gemin 5, jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus tels que la progression du cycle cellulaire, le métabolisme, le développement, ou dans la réponse à de nombreux stimuli (Gebauer and Hentze, 2004; von der Haar et al., 2004; Richter and Sonenberg, 2005; Pacheco et al., 2009; Shih et al., 2012).

La recherche de nouvelles 4E-IPs et la compréhension des régulations qui s'exercent sur eIF4E sont donc un point crucial pour comprendre le rôle biologique d'eIF4E et les mécanismes fins qui sont mis en œuvre pour contrôler ses différentes fonctions. La plupart des 4E-IPs ont été mises en évidence par des analyses fonctionnelles (Cohen et al., 2001; Niessing et al., 2002; Topisirovic et al., 2003), des analyses de protéomique quantitative (Fierro-Monti et al., 2006), ou encore des analyses sur colonnes de coiffe ou de RNP pull down couplées à des analyses de spectrométrie de masse (Topisirovic et al., 2009). La découverte de 4E-IPs dans la famille des protéines à homéodomains (Bicoid, Engrailed, EMX2) a permis d'utiliser la recherche bio-informatique du motif YXXXXLΦ dans les séquences protéiques de cette famille, et de mettre en évidence 200 partenaires putatifs d'eIF4E (Topisirovic et al., 2005) dont certains, comme HOXA9, ont été validés (Topisirovic et al., 2005). Très intéressés par ce constat, nous avons cherché à l'aide du serveur Prosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>) dans les bases de données UniProtKB/ Swiss-Prot, quelles étaient les protéines humaines qui présentaient un motif de liaison à eIF4E de type YXXXXLΦ. Ce crible révèle que plus d'un tiers du protéome humain contiendrait un ou plusieurs motifs de ce type, ce qui représente un nombre complètement improbable, au niveau de la réalité fonctionnelle, de partenaires potentiels d'eIF4E.

Dans cette étude, nous avons augmenté la sélectivité et la spécificité du criblage sur les banques de données. Nous avons redéfini un motif d'interaction à eIF4E plus large sous forme de matrice, en s'appuyant sur la comparaison de séquence des 4E-IPs déjà connues et sur les données structurales obtenues par Marcotrigiano et al. à partir d'un complexe entre eIF4E et un peptide 4E-BP1 (residus 51-67) (Marcotrigiano et al., 1999). Ce nouveau criblage a permis de mettre en évidence, entre autres, un motif putatif d'interaction à eIF4E dans le domaine C-terminal de protéine orpheline Angel1. Cette protéine est décrite comme appartenant à une famille de déadénylases : les CCR4

(carbon catabolite repression-4 like) (Dupressoir et al., 2001). Nos résultats ont montré 1) que la protéine Angel1 est issue de la duplication du gène *angel* à la base des vertébrés et qu'elle est la seule protéine de la famille Angel à posséder le motif d'interaction à eIF4E, 2) qu'Angel1 interagit avec eIF4E *in vitro* et *in vivo* par l'intermédiaire du motif de liaison à eIF4E, 3) que la liaison d'Angel1 à eIF4E n'est pas sensible à la régulation par la voie mTOR et qu'Angel1 n'est pas distribuée avec 4E-BP dans la cellule, et 4) qu'Angel1 est exprimée au niveau du golgi et du réticulum endoplasmique et qu'elle colocalise avec eIF4E dans des particules périnucléaires. Nous avons également montré que d'une part, le niveau global de traduction dans des lignées cellulaires exprimant un shARN contre Angel1 n'est pas affecté suggérant qu'Angel1 n'est pas impliqué dans la régulation de la traduction générale. D'autre part, nous avons montré qu'Angel1 semble être impliquée en partie dans de gros complexes ribo-nucléoprotéiques accrochés à la membrane du réticulum endoplasmique.

Ces résultats démontrent qu'Angel1 est un nouveau partenaire d'eIF4E et ouvrent de nombreuses perspectives quant au rôle d'Angel1 sur la régulation d'eIF4E. L'homologie entre le domaine C-terminal d'Angel1 et le domaine phosphohydrolase des CCR4 suggère un rôle de la protéine dans le métabolisme des ARNm à plusieurs niveaux. À partir de ces résultats, nous proposons un modèle selon lequel Angel1 séquestrerait des ARNm spécifiques par le biais d'eIF4E dans des RNP inactives en terme de traduction. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour caractériser le rôle d'Angel1 sur le métabolisme des messagers et leur traduction. Dans la seconde partie de ce chapitre sont présentés des résultats préliminaires sur la caractérisation fonctionnelle d'Angel1, au niveau de la régulation de la traduction et de son activité déadénylase.

BIOLOGICAL SCIENCES, Cell biology

Tracking a redefined eIF4E-binding motif in protein databases reveals a new partner of eIF4E: the orphan protein Angel1, a member of the CCR4 family

Gosselin P.¹, Martineau Y.², Morales J.¹, Czjzek M.³, Gauffeny I.¹, Morin E.⁴, Le Corguillé G.⁴, Pyronnet S.², Cormier P.¹, Cosson B.^{1*}.

1. UPMC-CNRS, UMR 7150, Station Biologique de Roscoff (SBR), Roscoff 29680, France.

2.INSERM, UMR 1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse 31432, France.

3. UPMC-CNRS, UMR 7139, SBR, Roscoff 29680, France.

4. UPMC-CNRS, FR2424, SBR, Roscoff 29680, France.

*corresponding author :

COSSON Bertrand, UMR7150, station biologique de roscoff, Place George Teissier, 29680
ROSCOFF- +00332 98 29 23 68-cosson@sb-roscoff.fr

ABSTRACT

The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) has long been known as the mRNA cap-binding protein that plays a central role in the translation initiation process. eIF4E is also implicated in most of the crucial steps of the mRNA life cycle such as nuclear export, cytoplasmic localization and stability control, and is now recognized as a pivotal protein in gene regulation. Many of these roles are mediated by its interaction with specific proteins generally known as eIF4E-interacting partners (4E-IPs). To screen for novel 4E-IPs, we developed an original approach based on structural, *in silico* and biochemical analyses. In particular, we identified the orphan protein Angel1, a member of the CCR4 deadenylase family. Using immunoprecipitation experiments, we provide evidence that Angel1 is able to interact *in vitro* and *in vivo* with eIF4E. Point mutation variants of Angel1 demonstrated that interaction of Angel1 with eIF4E is mediated through a consensus eIF4E-binding motif also found in eIF4G and 4E-BP, two well-known 4E-IPs. Immunofluorescence experiments showed that Angel1 has a specific perinuclear pattern, co-localizing with eIF4E in small particles and widely overlapping with endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus staining. Interestingly, we also showed that Angel1 may be part of large ribonucleoprotein complexes bound to ER membranes. Since global translation in Angel1-shRNA cell lines is not affected, we suggest that Angel1 regulate translation of mRNAs specifically targeted to the ER. Taken together, our results provide a powerful method to identify new eIF4E partners and also open new perspectives for understanding eIF4E specific regulation.

INTRODUCTION

The control of gene expression at the mRNA level is a complex process that is critical during many physiological events such as cell cycle, cell growth, differentiation, aging, and cell death. In eukaryotes, the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) plays essential roles at several steps of the mRNA life cycle: translation initiation, nuclear export (reviewed in (1)), cytoplasmic localization and stability control (2). The deregulation of eIF4E activities is a key component in cancer initiation and progression(3-4). Controlling eIF4E functions is therefore a crucial step in normal cell proliferation and survival.

During translation initiation, eIF4E binds the cap structure of mRNA and recruits eIF4G, a large scaffolding protein that acts as a docking site for several proteins required for bridging the ribosome and the mRNA(5-6). The interaction between eIF4E and eIF4G is inhibited in a competitive manner by the small translational repressor 4E-BP, which shares a consensus eIF4E-binding motif YxxxxLΦ (where X is a variable amino acid and Φ is a hydrophobic residue) with eIF4G (7). The motif-containing central peptide of 4E-BP (corresponding to

residues 51-67 of human 4E-BP1) acts as a molecular mimic of eIF4G on the convex dorsal surface of eIF4E, forming an L-shaped structure with an extended chain region and a short α -helix (8). Interaction with eIF4E not only relies on the central peptide of 4E-BP as currently thought. In fact, the binding footprint of 4E-BP appears to be larger and involves fuzzy contacts between 4E-BP extremities and the eIF4E surface (9).

In the nucleus, eIF4E promotes nucleocytoplasmic transport of a selective subset of mRNAs. These transcripts, such as cyclin D1 and ODC, are involved in cell cycle regulation (1, 10-11) and carry a specific 4E-sensitivity element in their 3'UTR (12). Several key regulators of eIF4E-dependent mRNA export have been identified, most of them containing the consensus eIF4E-binding motif found in 4E-BP or eIF4G (13-15).

Beyond well-known regulators of mRNA export and translation initiation, some other eIF4E-interacting partners (4E-IPs) have been discovered over the past decade (16). These 4E-IPs, such as Maskin, Bicoid, DDX3, 4E-T, Gemin5, and GIGYF2, play fundamental roles in cell cycle progression, metabolism, development, tumor formation, and responses to various stimuli (2, 17-21). Consequently, finding novel interacting partners of eIF4E would help to understand cellular mechanisms controlled by eIF4E activity.

In the present study, we employed a new approach based on structural and *in silico* analyses to find new 4E-IPs. Using a redefined eIF4E-binding motif to search databases for potential 4E-IPs, we found an orphan protein Angel1 that displays an eIF4E-binding motif in its C-terminal domain. Interestingly, despite the fact that the biological function of the protein was totally unknown, Angel1 has been described as a potential deadenylase related to the carbon catabolite repressor 4 (CCR4) family due to the strong homology between its C-terminal domain and the CCR4 nuclease domain (22-23). Based on immunoprecipitation experiments, we demonstrate that Angel1 interacts *in vitro* and *in vivo* with eIF4E through its eIF4E-binding site. We report that Angel1 has a specific cytoplasmic perinuclear localization, co-localizing with eIF4E in small particles and generally overlapping with endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus staining. Interestingly, global translation in Angel1-shRNA cell lines was not affected, suggesting that Angel1 may regulate specific mRNAs through its ability to bind eIF4E.

RESULTS

Angel1, a member of the CCR4 family, acquired an eIF4E-binding motif in vertebrates

To find new eIF4E partners, our first approach was to look for sequences in protein databases that contained an eIF4E-binding consensus motif YxxxxLΦ. However, scanning databases with the webserver Prosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>) did not produce any hits since the probability of finding this consensus motif randomly in databases is too high. To define a more accurate consensus sequence, we then performed a structural analysis using the crystal structures of the complexes formed between eIF4E and peptides derived from well-known 4E-IPs: 4E-BP1 and eIF4G1 (8). We evaluated the change in the 3D structure after substituting each residue of the peptides from positions -3 to +6 (annotated from the conserved tyrosine of the consensus motif) using Turbo-Frodo software (24). The resulting set of sequences that were tolerated by the peptides that could still interact with eIF4E constituted the redefined eIF4E-binding motif matrix (Fig. 1A). Scanning the multi-species UniProtKb/Swiss-Prot database with Prosite revealed that the redefined eIF4E-binding motif was present in 582 sequences (out of 5.10^5 protein sequences in the database) (Fig. 1A). As expected, we found different orthologs of already known eIF4E-interacting proteins, such as eIF4Gs or 4E-BPs. Since functionally relevant sequences are expected to be conserved throughout evolution, orthologs that share the redefined eIF4E-binding motif therefore have a greater probability of effectively binding eIF4E. By pairwise alignment of the 582 sequences containing the consensus motif, we found 19 groups of at least three orthologs that shared a coverage rate of over 75% of their lengths and a percentage of identity higher than 50%. Among these groups, 14 groups had not been previously characterized as binding partners of eIF4E (Supplementary Fig. 1). To validate the functionality of each putative eIF4E-binding motif, we fused the human homolog motif of each group to a protein carrier, the yellow fluorescent protein (YFP). Six of the fourteen fusion proteins were successfully produced in rabbit reticulocyte lysate in presence of ^{35}S methionine before being transferred on an m⁷GTP chromatography column pre-loaded with GST-eIF4E. As expected, YFP fused to the eIF4G1 motif was retained on the eIF4E column (Fig. 1B, lane 11). In particular, the YFP fused to the putative eIF4E-binding motif from an orphan protein, identified as Angel1, was also able to bind eIF4E strongly (Fig. 1B, lane 15). The Angel1 motif showed high similarity with the motifs in eIF4G and 4E-BP (Fig. 2A). Never before mentioned as a potential 4E-IP, Angel1 has been described as a member of the CCR4

family due to its conserved C-terminal endo-exonuclease-phosphatase domain (EEP) found in CCR4 or Nocturnin proteins (Fig. 2B) (23). The Angel1 locus comes from a duplication that occurred immediately prior to or early in vertebrate divergence (25), strongly suggesting that, through genome duplication in vertebrates, the ancestral gene coding for the Angel protein produced two paralogs coding for Angel1 and Angel2, respectively (Fig. 2C). Interestingly, we observed that the eIF4E-binding motif is only found in the C-terminal domain of Angel1 sequences (Figs. 2B-C). This motif appears in an extra exon of 111 nucleotides encoding 37 amino acids (Supplementary Fig. 2) and is conserved in the vertebrate lineage (Fig. 2C). Therefore, we assumed that the eIF4E-binding motif in the Angel1 sequence appeared simultaneously with or immediately after the duplication of the ancestral gene *angel* and has been conserved throughout the evolution of vertebrates, suggesting that it has functional relevance.

Angel1 is an eIF4E-interacting protein

To analyze the association between cellular Angel1 and eIF4E, HeLaS3 cell extracts underwent affinity chromatography on m⁷GTP-sepharose beads (Fig. 3A). The endogenous Angel1 protein was retained on the m⁷GTP column (lane 2), as well as the eIF4E partner eIF4G1, and was eluted with the eIF4E complex in presence of free m⁷GTP (lane 4). To exclude the possibility of RNA-mediated interactions, m⁷-GTP purification was performed in presence of RNase A (see Materials and Methods). Therefore, these results suggest that endogenous Angel1 associates with a complex containing eIF4E through a direct protein-protein interaction. Similar results were obtained with HEK293 cell extracts (data not shown).

Next, to further confirm the existence of eIF4E/Angel1 complex in cell extracts and exclude the possibility that Angel1 is retained on m⁷GTP beads by direct interaction with the cap structure, we performed an eIF4E immunoprecipitation experiment (Fig. 3B). Angel1 co-precipitated with eIF4E, as well as with eIF4G1 and 4E-BP1 that bind directly to eIF4E, or PABP (poly(A) binding protein), which is known to interact indirectly with eIF4E by binding with eIF4G (26).

It was then important to assess the function of the potential eIF4E-binding motif YxxxxLΦ in the Angel1 sequence (Fig. 3C). We tested the interaction of eIF4E with the recombinant protein Angel1 (GST-A1) and its variant (GST-A1YA) (Fig. 3C), in which the conserved Tyr₅₀₆ in the putative eIF4E-binding site was replaced by an alanine, preventing the protein from binding to eIF4E (7). GST-A1 and GST-A1YA proteins were produced in bacteria and purified on glutathione sepharose beads. Recombinant proteins were incubated into HeLa cell extract and endogenous eIF4E was purified on an m⁷GTP column. Proteins associated with eIF4E were analyzed by Western blotting and GST-fusion Angel1 proteins were detected using an antibody directed against the GST tag. GST-A1 associated with endogenous eIF4E but GST-A1YA did so only very weakly (Fig. 3C, compare lanes 5 and 6, intermediate panels), demonstrating that the eIF4E-binding site of Angel1 is required for its association with eIF4E. Interestingly, binding of GST-A1 to endogenous eIF4E impaired the interaction between eIF4E and endogenous eIF4G1 (compare lanes 5 and 6, top panels). These results demonstrate that the interaction of Angel1 and eIF4G1 with eIF4E is mutually exclusive and strongly suggests that Angel1 binds directly to the dorsal surface of eIF4E in a manner similar to other 4E-IPs.

To confirm that Angel1 interacts with eIF4E through the eIF4E-binding motif in cells (Fig. 3D), we expressed Angel1 and its variant A1YA tagged with Hema-glutinin (HA) in HeLaS3 cells and performed an immunoprecipitation against the HA tag. We first checked by Western blot that the HA-A1 and HA-A1YA proteins were similarly expressed following transfection of HeLaS3 cells (Fig. 3D, lanes 2 and 3). HA-A1 and HA-A1YA expressed in cells had two major forms that displayed sizes of 80 and 74 kDa, respectively (Fig. 3D, lanes 2, 3, 5 and 6), suggesting that the two overexpressed proteins are post-translationally modified. The HA-A1 immunoprecipitates brought down eIF4E (lane 5), while HA-A1YA immunoprecipitates did not contain eIF4E (lane 6). Taken together, our results demonstrate unequivocally that Angel1 is an eIF4E-interacting protein.

4E-BP1 does not compete with Angel1 to bind to eIF4E

Since hypophosphorylated 4E-BP1 competes with eIF4G1 for a common binding site on eIF4E (27), we then explored whether hypophosphorylated 4E-BP1 could disrupt the Angel1-eIF4E interaction (Fig. 4). To induce *in vivo* 4E-BP1 hypophosphorylation, HeLaS3 cells were

treated with PP242 (lanes 2, 4, 8), an mTOR inhibitor (28). Proteins extract from untreated and PP242-treated HeLaS3 cells (respectively lanes 1 and 2) were immunoprecipitated using an anti-eIF4E antibody (respectively lanes 3 and 4) or purified on an m⁷GTP column (lanes 7 and 8). As expected, the amount of 4E-BP1 bound to eIF4E increased significantly after PP242 treatment (compare lanes 3 and 4; lanes 7 and 8, bottom panels) while the quantity of eIF4G1 bound to eIF4E decreased (top panels). Strikingly, the Angel1 association with eIF4E was not affected when cells were treated with PP242, suggesting that the formation of the Angel1/eIF4E complex is independent of the mTOR signaling pathway and its downstream target 4E-BP.

Angel1 is predominantly cytoplasmic in a perinuclear area and co-localizes with eIF4E in small particles

We then examined the cellular localization of the Angel1 protein (Fig. 5). Indirect immunofluorescence with anti-Angel1 antibody showed that Angel1 predominantly localizes in the cytoplasmic perinuclear area of HeLaS3 cells (Fig. 5A). As expected, no green fluorescence staining was seen after shutting down the expression of Angel1 with shRNA (Figs. 5B and C). Double-labeling experiments using the anti-Angel1 and the anti-eIF4E antibodies (Fig. 6) showed that, as previously demonstrated (29), eIF4E is also localized predominantly in the perinuclear area. However, strict co-localization of the two proteins was restricted to small particles as revealed by higher resolution examination (Fig. 6A). Furthermore, extinction of Angel1 expression did not affect the cellular localization of eIF4E (Fig. 6B), suggesting that Angel1 does not play a role in eIF4E localization.

Angel1 does not affect global translation in cells and may be involved in large EDTA-insensitive RNP complexes.

To address the possible role of Angel1 in the regulation of translation, we analyzed the polysome profiles of HeLaS3 cells expressing either a control shRNA (sh Ctrl) or a shRNA targeting Angel1 (sh-A1#2) (Fig. 7A). The two profiles were similar, suggesting that the down-regulation of Angel1 expression does not affect general translation in cells. We then examined Angel1 distribution in polysome profiles of HeLa S3 cells (Figs. 7B,C and D). Angel1 is mostly found in the light fractions (fractions 1-3), but is also present in small amounts in

the polysomal fractions (fractions 8-14) (Fig. 7B). Removal of Mg²⁺ ions by the addition of EDTA leads to the dissociation of 80S ribosomes and polysomes into partially disassembled and unfolded ribosomal subunits and the release of mRNA (30). In EDTA-treated extracts, even though we observed a marked increase in the abundance of free ribosomal subunits and the disappearance of 80S monosomes and polyribosomes, Angel1 was still observed in the heavy fractions (fractions 8-14) (Fig. 7C). To compare Angel1 distribution in heavy fractions, the amount of Angel1 in fractions 1 and 8 to 14 was quantified (Fig. 7D). While PABP shifted to the polysomes gradient upper-most fractions upon EDTA treatment (fractions 1-8), Angel1 displayed the same distribution whether extracts were treated with or without EDTA. These results suggest that Angel1 is not associated with polysomes in cells, but may be involved in large ribonucleoprotein (RNP) complexes that are not sensitive to EDTA treatment. Moreover, these complexes appeared in the heavy fractions only when polysomes were prepared with 0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate (data not shown), which were shown to be necessary for harvesting polysomes bound to the membranes of the endoplasmic reticulum (ER) (31). Consequently, we next addressed whether Angel1 associates with the ER in HeLaS3 cells.

Angel1 is mainly distributed in the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum

Angel1 localization was compared with Calnexin, an ER transmembrane protein that acts as a chaperone in protein folding (32) and interacts directly with ribosomes (33). A double-label immunofluorescence performed with an anti-Calnexin and anti-Angel1 antibodies (Figure 8A) showed that Angel1 co-localized primarily with the ER in these cells. A double-label immunofluorescence was then performed with the anti-Angel1 and an anti-GM130 antibody, targeting a constituent of the Cis-Golgi matrix facilitating ER-Golgi transport (34). As shown in Figure 8B, the higher fluorescence intensity for Angel1 and GM130 were significantly polarized on the same side of the nucleus and showed an incomplete overlap, with Angel1 displaying a wider overall distribution than the Golgi apparatus. To further address the specific localization of Angel1 by subcellular fractionation, clarified HeLaS3 cell extracts were resolved on a continuous 0.8-2 M sucrose gradient (Fig. 8C). Western blotting was used to probe for the ER marker BIP, eIF4E, eIF4G1, 4E-BP1, and Angel1 (Fig. 8C). Angel1 was distributed mainly in the heavy fraction (12), containing the ER marker. eIF4E was

fractionated into two main pools: one co-fractionating with the majority of 4E-BP1 and eIF4G1 in the hydrosol and light fractions (fraction 2), and one in the heavy fractions. As Angel1 co-fractionated with the ER in the heavy fraction, these results indicate that Angel1 is likely to be associated with the ER and could potentially interact with the eIF4E pool found in the heavy fraction. Moreover, Angel1 is not found in the lightest fractions, where the majority of 4E-BP1 was found, suggesting that Angel1 and 4E-BP1 are localized in different cellular compartments.

DISCUSSION

Here, we described a new strategy based on a structural and *in silico* analysis to screen for novel eIF4E-interacting partners using a redefined consensus eIF4E-binding motif shared by most of the known 4E-IPs. In our approach, phylogeny was used as a selective filter to detect new partners conserved throughout evolution. We identified the orphan protein Angel1, described as a member of the CCR4 family (23), as a novel 4E-IP. The presence of the eIF4E-binding motif in the Angel1 sequence coincides with the appearance of Angel1 in the vertebrate genome (Fig. 2C), suggesting that acquisition of the eIF4E-binding motif in the Angel1 sequence simultaneously occurred with the gene duplication of *angel*. Interestingly, comparing the exons of the two human homologues Angel1 and Angel2 showed that the Angel1 sequence has two additional exons, in one of which is integrated the eIF4E-binding motif (Supplementary Fig. 2). This motif in Angel1 is specific to vertebrates since it appeared after the duplication of the ancestral gene *angel* that occurred immediately prior or very early in the divergence of vertebrates. Searching sequence databases using NCBI (35) did not reveal the origin of this exon. We suggest that this eIF4E-interacting exon appeared after the gene transfer of a non-sequenced organism or by generation of a completely new sequence in the *angel1* gene.

In the present study, we demonstrated the physiological interaction between Angel1 and eIF4E (Fig. 3). Given that the interaction occurs through the eIF4E-binding motif also found in most 4E-IPs, and that Angel1 competes with eIF4G to bind to eIF4E (Fig. 3C), we infer that Angel1 binds to the interaction site located on the dorsal surface of eIF4E. We demonstrated that the binding of Angel1 to eIF4E is not sensitive to the mTOR pathway and is not affected

by an increase in the eIF4E/4E-BP association (Fig. 4), suggesting that 4E-BP and Angel1 do not interact with the same fraction of eIF4E in cells. Interestingly, cell fractionation showed that Angel1 and 4E-BP are not co-distributed in cells, with 4E-BP co-fractionating with cytosolic fractions while Angel1 co-distributes with the ER and Golgi elements (Fig. 8C). Consequently, the association between Angel1 and eIF4E seems to occur in a 4E-BP-free cellular area.

In the cell fractionation experiment, Angel1 was distributed with a small pool of eIF4G1 and eIF4E, implying that Angel1 and eIF4G1 may potentially compete for eIF4E in cells (Fig. 8C). Distribution of eIF4G1 and eIF4E in heavy fractions is in accordance with studies by Willet et al. (29, 36). These studies have shown that a sub-fraction of initiation factors is associated with cellular structures and has a perinuclear localization in fibroblasts (29). More importantly, they have shown that a fraction of eIF4E and eIF4G1 is associated with the Golgi apparatus and some of these factors co-localize with active sites of translation, while 4E-BP is localized in the cytosol (36). Our immunofluorescence experiments revealed that Angel1 displays a specific perinuclear localization, strongly associated with the ER and the Golgi apparatus (Figs. 5 and 8), thereby corroborating the distribution of Angel1 in cell fractionation (Fig. 8C). Moreover, Angel1 partially co-localized with eIF4E in specific particles in the perinuclear area (Fig. 6), suggesting that Angel1 interacts with a specific pool of eIF4E associated with the ER or the Golgi apparatus.

In eukaryotic cells, mRNAs are not homogeneously distributed in the cytoplasm. High-throughput technologies have recently uncovered that subcellular targeting of mRNAs is a widespread phenomenon (37-38). Interestingly, a substantial proportion of mRNAs are localized in the ER independently of the classical signal sequence/SRP pathway (39). Co-localization of eIF4E with Angel1 in perinuclear particles, as well as the co-staining of Angel1 with the Golgi apparatus and the ER, suggest that Angel1 is involved in the regulation of specific mRNAs localized in the ER and Golgi compartments. In that case, an Angel1 knock-down would not drastically affect general translation activity. As expected, polysome profiles in Sh-Angel1 expressing cell lines were not affected (Fig. 7A), nor were they affected when Angel1 was overexpressed (data not shown). We conclude from these results that Angel1 is not essential for general translation in normal growth conditions, but could potentially regulate translation of specific localized mRNAs. Polysome profiling of HeLaS3 cells

demonstrated that Angel1 is not associated with polysomes (Fig. 7C). Angel1 was only seen in heavy fractions when we used conditions known to capture ER membrane-bound polysomes with 0.5% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate (40), consistent with the fact that Angel1 is associated with the ER or Golgi apparatus.

CCR4 proteins belong to the endonuclease-exonuclease-phosphatase (EEP) group and display a Mg²⁺-dependent 3'-5' deadenylase activity, that functions in the first step of the degradation of poly(A) mRNAs (41). The C-terminal domain of Angel1 displays significant homology with the conserved EEP domain carrying the deadenylase function of CCR4 (23, 42). Although exonuclease 3'-5' activity has been shown in Angel orthologs in yeast (43-44), we failed to detect any specific nuclease activity of the recombinant GST-Angel1 protein (data not shown). However, Angel1 has been shown to interact with CAF1B (45), which has deadenylase activity (46), implying that Angel1 may recruit CAF1B in eIF4E complexes. In our model, Angel1 would then have then two functions for regulating specific mRNAs and bringing them into translationally silenced particles. Impeding eIF4G-eIF4E interaction may inhibit translation and CAF1B recruitment would lead to deadenylation of the mRNA. In this model, specific mRNAs, upon export from the nuclear pore complex, reside in association with the ER membrane in translationally silenced mRNPs, sequestered by Angel1 through its interaction with eIF4E. Taken together, our results provide clear evidence that Angel1 is a new interacting partner of eIF4E and opens new perspectives for understanding the regulation of compartmentalized protein expression and eIF4E functions.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids— Total RNA from 293 cells was prepared using Trizol purification, and reverse transcribed using the Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Angel1 cDNA was amplified with the primers A15' (CGGCCATGATCGCGTCGTGC) and A13' (TCATGGGGCGGTGACTTCCATCCC) and Pfu polymerase (Promega). PCR products purified from agarose gels were subcloned into pcr2.1 topo using the Topo TA cloning kit (Invitrogen) for DNA sequencing. The Angel1 open reading frame was then amplified from a 5' *Xba*1 site and HA tag to a 3' *Not*1 site using primers XbaHAA1(ATATAATCTAGAATGTACCCCTATGATGTGCCGATTATGCCATGATCGCGTCGTGCTTGTG) and A1Not1 (ATAATGCGGCCGCCCTGGGAGCCCTGTCATGGG) and then subcloned into the *Nhe*1/*Not*1 sites of a pCI-neo mammalian expression vector (Promega).

To express GST-Angel1 (A1), the PCR-generated DNA fragment containing the targeted coding region of Angel1 was cloned into the *Eco*RI and *Bam*HI sites of a pGEX-4T-2 plasmid (Amersham Pharmacia Biotech). A single point mutation of the residue *Tyr*₅₀₆ (Angel1YA (A1YA)) was created in the pCI-neo constructs and pGEX-4T-2 constructs using the Quick-change™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions. The following two primers were used for mutagenesis: Glu₂₉₈-AlaF(AGATCAGAGAGACGCAAGGCTGGCCGAGACTCCTGCTACG) and Glu₂₉₈-AlaR(CGTAGCAGGAAGTCTCGGCCAGCCTGCGTCTCTGATCT).

Antibodies—The following antibodies were used: anti-eIF4GI and anti-4E-BP2 obtained from Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada); anti-4E-BP1 (9458 and 9644), phospho-S6K1 (Thr 389), phospho-S6 (Ser240/244), RPS3, PABP, BIP and calnexin (Cell Signaling Technology); eIF3b, GAPDH, TGN38 and Histone H1 and anti-GST (Santa Cruz Biotechnology, Inc); anti-β-Tubulin, β-Actin and Angel-1 (Sigma-Aldrich); anti-eIF4E and anti-GM130 (Transduction Laboratories); anti-HA (Roche Boehringer). anti-rabbit, anti-rat and anti-mouse secondary antibodies for Western blots (Dako SA). rabbit polyclonal anti-eIF4E antibody conjugated with rhodamin for immunofluorescence (gift from S. Morley at the University of Sussex, Brighton, UK)(29); secondary antibodies for immunofluorescence including goat anti-rabbit Alexa 555, goat anti-rabbit Alexa 488, goat anti-mouse Cy3, goat anti-mouse Alexa 488 and anti-rat TRITC T4280 (all from Invitrogen).

Phylogeny— The original alignment produced by T-Coffee (47)/M-Coffee (48) on 970 sites was optimized using trimAl (49) (removed all columns with gaps in more than 20% of the sequences or with a similarity score lower than 0.001, but conserved at least 50% of the original alignment) resulting in a final alignment of 485 sites. PhyML (50) was used to reconstruct a maximum likelihood (ML) phylogenetic tree (performed with the LG substitution model (51), 1000 bootstraps and 4 substitution rate categories). Sequences used were XP_001637908.1 (N.vectensis), NP_477204.1 (D.Melagaster), SPU_021986 (S.purpuratus), XM_002128787.1 (C.intestinalis), NP_001025131.1 (D.rerio), NP_001089542.1 (X.laevis), NP_001026218.1 (G.gallus), NP_067396.3 (M.musculus), NP_653168.2 (H.sapiens), XP_698034.2 (D.rerio), NP_001016236.1 (X.laevis), NP_001026376.1 (G.gallus), NP_653107.2 (M.musculus), NP_056120.2 (H.sapiens).

Growth of cells and preparation of cell extracts— HeLaS3, and HEK293 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection and maintained in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza) and 5 U/mL penicillin-streptomycin (Lonza) in 5% CO₂. Constitutive silencing of Angel1 was obtained using pLKO vectors (Sigma-Aldrich) as previously described (52). shRNA vector

accession numbers are as follows: Angel1 #1 (TRCN0000127505), Angel1 #2 (TRCN0000128671), Angel1 #3 (TRCN0000128796) and non-target shRNA control SHC002. For PP242 (Sigma-Aldrich) treatments, cells were incubated 1 h with 2.5 μ M PP242 before harvesting.

HA-immunoprecipitation assay—HeLaS3 cells were transiently transfected with pCI-neo constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in OPTI-MEM (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Then, 24 h after transfection, cells were washed twice with cold PBS and lysed with M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific). Co-immunoprecipitations were performed with ProFound[™] Mammalian HA Tag IP/Co-IP Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation and m⁷GTP purification— HeLaS3 cells were seeded on 150 mm plates and treated with a vehicle (DMSO) or PP242 (2.5 μ M) for 1 h. Cells were then washed with cold PBS, collected, and lysed in buffer A containing 40 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM GDP, 10 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, and 0.3% CHAPS supplemented with protease and phosphatase inhibitors (as described in Dowling, Topisirovic et al. 2010). To exclude the possibility of RNA-mediated interactions, cell extracts were treated with 200 μ g/mL RNase A (Invitrogen) at 37°C for 15 min. Cell extracts were transferred onto 7-methyl GTP sepharose 4B (GE Healthcare) or anti-eIF4E sepharose (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) or protein G-sepharose beads (GE Healthcare), as a control, and incubated for 2 h at 4°C. Beads were washed four times in buffer A. Bound proteins were eluted with Laemmli buffer and processed for Western blotting.

GST recombinant proteins production and eIF4E-binding assay—The wild type and mutant proteins GST-A1, GST-A1YA were overexpressed in *E. coli* (Rosetta (BL21), Novagen) and purified on a glutathione sepharose 4B column (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. Proteins were eluted in buffer EB (50 mM Tris- HCl, 10 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich), pH 8) and were run on a 10% SDS polyacrylamide gel to analyze their quality. Blue coomassie gel staining was used to quantify purified proteins. 1 μ g of each protein was added to cell extract for 1 h at 4°C, and then incubated with 7-methyl GTP sepharose 4B beads for 2 h at 4°C. Beads were washed four times in buffer A. Bound proteins were eluted with Laemmli buffer and processed for Western blotting. Input of recombinant proteins were diluted 10 times before analysis by Western blotting.

Immunofluorescence— HeLaS3 cells (3.10^3) were plated on 96-Cell Carriers (Perkin Elmer) and grown for 48 h at 37°C. Cells were washed three times with PBS, fixed by 3% PFA in PBS at room temperature (RT) for 15 min and washed again. Membranes were permeabilized with 0.5% Triton in PBS/NH₄Cl (wash buffer) at RT for 10 min. After washes, cells were incubated at RT for 1 h with 2.5% guinea pig serum before incubation with primary antibody and 2.5% guinea pig serum overnight at 4°C. Incubation with the appropriate secondary antibody was

performed for 1 h at RT after washes. Finally, cells were stained for 10 min with 1 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) in wash buffer and washed twice. Images were collected on a confocal Leica SP5 microscope using a 40X or 63X oil objective.

Polysome profiling and cell fractionation– Polysome analysis was performed as described in (53). Briefly, cells were cultured in 15 cm dishes for 24 h. Cells were washed with cold PBS containing 100 μ g/mL cycloheximide, collected, and lysed in a hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 100 μ g/mL cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate). When indicated, 50 mM EDTA was added to the lysates on ice 10 min before loading them onto 10-40% sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and centrifuged in SW41Ti rotor at 38,000 rpm for 2.5 hours at 4°C. Gradients were fractionated and the optical density (OD) at 254 nm was continuously recorded using an ISCO fractionator (Teledyne ISCO; Lincoln, NE, USA). Fractions were precipitated with two volumes of 100% EtOH and proteins were analyzed by Western blotting. Fractionation of trans-Golgi, Golgi, ER, and nucleus was performed as described in (54). Briefly, cells were harvested in 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM MgAc₂, 0.25 M sucrose and lysed in a Dounce homogenizer. Extracts were loaded on a 0.8 M to 2 M sucrose density step gradient and centrifuged for 2 h at 29,000 rpm.

REFERENCES

1. Strudwick S & Borden KL (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70(1):10-22.
2. von der Haar T, Gross JD, Wagner G, & McCarthy JE (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11(6):503-511.
3. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, & Sonenberg N (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345(6275):544-547.
4. Clemens MJ (2004) Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 23(18):3180-3188.
5. Gross JD, et al. (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115(6):739-750.
6. Sonenberg N & Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136(4):731-745.
7. Mader S, Lee H, Pause A, & Sonenberg N (1995) The Translation Initiation-Factor Eif-4e Binds to a Common Motif Shared by the Translation Factor Eif-4-Gamma and the Translational Repressors 4e-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 15(9):4990-4997.
8. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, & Burley SK (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3(6):707-716.
9. Gosselin P, et al. (2011) The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS. *Nucleic Acids Res* 39(8):3496-3503.
10. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, & Sonenberg N (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1065-1070.
11. Cohen N, et al. (2001) PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *Embo J* 20(16):4547-4559.
12. Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabaneck L, Ruiz-Gutierrez M, & Borden KL (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 175(3):415-426.
13. Topisirovic I, et al. (2003) The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *Embo J* 22(3):689-703.
14. Topisirovic I, et al. (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels. *Mol Cell Biol* 25(3):1100-1112.
15. Topisirovic I, et al. (2009) Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *Embo J* 28(8):1087-1098.
16. Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 284(25):16711-16715.
17. Richter JD & Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433(7025):477-480.
18. Gebauer F & Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10):827-835.
19. Shih JW, et al. (2012) Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochem J* 441(1):119-129.
20. Pacheco A, Lopez de Quinto S, Ramajo J, Fernandez N, & Martinez-Salas E (2009) A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic Acids Res* 37(2):582-590.
21. Morita M, et al. (2012) A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol*.

22. Kurzik-Dumke U & Zengerle A (1996) Identification of a novel *Drosophila melanogaster* gene, angel, a member of a nested gene cluster at locus 59F4,5. *Biochim Biophys Acta* 1308(3):177-181.
23. Dupressoir A, et al. (2001) Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics* 2:9.
24. Roussel A CC (1989) TURBO-FRODO. *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*. Mountain View, CA: Silicon Graphics.
25. Lipovich L, Hughes AL, King MC, Abkowitz JL, & Quigley JG (2002) Genomic structure and evolutionary context of the human feline leukemia virus subgroup C receptor (hFLVCR) gene: evidence for block duplications and de novo gene formation within duplicons of the hFLVCR locus. *Gene* 286(2):203-213.
26. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, & Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19(1):104-113.
27. Gingras AC, Raught B, & Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15(7):807-826.
28. Feldman ME, et al. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7(2):e38.
29. Willett M, Flint SA, Morley SJ, & Pain VM (2006) Compartmentalisation and localisation of the translation initiation factor (eIF) 4F complex in normally growing fibroblasts. *Exp Cell Res* 312(15):2942-2953.
30. Nolan RD & Arnstein HR (1969) The dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes with EDTA and the location of messenger ribonucleic acid. *Eur J Biochem* 9(4):445-450.
31. Vedeler A, Pryme IF, & Hesketh JE (1991) The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krebs II ascites and 3T3 cells. *Mol Cell Biochem* 100(2):183-193.
32. Trombetta ES & Helenius A (1998) Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8(5):587-592.
33. Delom F & Chevet E (2006) In vitro mapping of calnexin interaction with ribosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(1):39-44.
34. Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP, & Sztul E (2001) The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J Biol Chem* 276(4):2693-2700.
35. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403-410.
36. Willett M, Brocard M, Davide A, & Morley SJ (2011) Translation initiation factors and active sites of protein synthesis co-localize at the leading edge of migrating fibroblasts. *Biochem J* 438(1):217-227.
37. Mili S, Moissoglu K, & Macara IG (2008) Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature* 453(7191):115-119.
38. Lecuyer E, Yoshida H, & Krause HM (2009) Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization. *Curr Opin Cell Biol* 21(3):409-415.
39. Pyhtila B, et al. (2008) Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum. *RNA* 14(3):445-453.
40. Sampson DA & Jansen GR (1984) A method for isolation of undegraded free and membrane-bound ribosomes from rat lactating mammary gland. *J Biochem Biophys Methods* 9(1):49-60.

41. Chen J, Chiang YC, & Denis CL (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J* 21(6):1414-1426.
42. Dlakic M (2000) Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem Sci* 25(6):272-273.
43. Faber AW, Van Dijk M, Raue HA, & Vos JC (2002) Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 8(9):1095-1101.
44. Feddersen A, et al. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* Ng13p is an active 3'-5' exonuclease with a specificity towards poly-A RNA reminiscent of cellular deadenylases. *Nucleic Acids Res* 40(2):837-846.
45. Wagner E, Clement SL, & Lykke-Andersen J (2007) An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear Cajal bodies. *Mol Cell Biol* 27(5):1686-1695.
46. Bianchin C, Mauxion F, Sentis S, Seraphin B, & Corbo L (2005) Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* 11(4):487-494.
47. Notredame C, Higgins DG, & Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302(1):205-217.
48. Wallace IM, O'Sullivan O, Higgins DG, & Notredame C (2006) M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic Acids Res* 34(6):1692-1699.
49. Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, & Gabaldon T (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25(15):1972-1973.
50. Guindon S, et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3):307-321.
51. Le SQ & Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25(7):1307-1320.
52. Dowling RJ, et al. (2010) mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328(5982):1172-1176.
53. Mamane Y, et al. (2007) Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 2(2):e242.
54. Greenfield JP, et al. (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):742-747.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: New screening based on structural, *in silico* and biochemical analysis reveals a novel 4E-IP

A. Combination of structural, *in silico*, and m⁷GTP chromatography approaches reveal that Angel1 is a novel eIF4E interacting protein. See text for details. **B.** The putative eIF4E-interacting domain found in Angel1 interacts with eIF4E *in vitro*. ³⁵S-labeled putative eIF4E-interacting motifs fused to YFP (input) were produced in rabbit reticulocyte lysate and analyzed using chromatography on a m⁷GTP column pre-loaded with GST-eIF4E or GST as control. After washing, proteins were eluted with SDS buffer and analyzed using SDS-PAGE. Coomassie staining was used to visualize GST-eIF4E (lower panel) and Phosphorimager analysis was used to visualize radioactive fusion proteins (upper panel).

Figure 2: A conserved eIF4E-binding sequence resides in the C-terminal segment of Angel1.

A. The putative eIF4E-binding motifs of Angel1 mouse (m), human (h), chicken (Ga), and Xenopus (Xe) were aligned over several eIF4E-binding proteins. Residues that were identical or conserved in more than 75% of the sequences are shaded in black and gray, respectively. The consensus eIF4E-binding motif YxxxxLΦ is indicated. **B.** Schematic drawing of the relative positions of the eIF4E-binding site YxxxxLΦ (dark gray box) and the endo-exonuclease phosphatase (EEP) domain (light gray box???) in human (h)Angel1, hCCR4a and hCCR4b, and hNocturnin amino acid sequences. The amino-acid (aa) lengths of the proteins are given. **C.** Unrooted phylogenetic tree of Angel-related sequences in 10 species. The presented tree was constructed using the Maximum Likelihood method (see Materials and Methods). The brace indicates the sequences that contain the consensus motif (YxxxxLΦ).

Figure 3: Angel1 interacts with eIF4E through its eIF4E binding motif

A. Angel1 interacts with eIF4E on m⁷GTP beads. HeLaS3 cell extracts (lane 1) were incubated with m⁷GTP beads and bound proteins were analyzed by Western blotting (lane 2). eIF4E complexes were eluted from beads with 200 μM free m⁷GTP (lane 3) and elution was analyzed by Western blotting (lane 4). Anti-actin was used as a negative control. **B.** Angel1 co-precipitates with eIF4E. eIF4E immunoprecipitation was performed on HEK 293 cell extracts. Total extract (lane 1) and immunoprecipitates obtained with G-sepharose beads alone (negative control) (lane 2) or α-eIF4E-sepharose beads (lane 3) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. As a negative control, Actin did not co-precipitate with eIF4E (data not shown) **C.** Angel1 interacts with eIF4E through the conserved eIF4E-binding sequence. Upper panel: schematic drawing of the constructs expressing the recombinant proteins GST-Angel1 (wild type) and its mutant in the eIF4E-binding site GST-A1YA in bacteria. Lower panel: HeLa S3 cell lysates were incubated with wild-type or mutant GST fusion Angel1 (1μg each). 1/50 of total extract, total extract with wild-type or mutant GST fusion Angel1 was analyzed by Western blot (lanes 1, 2, 3). Cell extracts were incubated with m⁷GTP beads and the ability of recombinant Angel1 and its mutant to bind endogenous eIF4E was monitored by Western blot with an anti-GST antibody (lanes 4, 5, 6) **D.** eIF4E co-precipitates specifically with Angel1 through its interaction with the eIF4E-binding motif. Upper panel: schematic drawing of the constructs expressing the recombinant proteins HA-Angel1 (wild type) and its mutant

in the eIF4E-binding site HA-A1YA. HeLa S3 cells were mock-transfected, or transfected with HA-A1 or HA-A1YA expressing vectors and transfected cell lysates were analyzed by Western blot in lane 1, 2 and 3, respectively. Co-immunoprecipitation against the HA tag was performed on the transfected cell lysates and immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting (lanes 4, 5, 6).

Figure 4: The interaction Angel1-eIF4E is not sensitive to mTOR pathway.

HeLaS3 cells were treated with or without 2.5 μ M PP242 (mTOR inhibitor) for 1 h. Cell extracts were incubated with m^7GTP beads, α eIF4E-sepharose beads or sepharose beads (control), as described in Figs. 3A and B. Bound proteins were analyzed by immunoblotting.

Figure 5: Angel1 is localized in a specific perinuclear area

A. Immunofluorescence staining was performed with the anti-Angel1 antibody (Sigma) and an Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (green) on HeLaS3 cells. Nuclei were stained with 1 μ g/mL of Hoescht. The subcellular localization of Angel1 was visualized using confocal microscopy. **B.** HeLa S3 cells were transfected with pLKO vectors expressing shRNA against Angel1 (Sh-A1 1,2,3) or Sh control (ctrl) (scramble sequence). Cells were selected for 1 week with 4 μ g/mL puromycin. Expression of Angel1 in the various cell lines was analyzed by Western blotting with the anti-Angel1 antibody (Sigma). Anti-tubulin was used as a loading control. **C.** Immunofluorescence staining was performed on Angel1-shRNA#2 expressing cell lines as described in A.

Figure 6: Angel1 co-localizes specifically with eIF4E in small perinuclear granules.

Immunofluorescence staining was performed on HeLaS3 cells, expressing (**B**) or not expressing (**A**) Angel1-shRNA#2, with the anti-Angel1 and Alexa 488-conjugated anti-rabbit (green) and an anti-eIF4E specific polyclonal Alexa 555-conjugated antibody (red). The subcellular localization of Angel1 and eIF4E were visualized using confocal microscopy. Co-localization of Angel1 and eIF4E appears in yellow and is indicated by white arrows.

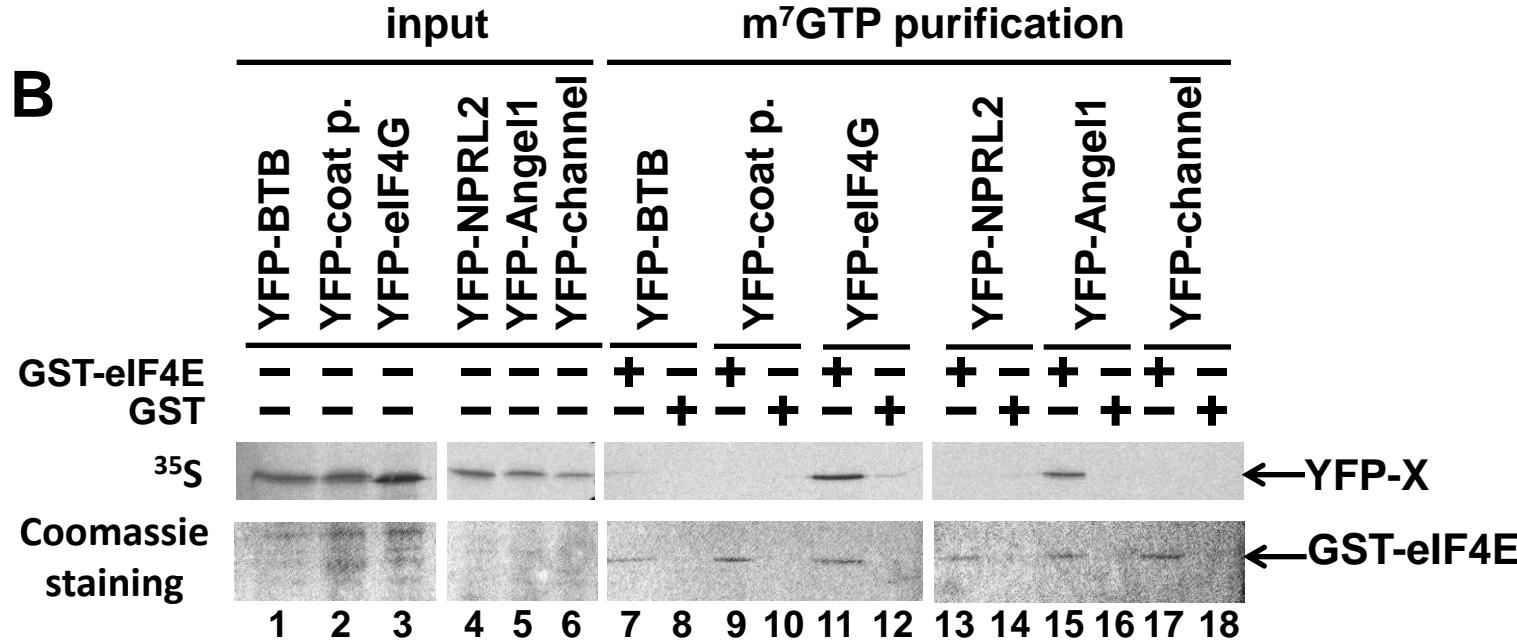
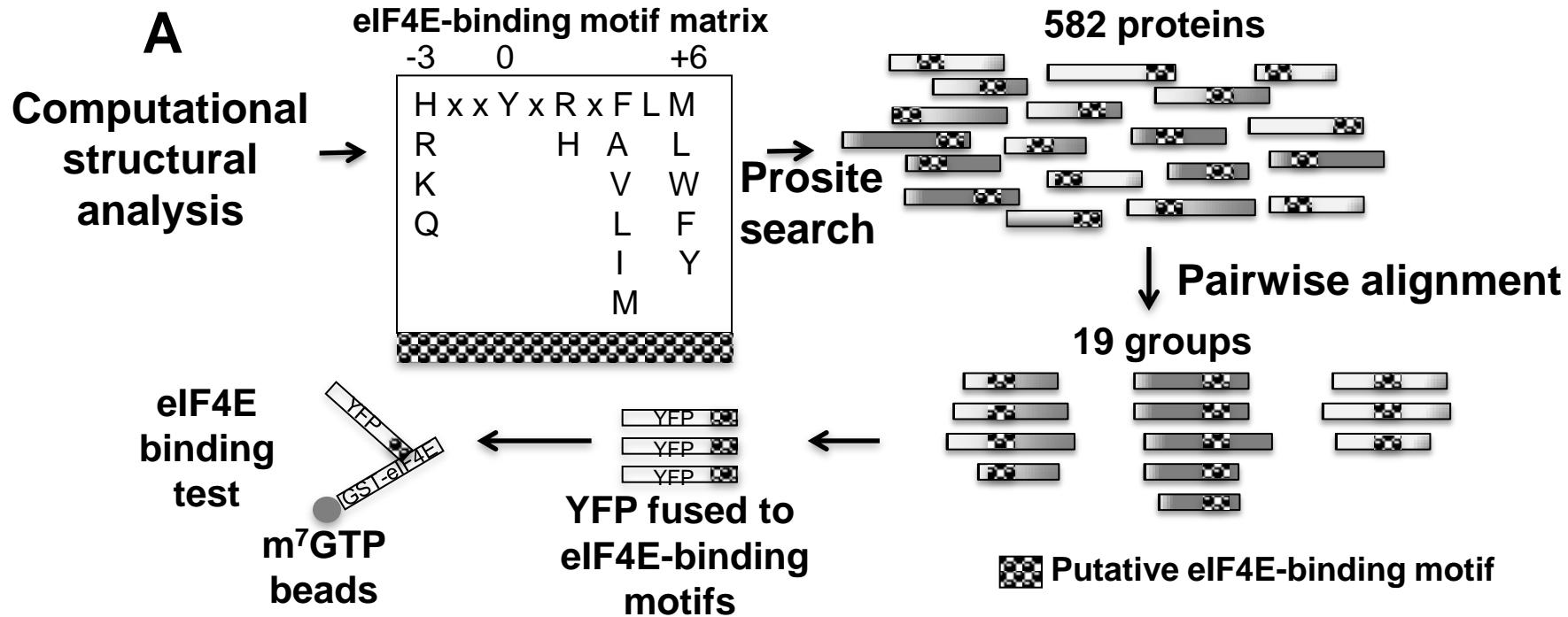
Figure 7: Angel1 is not involved in general translation and is not associated with polysomes.

Angel1 knock-down did not affect the polysome profile of cultured cells. **A.** HeLa S3 cells expressing either a control shRNA (sh-Ctrl, blue) or an shRNA targeting Angel1 (sh-A1#2, red) were harvested and cytoplasmic extracts were prepared. The extract was loaded onto linear 10–40% sucrose gradients, fractionated by ultracentrifugation and collected by continuously recording absorbance at 254 nm to separate 40S and 60S ribosomal subunits from the 80S monosome and polysome fractions. Analysis of Angel1 protein expression is shown in Figure 5B. All results shown are representative of at least three separate experiments. **B.C.D.** Angel1 associates with high-molecular-weight fractions, independently of EDTA. **B.** HeLaS3 cell extract was processed as in A. Fractions from 1 to 14 were run on a 10% SDS-PAGE gel and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Fractions 1, 2, and 3 were diluted 1:3 due to the high concentration of proteins. RPS3 and PABP were used as profile controls. **C.** HeLa S3 cell extract was pre-treated with 50 mM EDTA and processed as described in B. **D.** Amounts of Angel1 and PABP in the gradient fractions 1, and 8 to 14 with or without EDTA quantified by densitometric analysis of Western blots using Imagequant software. The percentage of proteins per fraction is calculated against the total amount of proteins,

determined by adding fractions 1 and 8 to 14. Error bars were established from two different experiments.

Figure 8: Angel1 is co-distributed with the ER and the Golgi apparatus

Co-localization of Angel1 and Calnexin (A), or GM130 (B) was determined by indirect immunofluorescence with respectively the anti-Angel1 and the Alexa 555-conjugated anti-rabbit (red), the anti-Calnexin and the Alexa 488-conjugated anti-mouse (green) or the anti-GM130 and the Alexa 488-conjugated anti-mouse antibodies (green). Subcellular localization of Angel1, Calnexin and GM130 were visualized using confocal microscopy. Co-localization between Angel-1 and Calnexin (A), and Angel1 and GM130 (B) appears in yellow on the merged images (right panels). **C.** Angel1 co-fractionated with Golgi and ER elements. HeLaS3 cell extracts were resolved on a continuous 0.8-2 M sucrose gradient. The total extract before fractionation (Input) and the fractions from 1 (lightest fraction) to 12 (heaviest fraction) were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.



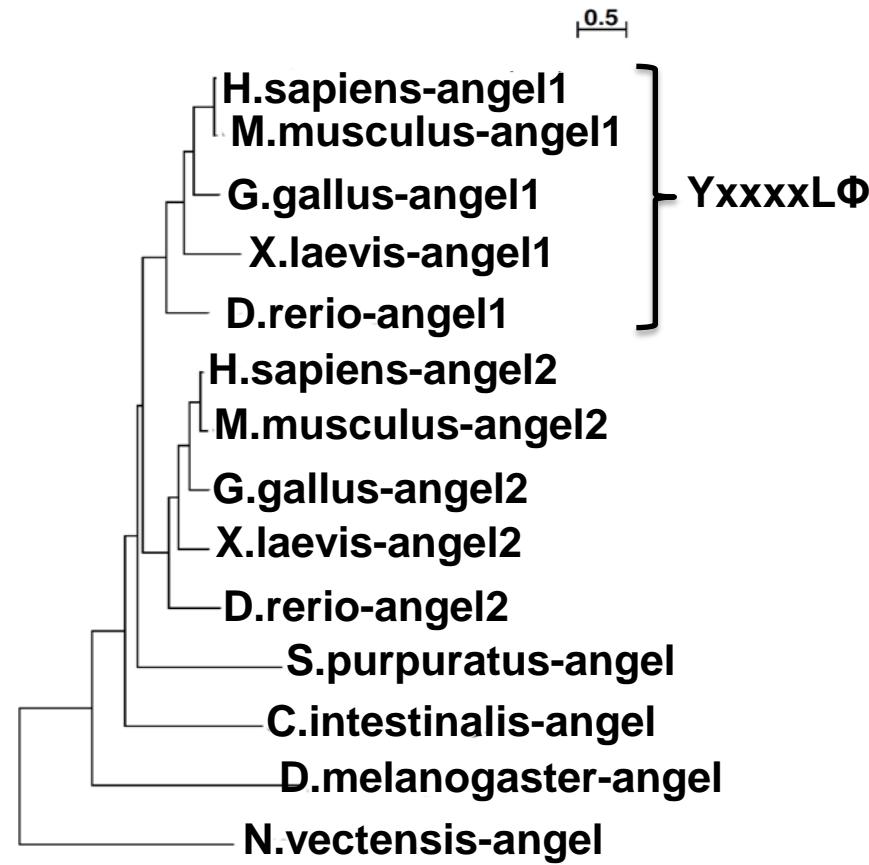
A

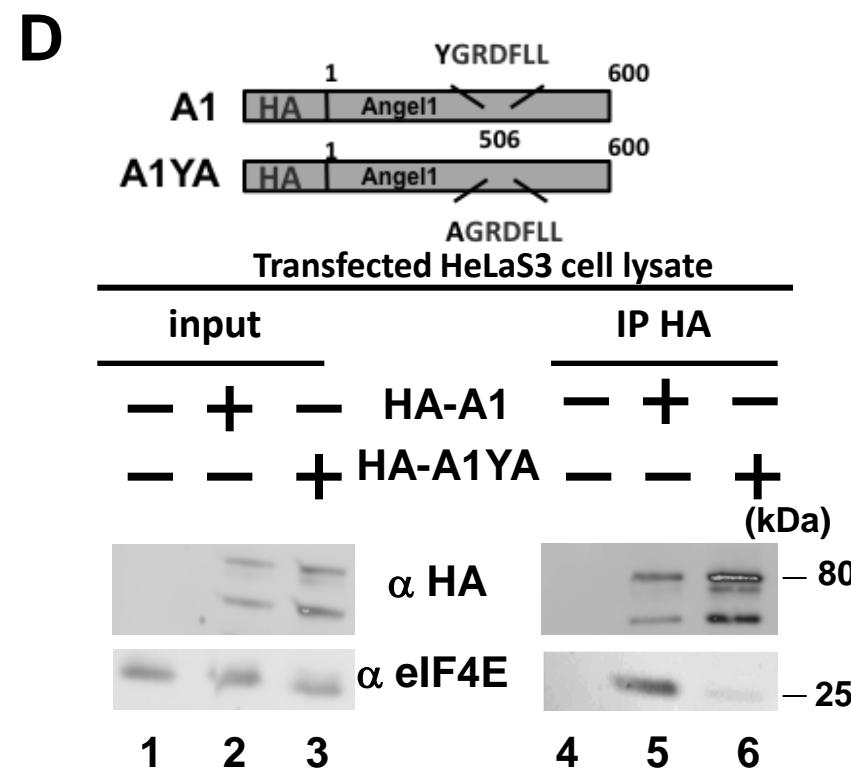
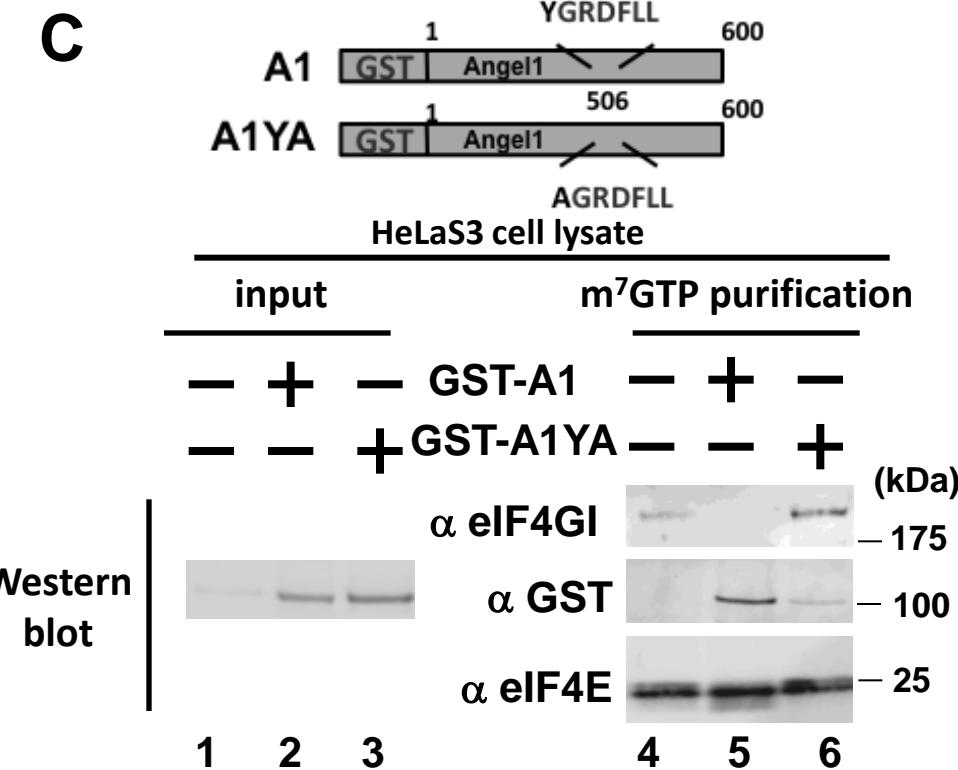
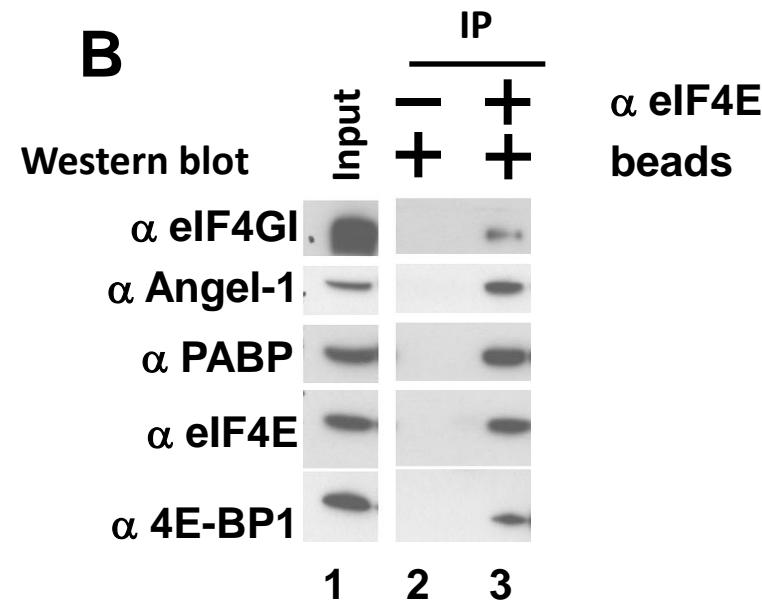
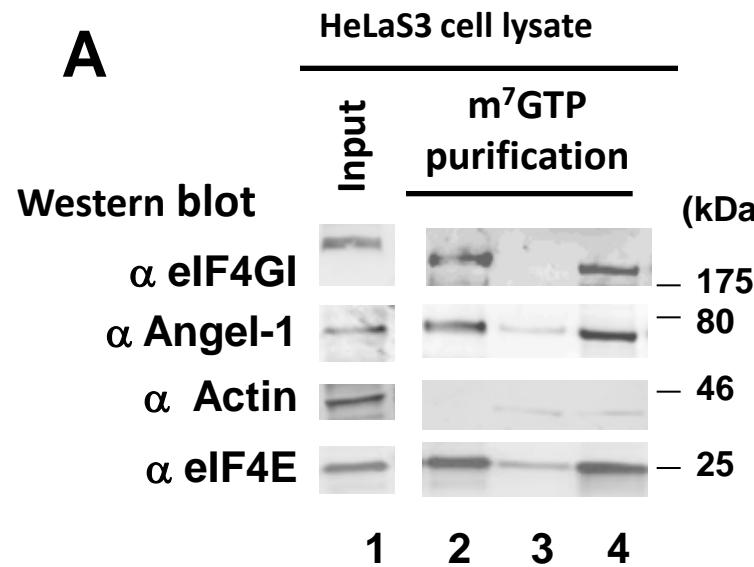
helf4GII	KKQYDREFLL
helf4GI	KKRYDREFLL
h4E-BP1	RIIYDRKFLM
h4E-BP2	RIIYDRKFLM
h4E-BP3	RIIYDRKFLM
hAngel1	RRKYGRDFLL
mAngel1	RLKYGRDFLL
GaAngel1	RRKYSRDFLL
XeAngel1	KPIYTRQQLL

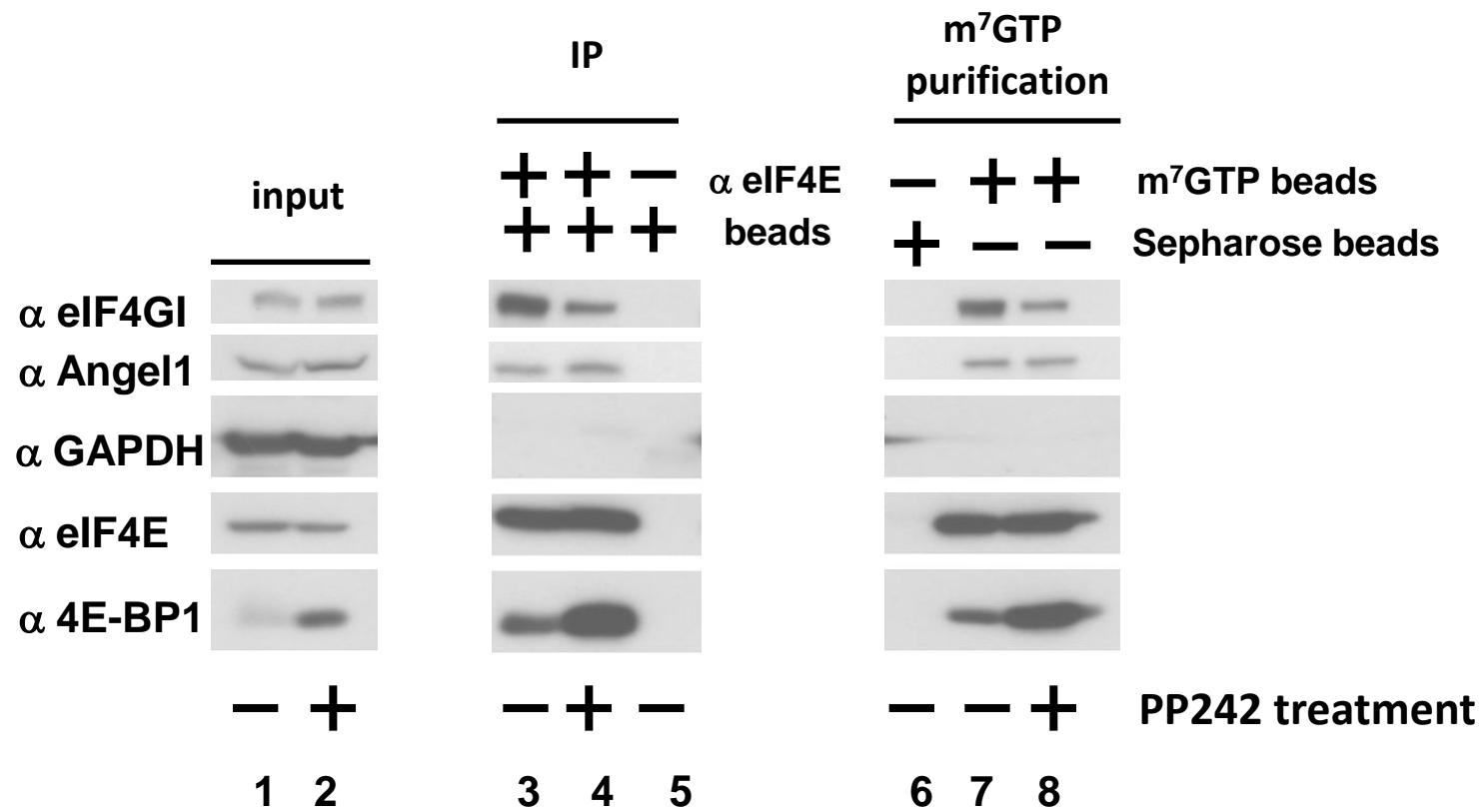
B

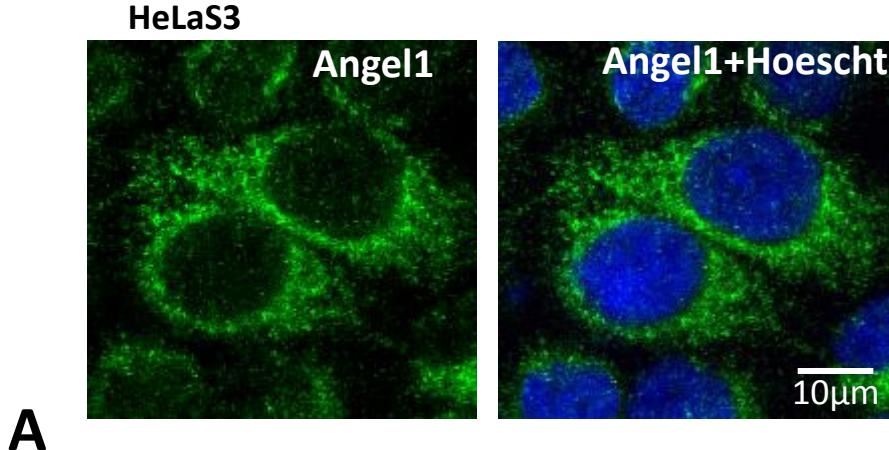
hNocturnin	EEP	431aa
hCcr4a	EEP	557aa
hCcr4b	EEP	549aa
hAngel1	EEP	670aa

YxxxxLΦ

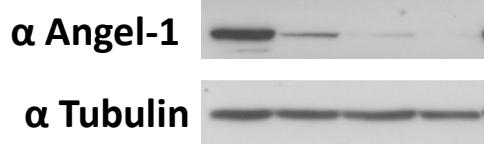
C



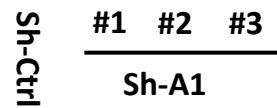




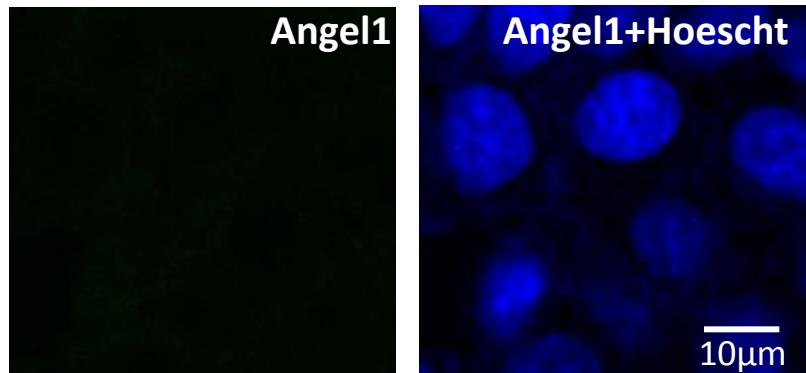
A



B

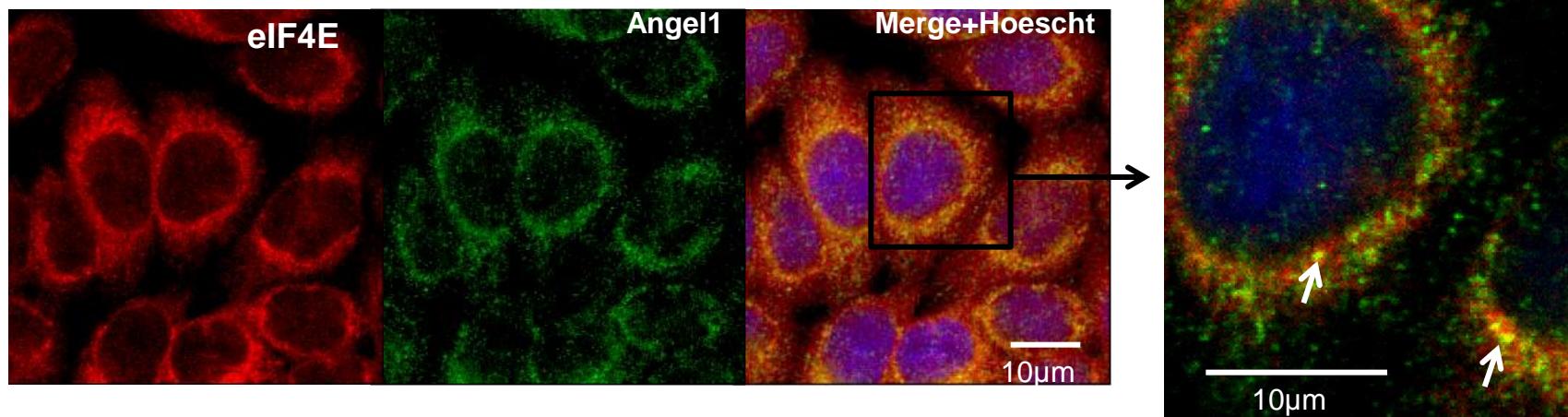


HeLaS3 sh-A1#2

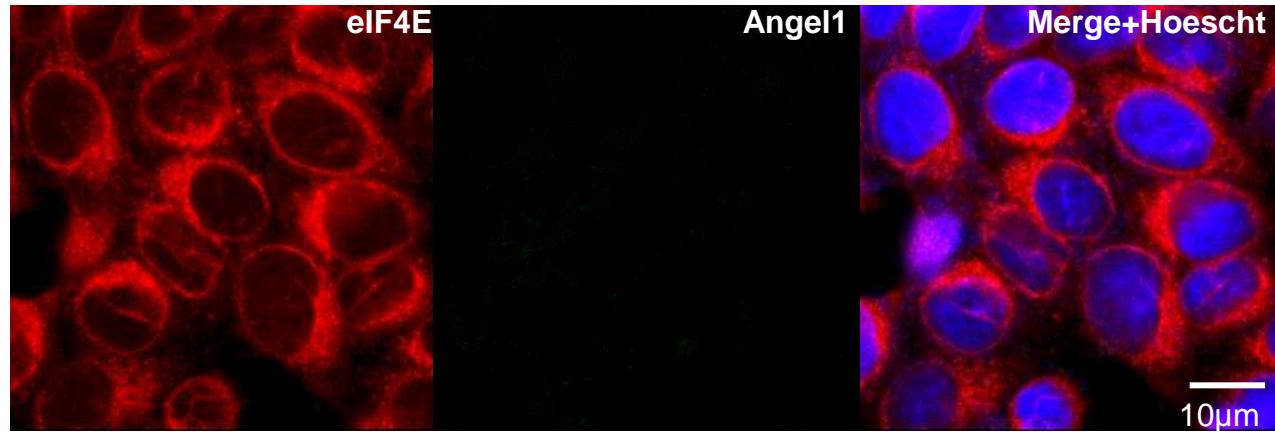


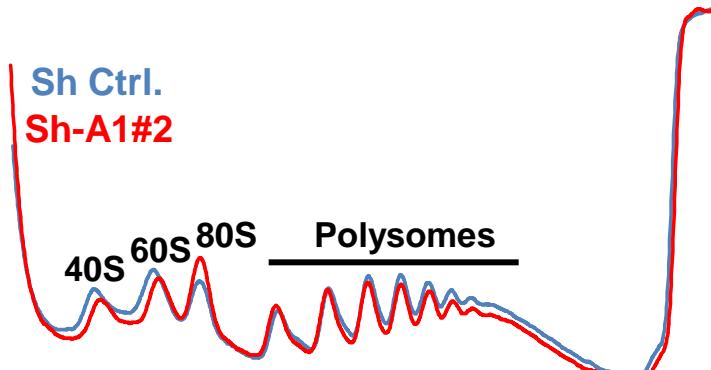
C

HeLaS3

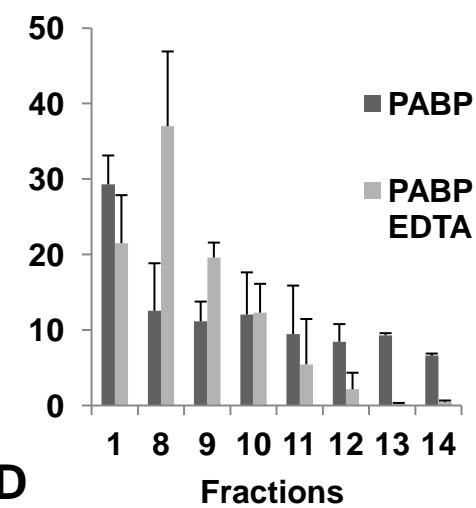
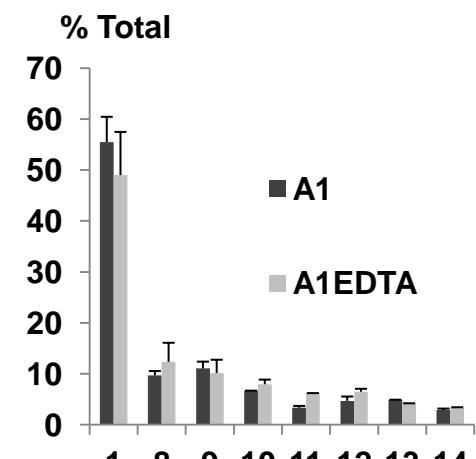
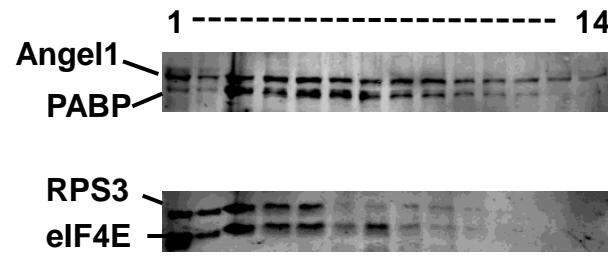
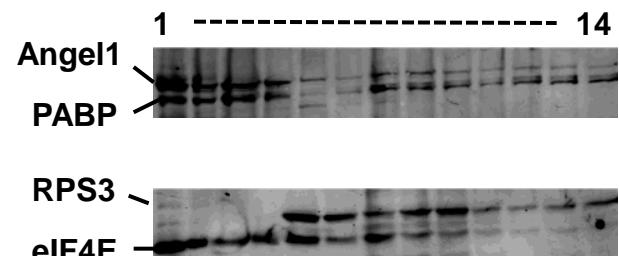
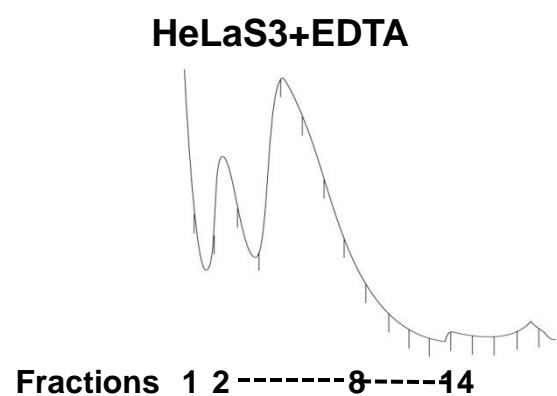
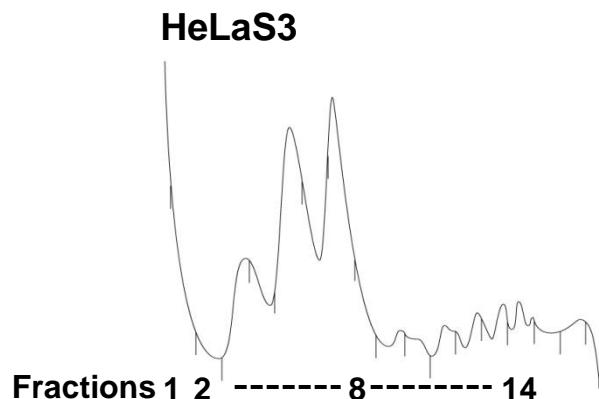


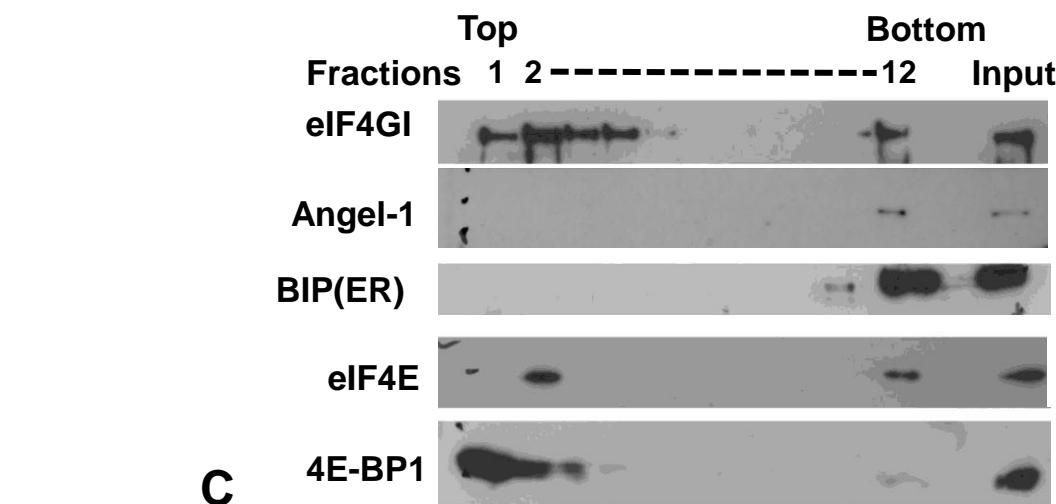
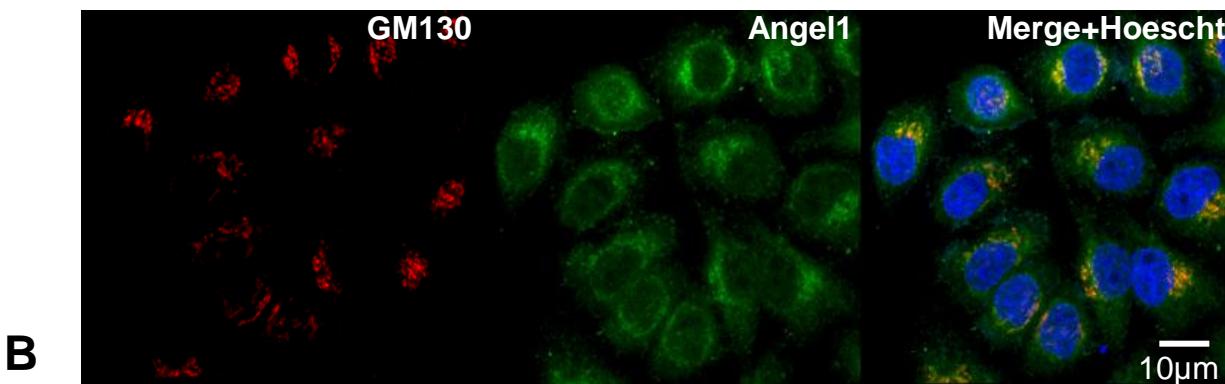
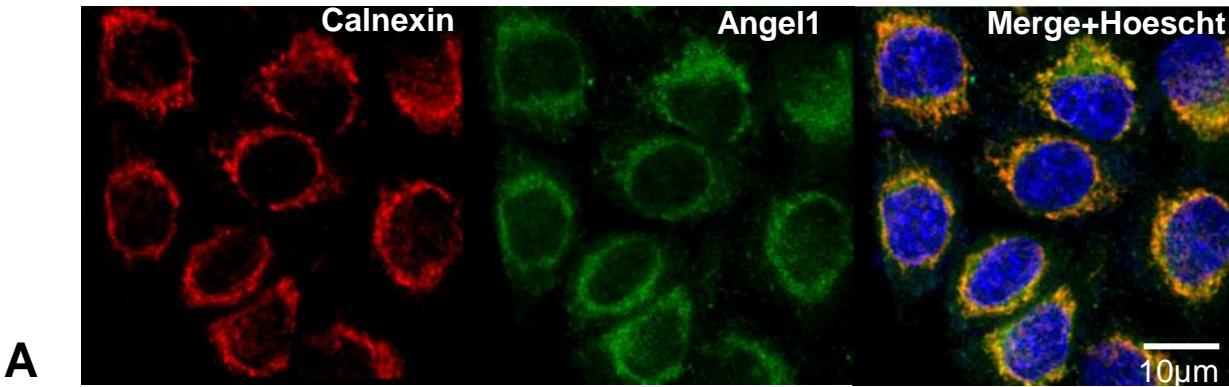
HeLaS3 sh-A1#2





A





Protein name	elf4E binding motif test
BTB/POZ domain containing protein 9	-
Virus coat protein	-
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	ND
Cellular retinaldehyde-binding protein-like	ND
Tumor suppressor candidate 4/NPRL2/G21	-
-Hypothetical protein KIAA0355	-
Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1E subunit	-
Activated T-cell marker CD109	ND
KCCR13L	ND
ARP10	ND
SLC39A14	ND
myosin heavy chain	ND
Reticulocalbin 2	ND
Angel homolog 1	+
elf4G I	+
elf4G II	ND
4E-BP1	+
4E-BP2	ND
4E-BP3	ND

Supplementary Figure 1: Table of the 19 groups of proteins selected to contain an elf4E-binding motif after the in silico screening. Result of the biochemical test to validate the interaction of these motifs with elf4E is given in the right column.



Supplementary Figure 2: Angel's family history, an extra exon containing the eIF4E binding site appears during evolution.

Gene exon/intron organization was analyzed using GECA¹ a Perl pipeline which align exon/intron structures (MAFFT²) and detect common introns and similarities between sequences (CIWOG³). Common introns are represented with the same color. Exons (in black) are up to scale while Introns are of fixed size, gaps are in grey. The extra exon containing the eIF4E binding site is framed in red.

1. Fawal N, Savelli B, Dunand C and Mathé C: **GECA: a fast tool for Gene Evolution and Conservation Analysis in eukaryotic protein families.** Bioinformatics (2012) 28 (10): 1398-1399.
2. Katoh, Misawa, Kuma, Miyata: **MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform.** Nucleic Acids Res. (2002) 30:3059-3066
3. Wilkerson, MD et al: **Common introns within orthologous genes: software and application to plants.** Briefings in Bioinformatics (2009), 10(6), 631-644.

B. Caractérisation fonctionnelle d'Angel1

Dans le paragraphe ci-dessous seront introduites les caractéristiques générales des CCR4, les quelques données disponibles dans la littérature sur Angel1 et les résultats préliminaires obtenus sur la caractérisation fonctionnelle d'Angel1. Cette partie va permettre de situer le contexte dans lequel évolue Angel1 et d'introduire des pistes de discussion quant au rôle physiologique de la liaison entre eIF4E et Angel1.

Caractéristiques de la famille des CCR4

Le facteur "Carbon Catabolite Repressor 4" a été découvert chez la levure (*yCCR4*), où il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance non fermentaire (Denis, 1984), l'intégrité de la paroi (Liu et al., 1997), la sensibilité aux UV (Schild, 1995) ou encore la synthèse de méthionine (McKenzie et al., 1993). *yCCR4* possède trois domaines importants pour ces fonctions biologiques :

- le domaine C-terminal, capable de fixer le Mg^{2+} , qui est caractéristique de la super famille des phosphohydrolases dépendantes du Mg^{2+} (Dlakic, 2000; Hofmann et al., 2000) ,
- le domaine central riche en répétition de leucines (LRR), essentiel aux CCR4 pour interagir avec des composants du complexe CCR4-NOT comme POP2 (une famille de nucléase),
- le domaine N-terminal, riche en glutamines et en asparagines, qui contient un domaine d'activation pouvant interagir avec la machinerie de transcription (Draper et al., 1994).

Chez les eucaryotes supérieurs, 19 protéines *yCCR4*-like ont été identifiées et classées en 4 familles (Dupressoir et al., 2001):

- ✓ 1 famille d'orthologues:

-Les orthologues de CCR4, qui ont conservé le domaine LRR et le motif catalytique responsable de l'activité endonuclease-like, que l'on retrouve chez tous les eucaryotes. Chez les mammifères, il en existe deux : CCR4a et CCR4b (Figure 23, Table 4).

- ✓ Et 3 familles de paralogues:

- La famille Nocturnin, nommée ainsi car elle contient les protéines homologues à la protéine Nocturnin, identifiée chez le Xénope (Green and Besharse, 1996). Ces protéines présentent un domaine C-terminal similaire à celui de *yCCR4* (24-27% de similarité) mais possèdent un domaine N-terminal assez différent.

- La famille 3635, qui correspond à une protéine de fonction inconnue retrouvée chez *C.elegans*, *D.melanogaster*, et *H.sapiens*. Ces protéines ont un domaine très conservé au niveau de la région C-terminal (25 à 29% de similarité avec yCCR4) mais diffèrent au niveau de la région N-Terminale.

- La famille Angel, appelée ainsi car elle contient le produit du gène *angel* identifié chez la drosophile par Angelika Zengerle (Kurzik-Dumke and Zengerle, 1996). Des orthologues d'Angel sont présents chez tous les eucaryotes. Là encore, la région C-terminale est assez conservée (25 à 33% de similarité avec yCCR4) mais le domaine N-terminal est très différent, suggérant que ces protéines n'ont pas conservé de fonction potentielle touchant la machinerie de transcription. Les protéines Angel ne présentent pas non plus de domaine LRR. Chez les vertébrés, il existe deux gènes issus de la duplication du gène ancestral *angel*, codant respectivement pour Angel1 et Angel2 (Figure 23, Table 4). Le motif de liaison à eIF4E ne se retrouve que dans la séquence d'Angel1 (Gosselin et al., en préparation), probablement acquis et intégré au moment de la duplication du gène *angel*.



Figure 23 : Représentation schématique des homologues CCR4a, CCR4b, Angel1 et Angel2 humains.(adapté de (Wagner et al., 2007)

Chaque homologue possède un domaine nucléase conservé (en gris) caractéristique des Endo/Exonuclease Phosphatase ou phosphohydrolase dont l'activité est dépendante du Mg^{2+} . CCR4a et CCR4b présentent en N-terminal une séquence riche en répétition de leucine (LRR), conservée dans yCCR4. Les nombres indiquent le nombre d'acides aminés que contient la protéine. Le motif bleu dans la séquence d'Angel1 représente le domaine putatif de liaison à eIF4E détecté par notre criblage.

Activité phosphohydrolase

Des études bio-informatiques ont montré que la région C-terminale des protéines apparentées aux CCR4 comporte de fortes homologies avec les endonucléases apuriniques (APE) (Chen et al, 2002) (Figure 23), comme l'exonuclease III chez E.Coli, APE1 chez l'homme, ou APN2 chez la levure. Ces enzymes font partie de la super famille des EEP (endo/exonuclease phosphatase), qui contient aussi bien les CCR4, les endonucléases AP, des phosphatases inositol (INPP5), des spingomyélinases, etc... Les EEP ont un site catalytique contenant les résidus acide aspartique et histidine qui permettent de fixer le magnésium (Mg^{2+}) et partagent le même mécanisme catalytique qui consiste à cliver les ponts phosphodiester. Leurs substrats vont donc des acides nucléiques aux phospholipides; l'hypothèse que les EEP puissent même déphosphoryler les protéines a été avancée par Dlakic (Dlakic, 2000).

Alors que l'activité déadénylase des CCR4a, CCR4b, et Nocturnin a clairement été mise en évidence (Chen et al., 2002) (Baggs and Green, 2003), aucune activité n'a été observée pour Angel (drosophile), Angel1 ou Angel2 (humain) *in vitro* ou *in vivo* (Wagner et al., 2007; Temme et al., 2010). Cependant, il a été montré chez la levure que les orthologues d'Angel Ngl2 et Ngl3 présentent une activité nucléase 3'-5' (Faber et al., 2002; Feddersen et al., 2012) (Table 4). Du fait de la grande conservation du site catalytique entre les différents orthologues d'Angel, il semble fort probable que la protéine Angel1 puisse présenter une activité phosphohydrolase, même si celle-ci n'a pas encore été démontrée.

Le rôle des CCR4

D'abord associée à des complexes impliqués dans la transcription (Draper et al., 1994), yCCR4 a ensuite été identifiée comme composant majeur des neuf sous-unités du complexe de déadénylation CCR4-NOT (Figure 24a), requis pour la dégradation spécifique de la queue poly(A) des ARNm (Daugeron et al., 2001).

Famille	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Act.	Domaines	Fonctions biologiques	Références
CCR4	yCCR4	CCR4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6/ CCR4a	Sc,Dm,Mm, Hs	EEP,LRR	DNA damage, cycle cell.(Sc), réplication, NMD (Mm)	(Westmoreland et al., 2004; Yamashita et al., 2005; Garnneau et al., 2007; Morita et al., 2007)
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L/ CCR4b	Mm,Hs	EEP,LRR	Prolifération cellulaire (Mm)	Morita, Suzuki et al. 2007
Nocturnin		NOC	NOC	NOC	NOC/ CCR4- like	hCCR4c	Xl,Mm Hs	EEP	Cycle circadien (Xl, Mm) Homeostasie (Mm)	((Green and Besharse, 1996; Green et al., 2007)
ANGEL	Ngl1	Angel	Angel	Angel1	Angel1	Angel1 hCCR4e	ND	EEP		(Dupressoir et al., 2001; Faber et al., 2002; Feddersen et al., 2012)
	Ngl2		Angel2	Angel2	Angel2 hCCR4d	Sc	EEP	5,8 SrRNA processing (Sc)	Faber, Van Dijk et al. 2002;	
	Ngl3					Sc	EEP		Feddersen, Dedic et al. 2012	

Table 4 : Tableau récapitulatif des CCR4 et de leurs orthologues au sein des différentes espèces (adapté de (Goldstrohm and Wickens, 2008)).

*Lorsque plusieurs noms sont donnés à un même orthologue, ils sont notés dans une même case. Les espèces dans lesquelles une activité phosphohydrolase (Act.) pour la protéine a été montrée sont reportées dans la case active. Les domaines conservés dans la séquence des protéines sont donnés dans la case domaine (LRR : leucine-rich repeats; EEP : endonuclease-exonuclease-phosphatase). Sc (*Saccharomyces cerevisiae*), Ce (*Caenorhabditis elegans*), Dm (*Drosophila melanogaster*), Xl (*Xenopus laevis*), Mm (*Mus musculus*), Hs (*Homo sapiens*).*

De nombreuses fonctions cellulaires ont été attribuées au complexe CCR4-NOT chez la levure et chez les autres eucaryotes (Table 4). Il a été montré comme principal responsable de la déadénylation des ARNm chez la drosophile (Temme et al., 2004; Temme et al., 2010) ou encore chez l'homme (Schwede et al., 2008). Ce complexe contribue de façon essentielle au métabolisme des ARNm, en catalysant l'étape initiale et limitante pour la dégradation des ARNm. Il est impliqué au niveau de nombreux processus de régulation des gènes, comme la

dégradation des ARNm, l'export des ARNm ou la répression de la traduction, notamment celle exercée par les miR (revue (Miller and Reese, 2012)).

Il est très difficile à l'heure actuelle d'avoir une image claire du rôle de CCR4-NOT du fait de sa multifonctionnalité. Le rôle des CCR4, au-delà de leur capacité à déadénérer les ARNm, est dépendant des partenaires avec lesquels elles s'associent. En effet, les CCR4 sont souvent associées avec de multiples sous-unités comme les protéines NOT et CAF (Figure 24) pour former le complexe CCR4-NOT.

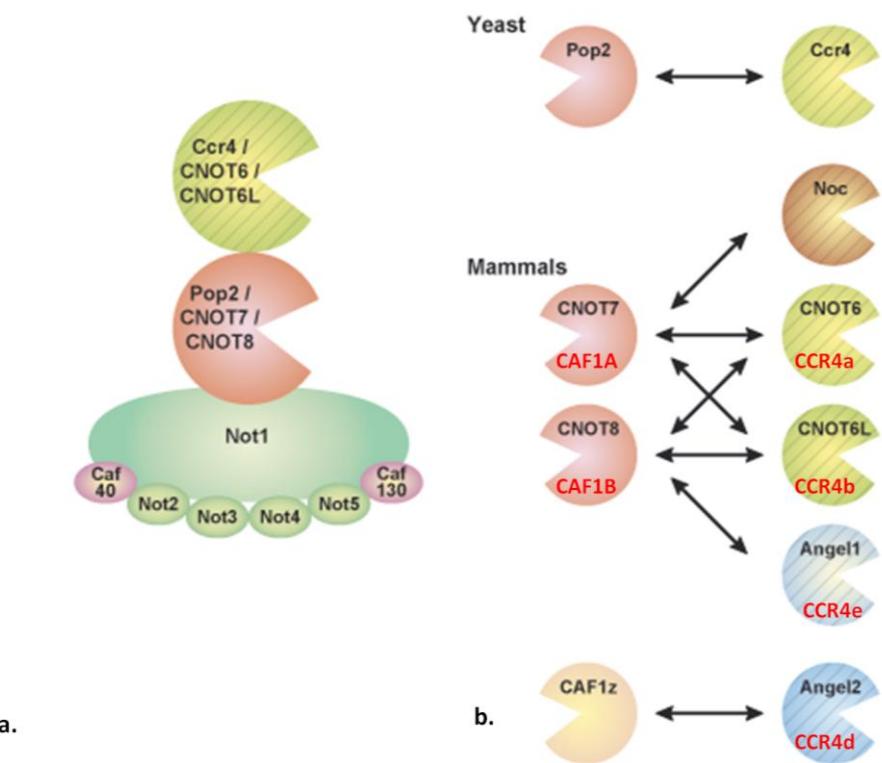


Figure 24 : Complexes formés par les CCR4 et autres déadénylases chez la levure et chez les mammifères (adapté de la figure supplémentaire 2 (Goldstrohm and Wickens, 2008)).

a. Représentation schématique du complexe de déadenylation CCR4-NOT (ou CCR4-POP2-NOT) retrouvé chez la levure et les mammifères. Certaines CCR4 et POP2 interagissent sélectivement avec le complexe NOT (Morita et al., 2007; Wagner et al., 2007). **b.** Les orthologues des CCR4 et POP2 chez les mammifères forment des hétérodimères (Wagner, Clement et al. 2007). Les interactions sont indiquées par les flèches. D'autres appellations utilisées pour les protéines sont indiquées en rouge.

Contrairement aux protéines CCR4a, CRR4b et la Nocturnin, le rôle des protéines Angel reste encore complètement inconnu (Table 4). Wagner et al. ont montré qu'Angel1 et Angel2 humains n'interagissent pas avec les protéines NOT généralement retrouvées dans le complexe, mais qu'Angel1 interagit avec CNOT8 (désigné également par hPOP2p, CAF1B, CALIF) (Wagner et al., 2007), une déadénylase capable d'inhiber la traduction (Cooke et al., 2010) et souvent recrutée en 3' des ARNm par les protéines PUF (Goldstrohm et al., 2006) (Figure 24). CNOT8, avec eIF4E, sont à l'heure actuelle les seuls partenaires connus d'Angel1 mais les caractéristiques fonctionnelles de cette interaction n'ont encore jamais été étudiées. La protéine Angel1 se présente donc comme une protéine orpheline, dont le rôle et la fonction dans la cellule sont complètement inconnus.

Pour caractériser l'activité fonctionnelle d'Angel1, nous nous sommes concentrés sur deux aspects. Dans un premier temps, nous avons étudié la fonction putative d'Angel1 en tant que déadénylase, du fait de son appartenance à la famille des CCR4. Dans un deuxième temps, suite aux résultats obtenus dans Gosselin et al. (en préparation), nous avons évalué le rôle d'Angel1 sur la traduction dans un système de traduction *in vitro*. Les résultats obtenus sont des résultats préliminaires qui permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la suite de ce travail.

Matériel et méthodes

Construction—Les constructions utilisées ont été détaillées dans Gosselin et al.(en préparation). La construction codant pour le mutant d'activité nucléase a été obtenue à partir d'une mutagénèse dirigée en utilisant le kit Quick-changeTMsite-directed mutagenesis kit (Stratagene) avec les amorces suivantes:

Glu_{298-Ala}F:AGATCAGAGAGACGCAAGGCTGGCCGAGACTTCCTGCTACG;
Glu_{298-Ala}R:CGTAGCAGGAAGTCTGGCCAGCCTGCGTCTCTGATCT;

Purification des protéines recombinantes— Les protéines GST, GST-A1-WT, GST-A1Nuc- et GST-Noc (Nocturnin) (construction fournie par C.B. Green) ont été produites dans E.Coli (Rosetta (BL21), Novagen) et purifiées sur une colonne de glutathione sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) selon le protocole publié dans Baggs et al. (Baggs and Green, 2003). Les protéines purifiées ont été analysées sur gel SDS polyacrylamide 10% et quantifiées après coloration au bleu de coomassie.

Test d'interaction sur colonne coiffe— Cette expérience a été décrite dans Gosselin et al.(en préparation). Brièvement, les protéines GST recombinantes sont incubées avec des extraits

cellulaires de cellules Hela sur une colonne m⁷GTP. Les protéines accrochées à la colonne sont révélées par Western Blot.

Test de déadénylation in vitro— Les protéines recombinantes GST, GST-A1,GST-A1-Nuc⁻ sont incubées 15 min (ou plus si indiqué) à 37°C dans le tampon de réaction RE (50 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM dithithreitol, pH 7.4) avec 1μl de RNase inhibitor (Ambion, 20 u/μL) et 0,2μM d'ARN (5'-UCUAAUAAAAAAAAAAAAAA-3') étiqueté en 5' avec une fluorescéine isothiocyanate (Eurogentec). Le volume total de la réaction est ajusté à 10μl. 5μl de tampon formamide (95% formamide, 10 mM EDTA et bleu de bromophénol) sont ajoutés pour arrêter la réaction et les échantillons sont ensuite chauffés à 85°C pendant 5 min. Les réactions sont ensuite analysées sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 25%, 7M urée et sont révélées par un appareil qui détecte la fluorescence (Typhoon).

Test de traduction in vitro— Les protéines recombinantes GST, GST-A1,GST-A1-Nuc⁻ sont dialysées dans le tampon LOPO (50 mM HEPES pH 7.2, 40 mM NaCl, 106 mM potassium gluconate, 263 mM glycerol, 300 mM glycine, 10 mM EGTA, 7.3 mM CaCl₂, 0.52 mM MgCl₂, 80 mM β-glycerophosphate) et quantifiées sur gel d'électrophorèse coloré au bleu de coomassie. Les protéines sont ensuite amenées à la même concentration par dilution dans du tampon LOPO. Un volume équivalent de protéines ou de tampon est ajouté au lysat de réticulocytes de lapin préparé au préalable avec les mix d'acides aminés (Ambion). Les protéines et le lysat sont incubés 5 min à 30°C. 5 fmol d'ARN rapporteur codant pour la luciférase sont ensuite ajoutés au mix, ce qui est considéré comme le début de la réaction. La réaction s'effectue pendant 1h à 30°C. L'ARNm a été obtenu après transcription *in vitro* du plasmide pGb-Eg2-410Δ2-hxG-A65 linéarisé avec EcoRV. Après une heure d'incubation à 30°C, la réaction est stoppée, la fluorescence est révélée en utilisant le kit Renilla luciferase Assay (Promega) et lire sur l'appareil TriStar LB 941 de Berthold Technologies.

Résultats préliminaires

Caractérisation de l'activité déadénylase d'Angel1

Les protéines de la superfamille des EEP ont un site actif pouvant fixer le Mg²⁺ très conservé. L'alignement de la séquence d'Angel1 avec les séquences d'autres EEP montre de nombreux domaines conservés, notamment un site potentiel de liaison au magnésium qui est responsable de l'activité phosphohydrolase des EEP (Barzilay et al., 1995; Dlakic, 2000; Dupressoir et al., 2001). Dans un premier temps, nous avons testé l'activité phosphohydrolase potentielle d'Angel1 sur un messager polyadénylé *in vitro*. Différentes quantités de la protéine recombinante Angel1 produite en bactérie sont incubées avec un ARNm polyadénylé à 37°C pendant 30 minutes. À partir de 300ng de protéine ajoutée (1μl), une bande correspondant à la taille de l'ARNm déadénylé apparaît, ce qui n'est pas observé avec la protéine contrôle GST

(Figure 25a). Ces résultats préliminaires suggèrent qu'Angel1 est capable de déadénérer *in vitro* un ARNm. Après ajout d'EDTA, un chélateur de cations divalents, la dégradation observée précédemment n'est plus visible, suggérant que l'activité d'Angel1 se fait de façon Mg^{2+} -dépendante.

Afin d'évaluer plus précisément si la liaison au magnésium est requise pour l'activité d'Angel1, une mutation ponctuelle a été réalisée au niveau du site putatif de liaison au Mg^{2+} (la glutamine en position 298 est remplacée par une alanine). Pour la Nocturnin, une mutation ponctuelle dans le résidu analogue à ce site putatif permet d'éteindre presque complètement l'activité déadénylase de cette dernière (Baggs and Green, 2003), ce qui est également le cas pour d'autres nucléases (Barzilay et al., 1995). L'ARN polyadénylé incubé avec le mutant d'Angel1 (A1nuc-) présente le même profil de dégradation qu'avec la protéine WT (Figure 25a, panneau de droite), suggérant que le site putatif de fixation du Mg^{2+} n'est pas responsable ou n'est pas le seul site nécessaire à l'activité déadénylase de la protéine. Une autre possibilité pourrait être qu'il existe une activité nucléase contaminante qui copurifie avec Angel1.

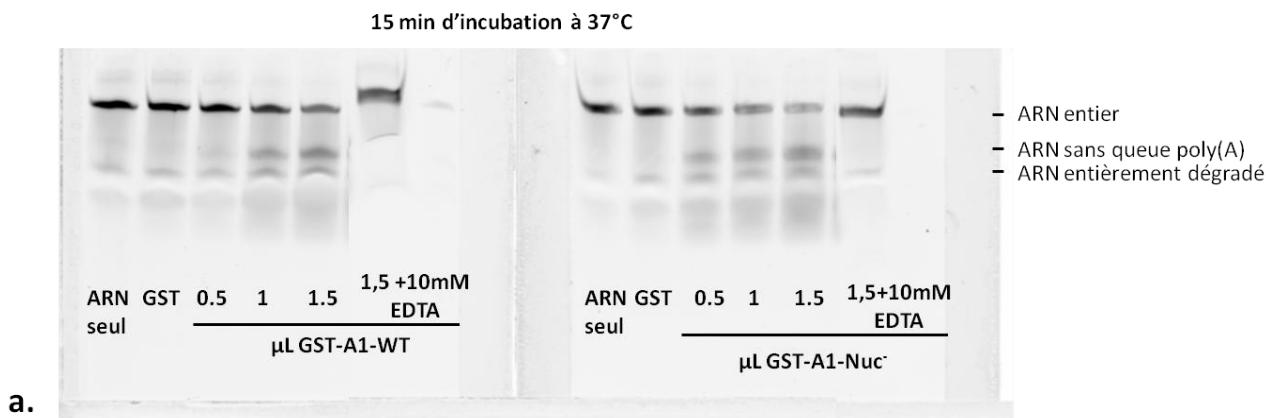


Figure 25 : Caractérisation de l'activité déadénylase d'Angel1

a. *Test de l'activité nucléase d'Angel1 et de son mutant Angel1-Nuc- sur un ARNm de type 5'-UCUAAUAAAAAAAAAAAAAAA-3' étiqueté en 5' avec une fluorescéine isothiocyanate (Eurogentec). Les protéines GST recombinantes ont été mises à la concentration 300ng/μl et 0.5, 1, ou 1.5μl de protéines ont été utilisés pour la réaction. Pour le contrôle négatif GST, 1.5μl de protéine a été utilisé. Pour tester si la réaction est dépendante du Mg^{2+} , 10mM d'EDTA a été rajouté au milieu réactionnel. La réaction a été testée à 37°C pendant 30min. Les réactions sont analysées sur gel de polyacrylamide 25%, 7M urée. La taille de l'ARNm sans queue poly(A) a été déterminée par digestion de l'ARNm associé à un oligod(T) par la RNaseH (non montré ici).*

Effet d'Angel1 et de ses mutants sur la traduction *in vitro*

Dans l'article précédent (Gosselin et al., en préparation), nous avons montré qu'Angel1 interagit avec eIF4E et perturbe l'association entre eIF4E et eIF4G *in vitro*. Pour évaluer le rôle d'Angel1 dans le contrôle de la synthèse protéique, les protéines recombinantes GST Angel1 et ses mutants A1YA (muté dans le site de liaison à eIF4E) et A1Nuc- (muté dans le site putatif de fixation du Mg²⁺) ont été ajoutées dans un système de traduction *in vitro*.

L'ajout des différentes protéines recombinantes GST-A1 et ses mutants ne montrent pas de différences significatives au niveau de l'effet sur la synthèse protéique (Figure 26a). L'activité luciférase en présence des protéines Angel1 baisse de 20 à 30% par rapport à ce qui est observé lorsque l'on ajoute la protéine GST seule mais ne présente pas de différence significative lorsque l'on ajoute seulement du tampon (TP) (Figure 26a). Pour vérifier la capacité des protéines recombinantes à se lier à eIF4E, les protéines ont été ajoutées séparément à de l'extrait de cellules Hela puis incubées avec des billes m⁷GTP. La figure 26b montre que les protéines GST-A1 et GST-A1Nuc- sont retenues sur la colonne coiffe tandis que les protéines GST et le mutant de liaison à eIF4E GST-A1YA le sont beaucoup moins.

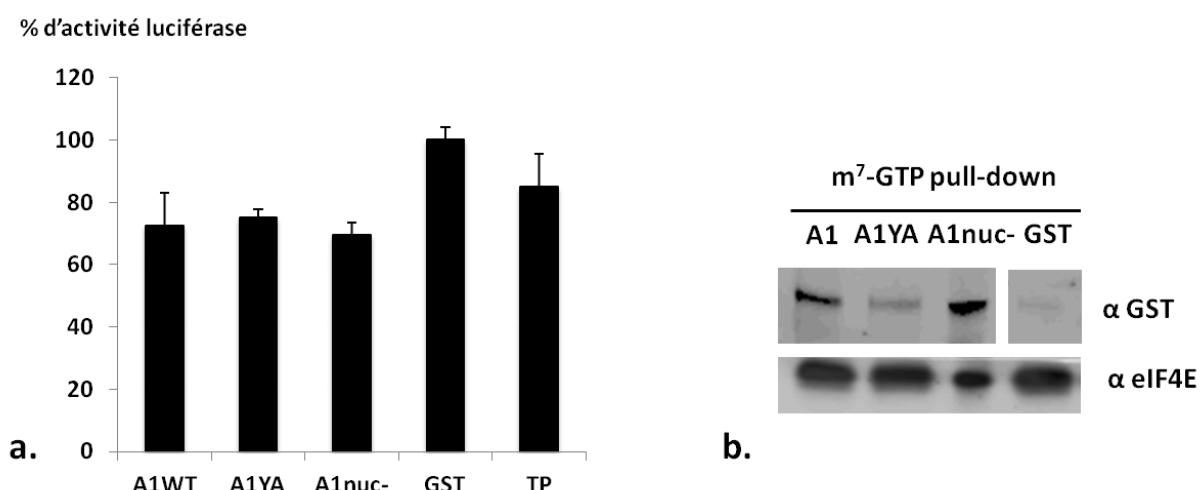


Figure 26 : Test de traduction *in vitro* en présence des protéines recombinantes GST-Angel1

a. Les protéines recombinantes GST-A1WT, GST-A1YA, GST-A1Nuc-, GST ont été produites comme décrit dans le matériel et méthode. La production de l'ARNm coiffé et polyadénylé a été décrite dans Oulhen et al, 2009. 5fmol d'ARNm rapporteur sont incubés dans du lysat de réticulocytes de lapin (ambion) avec 500ng de protéines recombinantes. Un volume équivalent de tampon LOPO est ajouté dans le système de traduction *in vitro* (voir matériel et méthodes). L'activité de la luciférase est lue après une heure d'incubation à 37°C et est

reportée sur l'axe des ordonnées en % d'activité. L'activité mesurée avec la protéine contrôle GST est arbitrairement mise à 100%. Les barres d'erreurs représentent les déviations des dupliques. **b.** Les protéines recombinantes GST-A1 et ses mutants sont incubés indépendamment dans un extrait de cellules Hela avec des billes m^7GTP . Les protéines retenues sur la colonne coiffe sont révélées par Western Blot.

Ces résultats montrent que les protéines recombinantes A1 et A1Nuc- sont capables de se lier à eIF4E contrairement au mutant GST-A1YA. Cette différence de capacité à lier eIF4E n'est pas visible sur l'activité de traduction en lysat de réticulocytes. Différentes concentrations de protéines ont été testées en lysat de réticulocytes et n'ont pas montré d'effet significatif sur la traduction, ce qui est surprenant du fait qu'A1WT et A1Nuc- sont capables de lier *in vitro* eIF4E et qu'elles ont montré une activité de dégradation sur un ARNm coiffé polyadénylé (Figure 25).

Discussion

La découverte d'Angel1 comme nouveau partenaire d'eIF4E (Gosselin et al., en préparation) amène un niveau de réflexion supplémentaire concernant la régulation spécifique d'eIF4E. Dans l'introduction de ce travail de thèse, nous avions abordé les différents rôles des 4E-IPs décrits jusqu'à maintenant, régulant les fonctions d'eIF4E à trois niveaux : l'initiation de la traduction, l'export des ARNm, et le stockage des ARNm dans les P-bodies ou les granules de stress. La découverte d'un membre de la famille des CCR4 comme nouvelle 4E-IP ouvre une multitude de possibilités quant à la régulation d'eIF4E. En effet, les CCR4 sont connues pour être impliquées dans de nombreux mécanismes tels que la dégradation des ARNm, l'export des ARNm ou la répression de la traduction, notamment celle exercée par les miR (revue (Miller and Reese, 2012)). Nous avons dans un premier temps essayé d'évaluer les propriétés fonctionnelles d'Angel1 en se concentrant sur les deux domaines fonctionnels de la protéine : le site putatif de fixation de Mg^{2+} , caractéristique des protéines présentant une activité phosphohydrolase dont les CCR4, et le site de liaison à eIF4E démontré fonctionnel dans Gosselin et al. (en préparation).

Les tests préliminaires de déadénylation *in vitro* menés sur un ARNm polyadénylé avec la protéine recombinante Angel1 produite en bactérie, ne permettent pas de déterminer si l'activité nucléase observée provient d'une contamination par une nucléase bactérienne co-purifiant avec Angel1. En effet, la dégradation de l'ARNm se fait indépendamment de la

présence ou non du site de fixation du Mg^{2+} putatif. De plus, dans des expériences préliminaires, ces protéines recombinantes ne montrent pas d'effet particulier sur la traduction en lysat de réticulocytes par rapport au tampon, suggérant qu'elles sont incapables de dégrader l'ARNm dans ces conditions. Une première solution consisterait à améliorer les étapes de purification des protéines recombinantes, en ajoutant une étape de filtration sur gel par exemple pour éliminer le maximum de contaminants bactériens. Sachant que la production de protéines en système bactérien n'apporte pas les modifications post traductionnelles qui peuvent être nécessaires à la protéine pour acquérir sa conformation tridimensionnelle et son activité, la production et la purification d'Angel1 en cellules eucaryotes devra être envisagée. Jusqu'alors, aucune étude n'a pu mettre en évidence une quelconque activité pour les protéines Angel (droso), Angel1 et Angel2 (humain) *in vitro* ou *in vivo* (Wagner et al., 2007; Temme et al., 2010). Même si Angel1 ne possède peut-être pas d'activité phosphohydrolase intrinsèque, elle peut en recruter. En effet, Wagner et al. ont montré qu'Angel1 interagit avec CNOT8 dans des cellules de mammifères (Wagner et al., 2007). CNOT8 est connue pour présenter une activité déadénylase mais aussi pour inhiber la traduction indépendamment de son activité déadénylase (Cooke et al., 2010). Caractériser l'interaction entre Angel1 et CNOT8, analyser les complexes Angel1-CNOT8 dans la cellule et tester l'activité déadénylase de ces complexes seront des étapes importantes pour évaluer la capacité d'Angel1 à participer au métabolisme des ARNm dans la cellule.

En ce qui concerne le site fonctionnel de liaison à eIF4E YXXXXLΦ, une mutation dans le Y en alanine suffit à diminuer fortement la liaison de la protéine recombinante GST-A1YA à eIF4E mais ne montre aucun effet sur la traduction en lysat de réticulocytes (RLL) traité à la nucléase. Ces expériences préliminaires suggèrent que les conditions utilisées dans ce lysat de réticulocytes ne permettent pas d'observer un rôle quelconque de la protéine recombinante Angel1 et de ses variants sur la traduction, alors que ces derniers présentent une capacité différente à interagir avec eIF4E. Afin d'élargir le champ d'investigation pour découvrir le rôle d'Angel1, différents types d'ARNm rapporteurs, portant une coiffe ou une séquence IRES, devront être testés pour créer de manière artificielle des conditions sélectives pour la traduction dépendante de la coiffe. L'utilisation de lysat de réticulocytes non traité à la nucléase se présente également comme une option intéressante pour investiguer le rôle d'Angel1 sur la traduction. Ce lysat favorise la synergie entre la coiffe et la queue poly(A) de l'ARNm rapporteur du fait de la compétition avec les autres ARNm présents dans le lysat. Il limite de ce fait la traduction non spécifique indépendante de la coiffe que l'on observe dans

un RLL traité (Soto Rifo et al., 2007), et rend la traduction plus sensible à la disponibilité d'eIF4E.

La technique de tethering est actuellement en cours de mise au point dans notre laboratoire. Cette technique présente l'avantage de produire la protéine d'intérêt taguée dans une cellule eucaryote, permettant à la fois les modifications post-traductionnelles de la protéine, mais aussi la possibilité d'interagir avec des partenaires endogènes. Le tag adresse spécifiquement la protéine en 5' ou en 3' UTR d'un ARNm rapporteur. La traduction de cet ARNm est ensuite analysée, ce qui apporte des informations sur la capacité de la protéine à dégrader un ARNm mais aussi sur sa capacité à moduler la traduction coiffe-dépendante.

D'autres expériences préliminaires visant à bloquer l'import d'eIF4E dans le noyau avec la leptomycin B (Dostie et al., 2000a) ou l'export des ARNm par le blocage de la transcription avec l'actinomycin D ne montrent pas de changement au niveau de la localisation d'Angel1 (résultats non montrés). La protéine Angel1 ne colocalise pas non plus avec la protéine DCP1, souvent utilisée comme marqueur de P-bodies (résultats non montrés). Ces résultats préliminaires suggèrent qu'Angel1 n'est pas impliqué dans l'export des ARNm comme peuvent l'être les 4E-IPs PML, HOXA9, ou encore LRPPRC, ni dans l'import d'eIF4E dans le noyau, comme 4E-T. Angel1 ne se localise pas dans les P-bodies, comme certaines CCR4 et d'autres 4E-IPs telles que DDX3 ou Gemin5, suggérant qu'elle n'est pas impliquée dans le *turnover* des ARNm qui a lieu au niveau de ces structures (Sheth and Parker, 2003). L'ensemble de nos données ouvrent de nombreuses perspectives pour la compréhension du rôle d'Angel1 en tant que partenaire d'eIF4E mais aussi en tant que potentielle CCR4. Ce travail apporte également un regard nouveau sur l'aspect de la régulation d'eIF4E par les 4E-IPs et sur la mise en place de ces différents niveaux de régulations, ce qui sera abordé dans la discussion générale ci-après.

DISCUSSION et Perspectives

La régulation d'eIF4E par ses partenaires joue un rôle crucial dans le contrôle de l'expression des gènes. L'objectif de ce travail de thèse a été d'une part d'explorer les mécanismes structuraux qui régulent les associations entre eIF4E et ses partenaires au cours de l'initiation de la traduction. D'autre part, ce travail a apporté de nouvelles données sur l'aspect fonctionnel de la régulation spécifique d'eIF4E par la découverte d'un nouvel acteur.

Au cours de l'évolution, les niveaux d'organisation de la formation du complexe eIF4F se sont diversifiés par l'apparition d'acteurs de plus en plus nombreux pouvant participer à la formation du complexe eIF4F, comme les différentes isoformes d'eIF4E. eIF4E est depuis longtemps considéré comme un facteur majeur dans l'étape d'initiation de la traduction, mais son rôle au niveau de l'export nucléaire de certains ARNm, de la stabilité des messagers et sa présence au niveau de différents corps cytoplasmiques impliqués dans le remodelage des mRNP suggèrent qu'il est suffisamment versatile pour utiliser sa capacité à lier la coiffe des ARNm dans différents processus cellulaires (voir introduction). De nombreux isoformes d'eIF4E (jusqu'à huit chez la drosophile) sont apparus au cours de l'évolution, présentant des profils d'expressions différents à des temps et dans des tissus différents. Ces isoformes sont regroupés en trois classes présentant des propriétés d'associations différentes avec leurs partenaires eIF4G et 4E-BP, qui semblent conservées chez différents organismes (voir résultats chapitre 1).

L'apparition de ces isoformes amène un premier niveau de régulation traductionnel, créant de grandes possibilités et variabilités en terme de régulation de la traduction des ARNm du fait que les eIF4E n'interagissent pas avec les mêmes partenaires. Cependant, les recherches actuelles sont essentiellement concentrées sur le rôle des eIF4E de classe 1, qui est la classe majoritaire et la plus ancestrale des eIF4E.

Perspectives sur les classes d'eIF4E

L'expression et l'activité spécifique des classes eIF4E2 et eIF4E3 identifiées sont largement sous-étudiées et de nouvelles études seraient nécessaires afin de comprendre la signification biologique de cette large diversité au sein de la famille des eIF4E. La caractérisation des profils d'expressions de chaque classe au cours du développement embryonnaire de l'oursin semble une piste très prometteuse pour comprendre le rôle de chaque eIF4E dans ce processus (résultats chapitre 1), et je pense que les efforts engagés pour développer des outils devront être redoublés afin de mener à bien ce projet. La caractérisation structurale des eIF4E et

l'établissement du lien structure/fonction me semblent des points essentiels pour comprendre l'association des eIF4E avec leurs partenaires, mais aussi leurs fonctions, puisque la fonction d'eIF4E est directement liée aux protéines avec lesquelles il interagit. De plus, les variants d'eIF4E semblent apporter une source riche de variations au niveau de la structure d'eIF4E, ce qui présente une opportunité unique pour mener des études structures fonctions et développer une stratégie thérapeutique de drug-design.

Au cours de l'évolution, de nombreuses protéines capables de se lier à eIF4E ont fait leur apparition constituant un deuxième niveau de régulation. Ces protéines arborent pour la plupart un motif similaire de type YXXXXLΦ permettant d'interagir avec la surface dorsale d'eIF4E et donc de moduler le recrutement d'eIF4G par eIF4E. Ce site est devenu un véritable lieu de compétition moléculaire, où les constantes d'affinité et de dissociation de chaque partenaire rentrent en jeu pour déterminer quelle molécule se liera à eIF4E.

Parmi ces compétiteurs d'eIF4G, la protéine 4E-BP est le répresseur général d'eIF4E le plus répandu chez les eucaryotes, et probablement le plus primitif, même s'il semble avoir disparu chez quelques organismes comme la levure ou encore les plantes. Par des phénomènes de convergence, certains de ces organismes ont mis en place des mécanismes similaires de régulation d'eIF4E, comme avec p20 chez la levure. Alors que la fonction biochimique et les caractéristiques biophysiques de 4E-BP ont été largement étudiées, le rôle physiologique de la protéine au sein d'un organisme reste encore discuté. Chez certains organismes comme la drosophile, qui ne possède qu'un seul 4E-BP, il semble que 4E-BP joue le rôle de frein métabolique dans des conditions de stress nutritif, rôle souvent évoqué comme étant la fonction ancestrale de 4E-BP (Teleman et al., 2005; Hernandez et al., 2010). Chez les vertébrés, on peut supposer que l'apparition de plusieurs 4E-BPs a permis la mise en place de redondances fonctionnelles entre les rôles de chaque régulateur et donc l'implication de 4E-BP dans d'autres mécanismes, tel que l'apprentissage spatial (Qi et al., 2010), ou encore la plasticité du cerveau au cours du sommeil (Seibt et al., 2012). De plus, la structure désordonnée de 4E-BP et sa capacité à former des complexes "fuzzy" avec eIF4E (Gosselin et al., 2011) laisse supposer que ce dernier soit capable d'interagir avec plusieurs partenaires et puisse avoir d'autres rôles dans la cellule, ce qui ouvre de nombreuses perspectives quant au rôle physiologique de 4E-BP au sein d'un organisme.

Bien que 4E-BP fasse l'objet de nombreuses études biophysiques, structurales et fonctionnelles, la compréhension de la régulation de l'association entre eIF4E et 4E-BP est encore sujette à certaines zones d'ombres. L'étude de la structure du complexe eIF4E/4E-BP en SAXS (Gosselin et al., 2011) nous a permis de souligner plusieurs points importants dans la relation clé/serrure qui s'établit entre eIF4E et ses partenaires. En effet, nous avons montré qu'il existe d'autres contacts entre eIF4E et 4E-BP, en plus de ceux établis au niveau de la surface dorsale d'eIF4E. L'apport de données complémentaires par Umenaga et collab. (2011), et Paku et collab. (2012) permettent de conclure qu'il existe au moins une région supplémentaire sur les deux partenaires principaux d'eIF4E participant à l'interaction. Ces données impliquent que même si l'association des partenaires avec la surface dorsale convexe d'eIF4E est essentielle pour interagir avec eIF4E, d'autres domaines vont prendre part à l'interaction et vont être à l'origine des différences d'affinités des partenaires pour eIF4E.

Perspectives sur les interactions entre eIF4E et ses partenaires

Pour comprendre les différences d'affinités d'eIF4G et 4E-BP envers eIF4E, il convient maintenant d'identifier les sites d'eIF4E impliqués dans ces nouvelles liaisons, par des méthodes d'analyses structurales ou des méthodes telles que la SPR ou l'ITC. Si un deuxième site de liaison est à l'origine des différences fonctionnelles entre eIF4G et 4E-BP, il est important de le caractériser pour ensuite chercher à déstabiliser de manière différentielle les interactions eIF4E/eIF4G et eIF4E/4E-BP. En effet, cette piste représente un domaine d'investigation intéressant pour le développement de stratégies thérapeutiques, en particulier dans le cadre des cancers où l'on cherche à déstabiliser l'interaction eIF4E/eIF4G mais pas l'interaction eIF4E/4E-BP. L'étude structurale comparative des différentes formes d'eIF4E se présente alors comme une piste majeure pour déterminer quels sont les motifs discriminant dans la structure des eIF4E pour interagir avec tel ou tel partenaire.

En ce qui concerne les autres partenaires d'eIF4E (4E-IPs), peu de données structurales sont disponibles. Chez la drosophile, certaines 4E-IPs montrent une spécificité d'interaction avec eIF4E2 (Brat (Sonoda and Wharton, 2001) ou Bicoid (Cho et al., 2005)), suggérant qu'il existe également des propriétés structurales permettant une spécificité d'interaction. La caractérisation des interactions entre les 4E-IPs et eIF4E au niveau structural et biophysique pourrait donc apporter des données supplémentaires concernant le type d'interactions mis en

jeu et la compétition qui s'exerce entre les différentes 4E-IPs, données nécessaires pour la compréhension des régulations qui s'exercent sur le facteur eIF4E au sein de la cellule.

Les autres 4E-IPs sont progressivement apparues au cours de l'évolution. Ces protéines présentent pour la plupart une fonction primaire qui n'est pas reliée à la régulation traductionnelle et vont moduler la fonction d'eIF4E de manière spécifique, dans des processus différents. Au cours de l'introduction de ce travail de thèse, nous avons montré que la liaison à eIF4E au niveau de sa surface dorsale convexe apparaît comme un mécanisme universel et un point capital pour réguler le contrôle de la traduction, l'export des ARNm eIF4E-dépendant ou encore certains mécanismes de séquestration-dégradation des ARNm.

L'apparition et la conservation du motif de liaison à eIF4E chez des protéines ayant un rôle initial très éloigné de la régulation traductionnelle (ex : facteur de transcription) montrent que l'interaction avec eIF4E et la possibilité de moduler son activité et son affinité pour la coiffe dans un certain contexte confère un avantage sélectif. Certaines 4E-IPs sont apparues de manière complètement indépendante dans certaines espèces, par exemple Bicoid ou encore Brat chez la drosophile. Dans ce cas particulier, les 4E-IPs ont permis la mise en place de régulation traductionnelle spatiale et spécifique dans l'embryon, de manière convergente à des mécanismes différents présents chez les autres insectes (Dearden and Akam, 1999). D'un point de vue phylogénétique, une grande partie de ces nouvelles 4E-IPs sont retrouvées au niveau de vertébrés (ex : Angel1, HoxA9,LRPPRC, PRH, PML, Maskin). Il est en effet fort probable qu'à la suite de la duplication du génome des vertébrés et à l'apparition de redondance fonctionnelle entre les gènes, certaines protéines aient pu acquérir de nouvelles fonctions, dont la capacité de se lier à eIF4E indépendamment chez différents organismes. Cependant, la plupart des études ayant été menées sur des organismes modèles vertébrés, il se peut qu'il existe de nombreuses 4E-IPs dans d'autres organismes, qui ne se retrouvent pas chez les vertébrés, comme c'est le cas chez la drosophile. L'exemple d'Angel1 est intéressant puisqu'il existe un gène ancestral *angel*, qui s'est dupliqué au niveau des vertébrés pour donner deux gènes : *angel1* et *angel2* (Gosselin et al., en préparation). Angel1 a acquis le motif de liaison à eIF4E et a été conservé au cours de l'évolution des vertébrés. Dans le cas d'Angel1, la fonction de l'Angel ancestral n'étant pas déterminée, il est difficile de déterminer si l'apparition du motif de liaison à eIF4E a affecté ou non la fonction ancestrale d'Angel, mais cela a sans aucun doute permis l'acquisition d'une nouvelle fonction de la protéine quant à la régulation passant par eIF4E.

Chaque 4E-IP va exercer une régulation spécifique sur eIF4E, voire également sur un eIF4E spécifique (Bicoid, Brat ou une toute nouvelle 4E-IP GYGIF2 interagissent par exemple qu'avec eIF4E2 (Sonoda and Wharton, 2001; Cho et al., 2005; Morita et al., 2012)). On peut faire l'hypothèse que l'apparition des 4E-IPs s'est faite conjointement à la mise en place des différents niveaux de régulation d'un ARNm par eIF4E. En effet, Les 4E-IPs peuvent réguler l'export nucléaire d'eIF4E (PML, LRPPRC), parfois de manière tissus spécifiques (HOXA9, PRH), sa localisation cellulaire (4E-T) ou encore réguler la traduction spécifique de certains ARNm (Maskin, Neuroguidin,...).

Dans une cellule, les 4E-IPs sont toutes en compétition pour le site de liaison sur la surface convexe dorsale d'eIF4E et c'est la protéine qui se lie à eIF4E qui détermine le rôle de celui-ci. Des études ont montré que les partenaires d'eIF4E ont des affinités différentes pour celui-ci. Par exemple, HOXA9 a une affinité 2,5 fois inférieure à celle de PRH pour eIF4E (Topisirovic et al., 2009) mais également 1000 fois inférieure à celle d'eIF4G pour eIF4E (Gross et al., 2003; Topisirovic and Borden, 2005). Selon le compartiment cellulaire et le tissu dans lequel il se trouve, l'environnement moléculaire d'eIF4E sera différent et c'est la compétition entre les différents partenaires présents, ainsi que leurs effets sur la liaison d'eIF4E avec la coiffe qui vont déterminer le devenir d'eIF4E lié ou non à son messager. L'apparition de nouvelles 4E-IPs a donc permis la complexification des niveaux de régulation qui s'exercent sur eIF4E. Cette diversification moléculaire a créé un réseau de contrôle extrêmement complexe qui permet un niveau de régulation plus élevé et plus fin de la production spatio-temporelle des protéines.

La découverte d'Angel1 comme nouveau partenaire d'eIF4E se présente comme une découverte majeure dans mon travail de thèse et s'intègre parfaitement dans la vision d'un réseau de régulateurs de plus en plus complexe tissé autour d'eIF4E. La caractérisation de l'interaction Angel1/eIF4E (Gosselin et al. (en préparation)) pose les bases fondamentales pour la poursuite de ce travail. La diversité des régulations exercées par les 4E-IPs et celles observées pour les protéines CCR4 ouvrent de nombreuses pistes de réflexion et d'investigation quant au rôle d'Angel1 dans la cellule.

Perspectives sur l'étude d'Angel1

Caractérisation fonctionnelle d'Angel1

La caractérisation fonctionnelle d'Angel1 présente un point crucial pour la compréhension du rôle d'Angel1 dans la cellule. Une des premières questions concerne l'activité nucléase d'Angel1. A-t-elle été conservée au cours de l'évolution et quels sont les résidus responsables de cette activité? Nous avons en effet observé une activité nucléase pour Angel1, mais également pour le mutant dans le site actif putatif, ce qui nous empêche de valider la spécificité de l'activité. La création de mutants de délétion devrait nous permettre de localiser le domaine responsable de la fonction nucléase et de valider ou non la spécificité de l'activité. Le deuxième point important concerne l'étude du rôle d'Angel1 sur la régulation de la traduction. L'utilisation du système de tethering, permettant de cibler une protéine d'intérêt en 3' ou en 5'UTR d'un ARNm rapporteur au sein d'une cellule, se présente comme une étape essentielle pour déterminer le rôle d'Angel1 sur le contrôle traductionnel et le métabolisme des ARNm.

La caractérisation de la localisation d'Angel1 (Gosselin et al., en préparation) permet néanmoins de faire quelques hypothèses quant au rôle de l'interaction entre Angel1 et eIF4E et ouvre de nombreuses pistes d'investigation:

Angel1 et traduction des protéines sécrétées?

Nos résultats ont montré qu'Angel1 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et du golgi, et qu'elle colocalise avec eIF4E dans cette zone au niveau de particules. Traditionnellement, la compartimentation des ribosomes se fait en deux groupes : l'un associé avec le RE, afin de permettre la traduction localisée des protéines luminales, sécrétées ou transmembranaires, et un autre libre dans cytoplasme, où les protéines cytoplasmiques sont synthétisées (Nicchitta et al., 2005). Du fait de sa localisation, Angel1 pourrait participer à la régulation de la synthèse des protéines sécrétées. Dans ce sens, le profil d'expression d'Angel1 dans différents tissus établi par le consortium "the human Protein Atlas" (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000013523>) montre que cette dernière est très fortement exprimée au niveau des cellules exocrines et des îlots de Langerhans du pancréas, ainsi que dans les cellules des tubes séminifères au niveau du testicule qui sont des cellules dont la fonction essentielle est la formation de la barrière hémato-testiculaire et la nutrition des futurs spermatozoïdes. Ces cellules ont toutes un potentiel sécréteur fort, ce qui suggère

que l'hypothèse impliquant Angel1 dans la régulation de la synthèse des protéines sécrétées est une piste intéressante à explorer.

Angel1 et séquestration d'ARNm spécifiques?

Le potentiel rôle d'Angel1 dans la régulation et la séquestration d'ARNm spécifiques a été évoqué dans Gosselin et al. (en préparation). L'expression de sh-ARN contre Angel1 ne perturbe pas la traduction globale d'une cellule. D'autre part, l'association d'Angel1 avec eIF4E n'est pas sensible à la voie mTOR et Angel1 n'est pas codistribuée avec 4E-BP dans les cellules, suggérant qu'Angel1 interagit avec une fraction d'eIF4E qui n'est pas régulée par 4E-BP. Nous avons montré que l'ajout d'Angel1 recombinante peut déplacer eIF4G d'eIF4E et que les protéines sont codistribuées dans un même compartiment (Gosselin et al. en préparation). Or, il a été montré que la localisation spatiale des ARNm dans certains compartiments peut être un moyen de réguler la traduction et de faciliter l'enrichissement des protéines au niveau du site où elles vont exercer leur fonction (St Johnston, 2005). Cette traduction localisée ne concerne pas seulement les ARNm de protéines sécrétées qui vont se localiser au niveau du RE. Suite à ces observations, une hypothèse plausible pourrait être qu'Angel1 participe à la localisation et à la mise en attente de traduction de certains messagers spécifiques, et donc intervient avant les mécanismes mis en œuvre pour l'étape d'initiation. En effet, Willett et al. ont montré dans des fibroblastes qu'une certaine fraction d'eIF4E et d'eIF4G colocalisait avec le Golgi au niveau de sites actifs de traduction où 4E-BP n'est pas retrouvé (Willett et al., 2011). Angel1 pourrait donc participer au recrutement et au stockage de certains ARNm spécifiques avant qu'ils ne soient traduits localement au niveau du Golgi et du réticulum endoplasmique.

Angel1 et régulation multifonctionnelle?

Le rôle régulateur d'Angel1 sur eIF4E reste encore à déterminer. Le seul partenaire connu d'Angel1 est CNOT8 (Wagner et al., 2007), une déadénylase capable d'inhiber la traduction indépendamment de son activité nucléase (Cooke et al., 2010) et souvent recrutée en 3'UTR d'un ARNm par les protéines PUF (Goldstrohm et al., 2006).

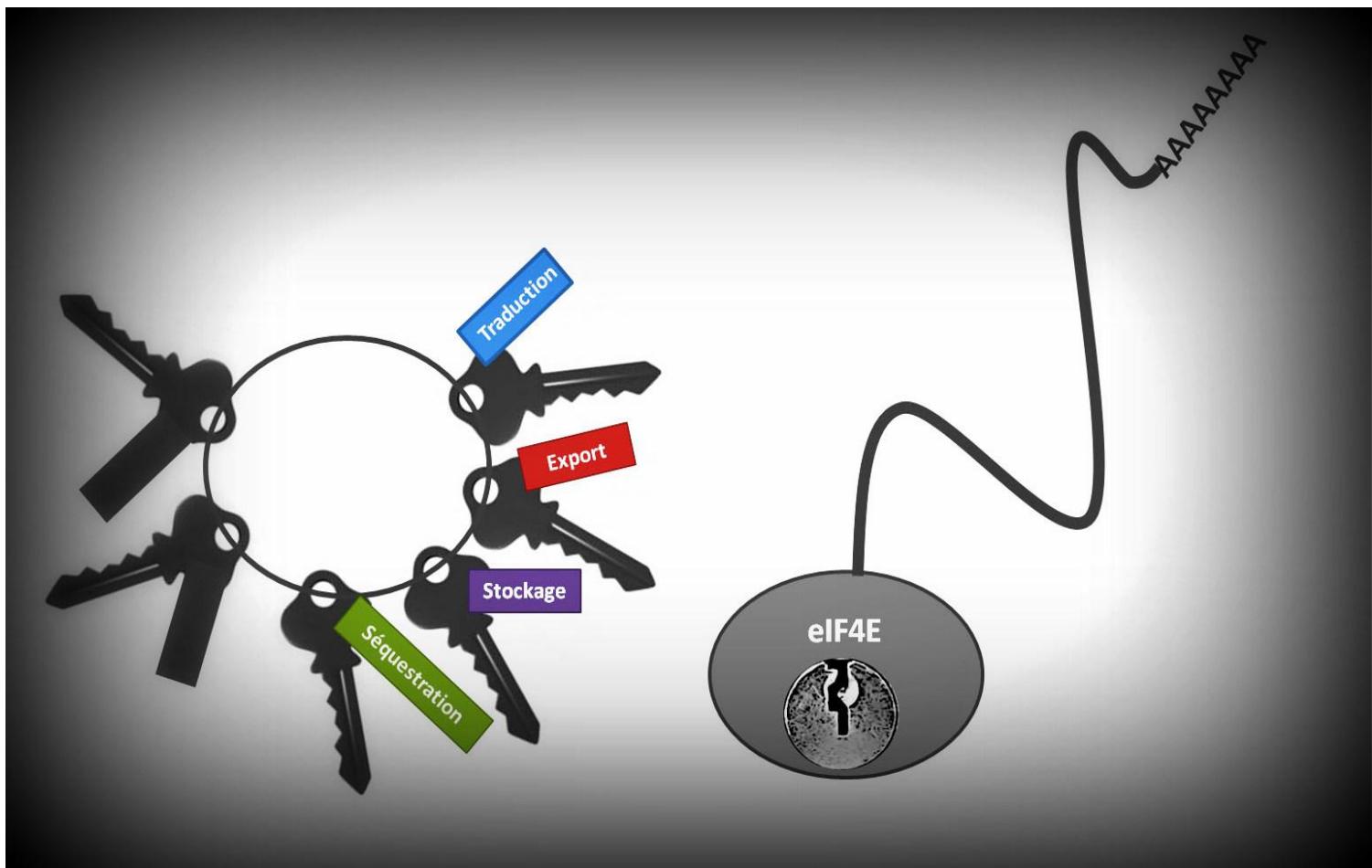
Même si la protéine recombinante Angel1 est incapable *in vitro* de moduler la traduction, il est possible qu'il en soit autrement *in vivo*. La perte d'Angel1 dans la cellule ne semble ni affecter le niveau de traduction générale, ni le taux de prolifération cellulaire (résultats non montrés). Néanmoins, sa séquence conservée de déadénylase et sa capacité à

interagir avec CNOT8 et eIF4E laissent suggérer qu'Angel1 régule négativement la traduction, en empêchant la liaison eIF4E/eIF4G et en dégradant la queue poly(A) de celui-ci par recrutement ou non d'une activité déadénylase.

De manière intéressante, une fraction de la protéine Angel1 est retrouvée au niveau des fractions lourdes du gradient polysomal en conditions détergentes permettant la libération des polysomes liés à la membrane (RE), ceci indépendamment de l'utilisation d'EDTA, suggérant qu'Angel1 peut faire partie de gros complexes mRNP qui ne sont pas associés à des ribosomes mais qui sont liés à la membrane du RE (Gosselin et al., en préparation). On peut imaginer qu'Angel1 est un composant d'un complexe multifonctionnel associé aux membranes du RE qui réprime la traduction de certains ARNm dans certaines conditions en recrutant plusieurs activités inhibitrices (déadénylase, inhibition de la traduction,...). Là encore, l'étude des partenaires d'Angel1 sera cruciale pour déterminer le rôle qu'elle joue au niveau du métabolisme des ARNm et de la traduction. La séparation d'extraits cellulaires sur gel filtration pourrait ensuite nous aider à déterminer les différents complexes dans lesquels se retrouvent Angel1, à savoir si elle est majoritairement sous la forme de gros complexes mRNP, ou sous la forme de monomère et dans quels cas elle interagit avec eIF4E.

A plus grande échelle, l'étude comparée du traductome de la lignée cellulaire exprimant un shARN-Angel1 avec celui de la lignée contrôle permettrait de déterminer si Angel1 joue un rôle dans la régulation de la traduction et d'identifier les ARNm cibles d'Angel1. Une première approche par qPCR est envisageable, en regardant dans les polysomes le niveau de recrutement de transcrits candidats, connus pour être traduits en périphérie nucléaire (exemple de c-myc ou β -globin (Veyrune et al., 1996)) ou codant pour des protéines sécrétées. Le profil d'Angel1 en immunohistochimie montre qu'Angel1 est principalement exprimée au niveau du pancréas et des testicules. Il serait donc intéressant de se placer dans un autre type cellulaire pour observer l'effet du shARN-Angel1 sur l'aspect général de ces cellules et leur profil de polysomes. De manière intéressante, des expériences d'immunohistochimie montrent que l'expression d'Angel1 au niveau des cellules pancréatiques diminue drastiquement dans le cadre d'un cancer du pancréas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000013523/cancer>). Une étude plus approfondie de l'expression d'Angel1 à différents stades de progression de la maladie, en parallèle avec celle de 4E-BP1 qui a été montrée comme étant élevée dans les stades préneoplasiques et très faible dans les stades plus agressifs du cancer pancréatique (Azar et al., 2009), pourrait apporter des données supplémentaires sur le rôle potentiel d'Angel1 et peut-être révéler cette protéine comme marqueur de l'avancement de la maladie.

"Il n'y a rien de plus beau qu'une clef, tant qu'on ne sait pas ce qu'elle ouvre." Oscar Wilde



CONCLUSION

Le facteur eIF4E est une cible majeure de la régulation traductionnelle et donc une cible thérapeutique très convoitée. La fonction spécifique de chaque molécule d'eIF4E dans la cellule dépend du partenaire protéique avec lequel elle est associée. La surface dorsale convexe d'eIF4E se présente comme le lieu de compétitions moléculaires entre différents régulateurs. Au cours de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux aspects structuraux qui régulent l'association entre eIF4E et ses principaux partenaires au cours de l'étape d'initiation de la traduction. Mon travail de thèse s'est concentré sur la relation structure/fonction qu'il existe entre les différentes classes d'eIF4E qui représentent un premier niveau de régulation de l'étape d'initiation de la traduction. Mes résultats obtenus sur la structure du complexe entre eIF4E et 4E-BP apportent un nouveau regard sur l'interaction clé/serrure qui s'établit entre eIF4E et ses partenaires et montrent que, même si l'interaction entre le motif de liaison et la surface dorsale d'eIF4E est essentielle, d'autres domaines au niveau des partenaires prennent part à l'interaction et vont moduler les affinités de chaque régulateurs pour eIF4E. La découverte d'un nouveau partenaire d'eIF4E membre de la famille CCR4 illustre la variété des régulateurs mis en place au cours de l'évolution pour réguler eIF4E et soulève de nombreuses questions quant à la régulation de la traduction spécifique de certains ARNm et la diversité des mécanismes dans le cadre de régulations multifonctionnelles. L'ensemble de ces données met en lumière les différents niveaux de régulations qui s'exercent sur la formation du complexe d'initiation par le biais des interactions entre eIF4E et ses partenaires dans un contexte général ou particulier. La compréhension de ces mécanismes au niveau structural et fonctionnel présente un intérêt majeur pour le développement de thérapies prenant eIF4E pour cible dans différentes pathologies et en particulier dans le cadre de cancers.

BIBLIOGRAPHIE

- Abaza I. and Gebauer F. (2008). "Trading translation with RNA-binding proteins." *RNA* **14**(3) : 404-409.
- Abiko F., Tomoo K., Mizuno A., Morino S., Imataka H. and Ishida T. (2007). "Binding preference of eIF4E for 4E-binding protein isoform and function of eIF4E N-terminal flexible region for interaction, studied by SPR analysis." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(3) : 667-672.
- Acker M. G., Shin B. S., Dever T. E. and Lorsch J. R. (2006). "Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining." *J Biol Chem* **281**(13) : 8469-8475.
- Algire M. A., Maag D. and Lorsch J. R. (2005). "Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation." *Mol Cell* **20**(2) : 251-262.
- Allen G. S. and Frank J. (2007). "Structural insights on the translation initiation complex : ghosts of a universal initiation complex." *Mol Microbiol* **63**(4) : 941-950.
- Altmann M., Schmitz N., Berset C. and Trachsel H. (1997). "A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast : p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E." *Embo Journal* **16**(5) : 1114-1121.
- Anderson P. and Kedersha N. (2008). "Stress granules : the Tao of RNA triage." *Trends Biochem Sci* **33**(3) : 141-150.
- Anderson P. and Kedersha N. (2009). "RNA granules : post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(6) : 430-436.
- Andrei M. A., Ingelfinger D., Heintzmann R., Achsel T., Rivera-Pomar R. and Luhrmann R. (2005). "A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies." *RNA* **11**(5) : 717-727.
- Andresson T. and Ruderman J. V. (1998). "The kinase Eg2 is a component of the Xenopus oocyte progesterone-activated signaling pathway." *Embo Journal* **17**(19) : 5627-5637.
- Anthony B., Carter P. and De Benedetti A. (1996). "Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines." *Int J Cancer* **65**(6) : 858-863.
- Armenol G., Rojo F., Castellvi J., Iglesias C., Cuatrecasas M., Pons B., Baselga J. and Ramon y Cajal S. (2007). "4E-binding protein 1 : a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications." *Cancer Res* **67**(16) : 7551-7555.
- Ayuso M. I., Hernandez-Jimenez M., Martin M. E., Salinas M. and Alcazar A. (2010). "New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress." *J Biol Chem* **285**(45) : 34355-34363.
- Azar R., Alard A., Susini C., Bousquet C. and Pyronnet S. (2009). "4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGFbeta-mediated inhibition of cell proliferation." *Embo Journal* **28**(22) : 3514-3522.
- Baggs J. E. and Green C. B. (2003). "Nocturnin, a deadenylase in Xenopus laevis retina : a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA." *Curr Biol* **13**(3) : 189-198.
- Barnard D. C., Cao Q. and Richter J. D. (2005). "Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus." *Mol Cell Biol* **25**(17) : 7605-7615.
- Barnard D. C., Ryan K., Manley J. L. and Richter J. D. (2004). "Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation." *Cell* **119**(5) : 641-651.
- Barzilay G., Mol C. D., Robson C. N., Walker L. J., Cunningham R. P., Tainer J. A. and Hickson I. D. (1995). "Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1." *Nat Struct Biol* **2**(7) : 561-568.
- Beretta L., Gingras A. C., Svitkin Y. V., Hall M. N. and Sonenberg N. (1996). "Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation." *Embo Journal* **15**(3) : 658-664.

- Beugnet A., Wang X. and Proud C. G. (2003). "Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1." *J Biol Chem* **278**(42) : 40717-40722.
- Bhaskar P. T. and Hay N. (2007). "The two TORCs and Akt." *Dev Cell* **12**(4) : 487-502.
- Bilger A., Fox C. A., Wahle E. and Wickens M. (1994). "Nuclear polyadenylation factors recognize cytoplasmic polyadenylation elements." *Genes Dev* **8**(9) : 1106-1116.
- Bonneau A. M. and Sonenberg N. (1987). "Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis." *J Biol Chem* **262**(23) : 11134-11139.
- Borden J. A. (2002). "Treatment of tumors involving the optic nerves and chiasm." *Semin Ophthalmol* **17**(1) : 22-28.
- Borden K. L., Boddy M. N., Lally J., O'Reilly N. J., Martin S., Howe K., Solomon E. and Freemont P. S. (1995). "The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncogene PML." *Embo Journal* **14**(7) : 1532-1541.
- Borden K. L., Lally J. M., Martin S. R., O'Reilly N. J., Solomon E. and Freemont P. S. (1996). "In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia proto-oncogene PML." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4) : 1601-1606.
- Bornes S., Prado-Lourenco L., Bastide A., Zanibellato C., Iacovoni J. S., Lacazette E., Prats A. C., Touriol C. and Prats H. (2007). "Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress." *Circ Res* **100**(3) : 305-308.
- Bradrick S. S. and Gromeier M. (2009). "Identification of gemin5 as a novel 7-methylguanosine cap-binding protein." *PLoS One* **4**(9) : e7030.
- Braun J. E., Huntzinger E., Fauser M. and Izaurralde E. (2011). "GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets." *Mol Cell* **44**(1) : 120-133.
- Braunstein S., Karpisheva K., Pola C., Goldberg J., Hochman T., Yee H., Cangiarella J., Arju R., Formenti S. C. and Schneider R. J. (2007). "A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer." *Mol Cell* **28**(3) : 501-512.
- Bushell M., Poncet D., Marissen W. E., Flotow H., Lloyd R. E., Clemens M. J. and Morley S. J. (2000). "Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage." *Cell Death Differ* **7**(7) : 628-636.
- Cameron R. A., Samanta M., Yuan A., He D. and Davidson E. (2009). "SpBase: the sea urchin genome database and web site." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue) : D750-754.
- Campbell Dwyer E. J., Lai H., MacDonald R. C., Salvato M. S. and Borden K. L. (2000). "The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner." *J Virol* **74**(7) : 3293-3300.
- Cao Q. and Richter J. D. (2002). "Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation." *Embo Journal* **21**(14) : 3852-3862.
- Caron S., Charon M., Cramer E., Sonenberg N. and Dusander-Fourt I. (2004). "Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E." *Mol Cell Biol* **24**(11) : 4920-4928.
- Carroll M., Dyer J. and Sossin W. S. (2006). "Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in *aplysia* neurons." *Mol Cell Biol* **26**(22) : 8586-8598.
- Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., Davey N. E., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., Krijgsveld J. and Hentze M. W. (2012). "Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins." *Cell* **149**(6) : 1393-1406.

- Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L. A., Offenhauser N., Marchisio P. C. and Biffo S. (2003). "Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly." *Nature* **426**(6966) : 579-584.
- Chen J., Chiang Y. C. and Denis C. L. (2002). "CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase." *Embo Journal* **21**(6) : 1414-1426.
- Chen W. W., Chan D. C., Donald C., Lilly M. B. and Kraft A. S. (2005). "Pim family kinases enhance tumor growth of prostate cancer cells." *Mol Cancer Res* **3**(8) : 443-451.
- Cho P. F., Gamberi C., Cho-Park Y. A., Cho-Park I. B., Lasko P. and Sonenberg N. (2006). "Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos." *Curr Biol* **16**(20) : 2035-2041.
- Cho P. F., Poulin F., Cho-Park Y. A., Cho-Park I. B., Chicoine J. D., Lasko P. and Sonenberg N. (2005). "A new paradigm for translational control : inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP." *Cell* **121**(3) : 411-423.
- Choi K. M., McMahon L. P. and Lawrence J. C., Jr. (2003). "Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor." *J Biol Chem* **278**(22) : 19667-19673.
- Clemens M. J. (2001). "Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins." *J Cell Mol Med* **5**(3) : 221-239.
- Clemens M. J. (2004). "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation." *Oncogene* **23**(18):3180-8.
- Clemens M. J. and Bommer U. A. (1999). "Translational control : the cancer connection." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1) : 1-23.
- Cock J. M., Sterck L., Rouze P., Scornet D., Allen A. E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J. M., Badger J. H., Beszteri B., Billiau K., Bonnet E., Bothwell J. H., Bowler C., Boyen C., Brownlee C., Carrano C. J., Charrier B., Cho G. Y., Coelho S. M., Collen J., Corre E., Da Silva C., Delage L., Delaroque N., Dittami S. M., Doulbeau S., Elias M., Farnham G., Gachon C. M., Gschloessl B., Heesch S., Jabbari K., Jubin C., Kawai H., Kimura K., Kloareg B., Kupper F. C., Lang D., Le Bail A., Leblanc C., Lerouge P., Lohr M., Lopez P. J., Martens C., Maumus F., Michel G., Miranda-Saavedra D., Morales J., Moreau H., Motomura T., Nagasato C., Napoli C. A., Nelson D. R., Nyvall-Collen P., Peters A. F., Pommier C., Potin P., Poulain J., Quesneville H., Read B., Rensing S. A., Ritter A., Rousvoal S., Samanta M., Samson G., Schroeder D. C., Segurens B., Strittmatter M., Tonon T., Tregear J. W., Valentin K., von Dassow P., Yamagishi T., Van de Peer Y. and Wincker P. (2010). "The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae." *Nature* **465**(7298) : 617-621.
- Cohen N., Sharma M., Kentsis A., Perez J. M., Strudwick S. and Borden K. L. (2001). "PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA." *Embo Journal* **20**(16) : 4547-4559.
- Coldwell M. J. and Morley S. J. (2006). "Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity." *Mol Cell Biol* **26**(22) : 8448-8460.
- Constantinou C., Elia A. and Clemens M. J. (2008). "Activation of p53 stimulates proteasome-dependent truncation of eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1)." *Biol Cell* **100**(5) : 279-289.
- Conte C., Riant E., Toutain C., Pujol F., Arnal J. F., Lenfant F. and Prats A. C. (2008). "FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha." *PLoS One* **3**(8) : e3078.
- Cooke A., Prigge A. and Wickens M. (2010). "Translational repression by deadenylases." *J Biol Chem* **285**(37) : 28506-28513.
- Cormier P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Sonenberg N. and Belle R. (2001). "eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin." *Dev Biol* **232**(2) : 275-283.

- Costa-Mattioli M., Sonnenberg N. and Richter J. D. (2009). "Translational regulatory mechanisms in synaptic plasticity and memory storage." *Prog Mol Biol Transl Sci* **90** : 293-311.
- Cougot N., Babajko S. and Seraphin B. (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells." *J Cell Biol* **165**(1) : 31-40.
- Craig A. W., Haghigiat A., Yu A. T. and Sonnenberg N. (1998). "Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation." *Nature* **392**(6675) : 520-523.
- Culjkovic B., Topisirovic I. and Borden K. L. (2007). "Controlling gene expression through RNA regulons : the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E." *Cell Cycle* **6**(1) : 65-69.
- Culjkovic B., Topisirovic I., Skrabaneck L., Ruiz-Gutierrez M. and Borden K. L. (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." *J Cell Biol* **169**(2) : 245-256.
- Culjkovic B., Topisirovic I., Skrabaneck L., Ruiz-Gutierrez M. and Borden K. L. (2006). "eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation." *J Cell Biol* **175**(3) : 415-426.
- Daugeron M. C., Mauxion F. and Seraphin B. (2001). "The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation." *Nucleic Acids Res* **29**(12) : 2448-2455.
- Dearden P. and Akam M. (1999). "Developmental evolution : Axial patterning in insects." *Curr Biol* **9**(16) : R591-594.
- Denis C. L. (1984). "Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II." *Genetics* **108**(4) : 833-844.
- Denis C. L. and Chen J. (2003). "The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73** : 221-250.
- Denli A. M., Tops B. B., Plasterk R. H., Ketting R. F. and Hannon G. J. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014) : 231-235.
- Dever T. E., Dar, A. C. and Sicheri, F. (2007). "The eIF2alpha kinases." In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonnenberg and J. W. Hershey), New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press : 319-368.
- Dickson K. S., Bilger A., Ballantyne S. and Wickens M. P. (1999). "The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation." *Mol Cell Biol* **19**(8) : 5707-5717.
- Dlakic M. (2000). "Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases." *Trends Biochem Sci* **25**(6) : 272-273.
- Dobrikov M., Dobrikova E., Shveygert M. and Gromeier M. (2011). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C α regulates eIF4G1 binding to Mnk1." *Mol Cell Biol* **31**(14) : 2947-2959.
- Dostie J., Ferraiuolo M., Pause A., Adam S. A. and Sonnenberg N. (2000a). "A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E." *Embo Journal* **19**(12) : 3142-3156.
- Dostie J., Lejbkowicz F. and Sonnenberg N. (2000b). "Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles." *J Cell Biol* **148**(2) : 239-247.
- Draper M. P., Liu H. Y., Nelsbach A. H., Mosley S. P. and Denis C. L. (1994). "CCR4 is a glucose-regulated transcription factor whose leucine-rich repeat binds several proteins important for placing CCR4 in its proper promoter context." *Mol Cell Biol* **14**(7) : 4522-4531.
- Duncan R., Milburn S. C. and Hershey J. W. (1987). "Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F." *J Biol Chem* **262**(1) : 380-388.
- Dupressoir A., Morel A. P., Barbot W., Loireau M. P., Corbo L. and Heidmann T. (2001). "Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding." *BMC Genomics* **2** : 9.

- Edwards T. A., Wilkinson B. D., Wharton R. P. and Aggarwal A. K. (2003). "Model of the brain tumor-Pumilio translation repressor complex." *Genes Dev* **17**(20) : 2508-2513.
- Elia A., Constantinou C. and Clemens M. J. (2008). "Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1." *Oncogene* **27**(6) : 811-822.
- Engelman J. A., Luo J. and Cantley L. C. (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." *Nat Rev Genet* **7**(8) : 606-619.
- Eulalio A., Huntzinger E. and Izaurralde E. (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." *Nat Struct Mol Biol* **15**(4) : 346-353.
- Eulalio A., Tritschler F. and Izaurralde E. (2009). "The GW182 protein family in animal cells : new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing." *RNA* **15**(8) : 1433-1442.
- Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. and Vos J. C. (2002). "Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *RNA* **8**(9) : 1095-1101.
- Fabian M. R., Cieplak M. K., Frank F., Morita M., Green J., Srikumar T., Nagar B., Yamamoto T., Raught B., Duchaine T. F. and Sonenberg N. (2011). "miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT." *Nat Struct Mol Biol* **18**(11) : 1211-1217.
- Fabian M. R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J. T., Svitkin Y. V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J. A., Chen C. Y., Shyu A. B., Yates J. R., 3rd, Hannon G. J., Filipowicz W., Duchaine T. F. and Sonenberg N. (2009). "Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation." *Mol Cell* **35**(6) : 868-880.
- Fabian M. R., Sundermeier T. R. and Sonenberg N. (2010). "Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression." *Prog Mol Subcell Biol* **50** : 1-20.
- Fadden P., Haystead T. A. and Lawrence J. C., Jr. (1997). "Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes." *J Biol Chem* **272**(15) : 10240-10247.
- Feddersen A., Dedic E., Poulsen E. G., Schmid M., Van L. B., Jensen T. H. and Brodersen D. E. (2012). "Saccharomyces cerevisiae Ngl3p is an active 3'-5' exonuclease with a specificity towards poly-A RNA reminiscent of cellular deadenylases." *Nucleic Acids Res* **40**(2) : 837-846.
- Ferrero P. V., Layana C., Paulucci E., Gutierrez P., Hernandez G. and Rivera-Pomar R. V. (2012). "Cap binding-independent recruitment of eIF4E to cytoplasmic foci." *Biochim Biophys Acta*.
- Fierro-Monti I., Mohammed S., Matthiesen R., Santoro R., Burns J. S., Williams D. J., Proud C. G., Kassem M., Jensen O. N. and Roepstorff P. (2006). "Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E." *J Proteome Res* **5**(6) : 1367-1378.
- Fletcher C. M., Wagner G. (1998). "The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein." *Protein Science* **7** : 1639-1642.
- Flynn A. and Proud C. G. (1996). "Insulin and phorbol ester stimulate initiation factor eIF-4E phosphorylation by distinct pathways in Chinese hamster ovary cells overexpressing the insulin receptor." *Eur J Biochem* **236**(1) : 40-47.
- Fraser K. P. and Rogers A. D. (2007). "Protein metabolism in marine animals : the underlying mechanism of growth." *Adv Mar Biol* **52** : 267-362.
- Friedland D. E., Wooten W. N., LaVoy J. E., Hagedorn C. H. and Goss D. J. (2005). "A mutant of eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF4E(K119A) has an increased binding affinity for both m7G cap analogues and eIF4G peptides." *Biochemistry* **44**(11) : 4546-4550.
- Fukunaga R. and Hunter T. (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." *Embo Journal* **16**(8) : 1921-1933.

- Furic L., Rong L., Larsson O., Koumakpayi I. H., Yoshida K., Brueschke A., Petroulakis E., Robichaud N., Pollak M., Gaboury L. A., Pandolfi P. P., Saad F. and Sonenberg N. (2010). "eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(32) : 14134-14139.
- Garcia-Fernandez J. (2005). "The genesis and evolution of homeobox gene clusters." *Nat Rev Genet* **6**(12) : 881-892.
- Garneau N. L., Wilusz J. and Wilusz C. J. (2007). "The highways and byways of mRNA decay." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2) : 113-126.
- Gavis E. R., Lunsford L., Bergsten S. E. and Lehmann R. (1996). "A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA." *Development* **122**(9) : 2791-2800.
- Gebauer F. and Hentze M. W. (2004). "Molecular mechanisms of translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10) : 827-835.
- Gilmartin G. M. (2005). "Eukaryotic mRNA 3' processing : a common means to different ends." *Genes Dev* **19**(21) : 2517-2521.
- Gingras AC K. S., O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998). " 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. ." *Genes Dev* **12** : 502-513.
- Gingras A. C., Raught B., Gygi S. P., Niedzwiecka A., Miron M., Burley S. K., Polakiewicz R. D., Wyslouch-Cieszynska A., Aebersold R. and Sonenberg N. (2001a). "Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1." *Genes Dev* **15**(21) : 2852-2864.
- Gingras A. C., Raught B. and Sonenberg N. (2001b). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev* **15**(7) : 807-826.
- Gingras AC R. B., Sonenberg N (1999). "eIF4 initiation factors : effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu Rev Biochem* **68** : 913-963.
- Goddard A. D., Borrow J., Freemont P. S. and Solomon E. (1991). "Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia." *Science* **254**(5036) : 1371-1374.
- Goldberg J. M., Manning G., Liu A., Fey P., Pilcher K. E., Xu Y. and Smith J. L. (2006). "The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism." *PLoS Genet* **2**(3) : e38.
- Goldstrohm A. C., Hook B. A., Seay D. J. and Wickens M. (2006). "PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(6) : 533-539.
- Goldstrohm A. C., Seay D. J., Hook B. A. and Wickens M. (2007). "PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p." *J Biol Chem* **282**(1) : 109-114.
- Goldstrohm A. C. and Wickens M. (2008). "Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4) : 337-344.
- Gong J., Wang J., Ren K., Liu C., Li B. and Shi Y. (2009). "Serine/threonine kinase Pim-2 promotes liver tumorigenesis induction through mediating survival and preventing apoptosis of liver cell." *J Surg Res* **153**(1) : 17-22.
- Gosselin P., Oulhen N., Jam M., Ronzca J., Cormier P., Czjzek M. and Cosson B. (2011). "The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E : new structural insights by SAXS." *Nucleic Acids Res* **39**(8) : 3496-3503.
- Gradi A., Imataka H., Svitkin Y. V., Rom E., Raught B., Morino S. and Sonenberg N. (1998). "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G." *Mol Cell Biol* **18**(1) : 334-342.
- Gray N. K. and Hentze M. W. (1994). "Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs." *Embo Journal* **13**(16) : 3882-3891.
- Green C. B. and Besharse J. C. (1996). "Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25) : 14884-14888.

- Green C. B., Douris N., Kojima S., Strayer C. A., Fogerty J., Lourim D., Keller S. R. and Besharse J. C. (2007). "Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23) : 9888-9893.
- Gross J. D., Moerke N. J., von der Haar T., Lugovskoy A. A., Sachs A. B., McCarthy J. E. and Wagner G. (2003). "Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E." *Cell* **115**(6) : 739-750.
- Gu M. and Lima C. D. (2005). "Processing the message : structural insights into capping and decapping mRNA." *Curr Opin Struct Biol* **15**(1) : 99-106.
- Gubitz A. K., Mourelatos Z., Abel L., Rappaport J., Mann M. and Dreyfuss G. (2002). "Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins." *J Biol Chem* **277**(7) : 5631-5636.
- Hake L. E., Mendez R. and Richter J. D. (1998). "Specificity of RNA binding by CPEB : requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger." *Mol Cell Biol* **18**(2) : 685-693.
- Hake L. E. and Richter J. D. (1994). "CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation." *Cell* **79**(4):617-27.
- Halbeisen R. E., Galgano A., Scherrer T. and Gerber A. P. (2008). "Post-transcriptional gene regulation : from genome-wide studies to principles." *Cell Mol Life Sci* **65**(5) : 798-813.
- Hall M. N. (2008). "mTOR-what does it do?" *Transplant Proc* **40**(10 Suppl) : S5-8.
- Haystead T. A., Haystead C. M., Hu C., Lin T. A. and Lawrence J. C., Jr. (1994). "Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes." *J Biol Chem* **269**(37) : 23185-23191.
- Heesom K. J., Avison M. B., Diggle T. A. and Denton R. M. (1998). "Insulin-stimulated kinase from rat fat cells that phosphorylates initiation factor 4E-binding protein 1 on the rapamycin-insensitive site (serine-111)." *Biochem J* **336** (Pt 1) : 39-48.
- Heesom K. J., Gampel A., Mellor H. and Denton R. M. (2001). "Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1)." *Curr Biol* **11**(17) : 1374-1379.
- Hernandez G. (2008). "Was the initiation of translation in early eukaryotes IRES-driven?" *Trends Biochem Sci* **33**(2) : 58-64.
- Hernandez G. (2009). "On the origin of the cap-dependent initiation of translation in eukaryotes." *Trends Biochem Sci* **34**(4) : 166-175.
- Hernandez G., Altmann M. and Lasko P. (2010). "Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes." *Trends Biochem Sci* **35**(2) : 63-73.
- Hernandez G., Altmann M., Sierra J. M., Urlaub H., Diez del Corral R., Schwartz P. and Rivera-Pomar R. (2005). "Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in Drosophila." *Mech Dev* **122**(4) : 529-543.
- Hernandez G. and Vazquez-Pianzola P. (2005). "Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families." *Mech Dev* **122**(7-8) : 865-876.
- Hershey J. W. B. M., W. C. (2000). "Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis." *Translational control of gene expression* (eds Sonenberg, N., Hershey, J. W. & Mathews, B. M. B.)(Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA) : 33-88.
- Hiremath L. S., Webb N. R. and Rhoads R. E. (1985). "Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein." *J Biol Chem* **260**(13) : 7843-7849.
- Hofmann K., Tomiuk S., Wolff G. and Stoffel W. (2000). "Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11) : 5895-5900.
- Hoover D. S., Wingett D. G., Zhang J., Reeves R. and Magnuson N. S. (1997). "Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E." *Cell Growth Differ* **8**(12) : 1371-1380.

- Hsieh A. C. and Ruggero D. (2010). "Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer." *Clin Cancer Res* **16**(20) : 4914-4920.
- Huez I., Creancier L., Audigier S., Gensac M. C., Prats A. C. and Prats H. (1998). "Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA." *Mol Cell Biol* **18**(11) : 6178-6190.
- Humphreys D. T., Westman B. J., Martin D. I. and Preiss T. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47) : 16961-16966.
- Hunt T. (2002). "Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions." *Biosci Rep* **22**(5-6) : 465-486.
- Huntzinger E., Braun J. E., Heimstadt S., Zekri L. and Izaurralde E. (2010). "Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing." *Embo Journal* **29**(24) : 4146-4160.
- Iakoucheva L. M., Radivojac P., Brown C. J., O'Connor T. R., Sikes J. G., Obradovic Z. and Dunker A. K. (2004). "The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation." *Nucleic Acids Res* **32**(3) : 1037-1049.
- Iborra F. J., Jackson D. A. and Cook P. R. (2001). "Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells." *Science* **293**(5532) : 1139-1142.
- Imai Y., Gehrke S., Wang H. Q., Takahashi R., Hasegawa K., Oota E. and Lu B. (2008). "Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila." *Embo Journal* **27**(18) : 2432-2443.
- Imataka H., Gradi A. and Sonenberg N. (1998). "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation." *Embo Journal* **17**(24) : 7480-7489.
- Inui S., Sanjo H., Maeda K., Yamamoto H., Miyamoto E. and Sakaguchi N. (1998). "Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." *Blood* **92**(2) : 539-546.
- Isken O. and Maquat L. E. (2008). "The multiple lives of NMD factors : balancing roles in gene and genome regulation." *Nat Rev Genet* **9**(9) : 699-712.
- Jackson R. J., Hellen C. U. and Pestova T. V. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2) : 113-127.
- Jackson RJ S. N. (2007). "How do microRNAs regulate gene expression?" *Sci STKE* **(367):re1**.
- Jakymiw A., Lian S., Eystathioy T., Li S., Satoh M., Hamel J. C., Fritzler M. J. and Chan E. K. (2005). "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference." *Nat Cell Biol* **7**(12) : 1267-1274.
- Jayaraman P. S., Frampton J. and Goodwin G. (2000). "The homeodomain protein PRH influences the differentiation of haematopoietic cells." *Leuk Res* **24**(12) : 1023-1031.
- Jobling M. (1985). "Growth." *"Fish Energetics : New Perspectives"* (P. Tytler and P. Calow, eds) Croom Helm, London. : 213-230.
- Johannes G., Carter M. S., Eisen M. B., Brown P. O. and Sarnow P. (1999). "Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23) : 13118-13123.
- Johannes G. and Sarnow P. (1998). "Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites." *RNA* **4**(12) : 1500-1513.
- Jones R. M., Branda J., Johnston K. A., Polymenis M., Gadd M., Rustgi A., Callanan L. and Schmidt E. V. (1996). "An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc." *Mol Cell Biol* **16**(9) : 4754-4764.

- Joshi B., Cameron A. and Jagus R. (2004). "Characterization of mammalian eIF4E-family members." *Eur J Biochem* **271**(11) : 2189-2203.
- Joshi B., Lee K., Maeder D. L. and Jagus R. (2005). "Phylogenetic analysis of eIF4E-family members." *BMC Evol Biol* **5** : 48.
- Jung M. Y., Lorenz L. and Richter J. D. (2006). "Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein." *Mol Cell Biol* **26**(11) : 4277-4287.
- Kadyrova L. Y., Habara Y., Lee T. H. and Wharton R. P. (2007). "Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the Drosophila germline." *Development* **134**(8) : 1519-1527.
- Kahvejian A., Svitkin Y. V., Sukarieh R., M'Boutchou M. N. and Sonenberg N. (2005). "Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms." *Genes Dev* **19**(1) : 104-113.
- Kang MK H. S. (2011). "Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation." *BMB report* **44**(3):147-57.
- Karim M. M., Svitkin Y. V., Kahvejian A., De Crescenzo G., Costa-Mattioli M. and Sonenberg N. (2006). "A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(25) : 9494-9499.
- Kaye N. M., Emmett K. J., Merrick W. C. and Jankowsky E. (2009). "Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap." *J Biol Chem* **284**(26) : 17742-17750.
- Keene J. D. (2010). "Minireview : global regulation and dynamics of ribonucleic Acid." *Endocrinology* **151**(4) : 1391-1397.
- Kelleher R. J., 3rd, Govindarajan A., Jung H. Y., Kang H. and Tonegawa S. (2004). "Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory." *Cell* **116**(3) : 467-479.
- Kentsis A., Dwyer E. C., Perez J. M., Sharma M., Chen A., Pan Z. Q. and Borden K. L. (2001). "The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E." *J Mol Biol* **312**(4) : 609-623.
- Kim J. H. and Richter J. D. (2006). "Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation." *Mol Cell* **24**(2) : 173-183.
- King H. A., Cobbold L. C. and Willis A. E. (2010). "The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation." *Biochem Soc Trans* **38**(6) : 1581-1586.
- Kiriakidou M., Tan G. S., Lamprinaki S., De Planell-Saguer M., Nelson P. T. and Mourelatos Z. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." *Cell* **129**(6) : 1141-1151.
- Kleijn M., Scheper G. C., Wilson M. L., Tee A. R. and Proud C. G. (2002). "Localisation and regulation of the eIF4E-binding protein 4E-BP3." *FEBS Lett* **532**(3) : 319-323.
- Kong M., Fox C. J., Mu J., Solt L., Xu A., Cinalli R. M., Birnbaum M. J., Lindsten T. and Thompson C. B. (2004). "The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis." *Science* **306**(5696) : 695-698.
- Konicek B. W., Dumstorf C. A. and Graff J. R. (2008). "Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy." *Cell Cycle* **7**(16) : 2466-2471.
- Kosak M. (2006). "Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes." *Gene* **382**:1-11.
- Kremer C. L., Klein R. R., Mendelson J., Browne W., Samadzedeh L. K., Vanpatten K., Highstrom L., Pestano G. A. and Nagle R. B. (2006). "Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression." *Prostate* **66**(11) : 1203-1212.
- Kronja I. and Orr-Weaver T. L. (2011). "Translational regulation of the cell cycle : when, where, how and why?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1584) : 3638-3652.

- Kurzik-Dumke U. and Zengerle A. (1996). "Identification of a novel *Drosophila melanogaster* gene, angel, a member of a nested gene cluster at locus 59F4,5." *Biochim Biophys Acta* **1308**(3) : 177-181.
- Lachance P. E., Miron M., Raught B., Sonenberg N. and Lasko P. (2002). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth." *Mol Cell Biol* **22**(6) : 1656-1663.
- Lai H. K. and Borden K. L. (2000). "The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA." *Oncogene* **19**(13) : 1623-1634.
- Lazaris-Karatzas A., Montine K. S. and Sonenberg N. (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." *Nature* **345**(6275) : 544-547.
- Lazaris-Karatzas A. and Sonenberg N. (1992). "The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts." *Mol Cell Biol* **12**(3) : 1234-1238.
- Le X. F., Yang P. and Chang K. S. (1996). "Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML." *J Biol Chem* **271**(1) : 130-135.
- Lee S. K., Lee J. S., Shin K. S. and Yoo S. J. (2007). "Translation initiation factor 4E (eIF4E) is regulated by cell death inhibitor, Diap1." *Mol Cells* **24**(3) : 445-451.
- Lee V. H., Healy T., Fonseca B. D., Hayashi A. and Proud C. G. (2008). "Analysis of the regulatory motifs in eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1." *FEBS J* **275**(9) : 2185-2199.
- Lejbkowicz F., Goyer C., Darveau A., Neron S., Lemieux R. and Sonenberg N. (1992). "A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20) : 9612-9616.
- Li B. D., Liu L., Dawson M. and De Benedetti A. (1997). "Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma." *Cancer* **79**(12) : 2385-2390.
- Li Y., Yue P., Deng X., Ueda T., Fukunaga R., Khuri F. R. and Sun S. Y. (2010). "Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4F assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E." *Neoplasia* **12**(10) : 848-855.
- Lin C. L., Evans V., Shen S., Xing Y. and Richter J. D. (2010). "The nuclear experience of CPEB : implications for RNA processing and translational control." *RNA* **16**(2) : 338-348.
- Lin T. A., Kong X., Saltiel A. R., Blackshear P. J. and Lawrence J. C., Jr. (1995). "Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway." *J Biol Chem* **270**(31) : 18531-18538.
- Lin T. A. and Lawrence J. C., Jr. (1996). "Control of the translational regulators PHAS-I and PHAS-II by insulin and cAMP in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **271**(47) : 30199-30204.
- Ling J., Morley S. J. and Traugh J. A. (2005). "Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2." *Embo Journal* **24**(23) : 4094-4105.
- Liu G., Zhang Y., Bode A. M., Ma W. Y. and Dong Z. (2002). "Phosphorylation of 4E-BP1 is mediated by the p38/MSK1 pathway in response to UVB irradiation." *J Biol Chem* **277**(11) : 8810-8816.
- Liu H. Y., Toyn J. H., Chiang Y. C., Draper M. P., Johnston L. H. and Denis C. L. (1997). "DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex." *Embo Journal* **16**(17) : 5289-5298.
- Liu J., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J. and Parker R. (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7) : 719-723.
- Lopez-Maury L., Marguerat S. and Bahler J. (2008). "Tuning gene expression to changing environments : from rapid responses to evolutionary adaptation." *Nat Rev Genet* **9**(8) : 583-593.
- Ma X. M. and Blenis J. (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5) : 307-318.

- Mader S., Lee H., Pause A. and Sonenberg N. (1995). "The Translation Initiation-Factor Eif-4e Binds to a Common Motif Shared by the Translation Factor Eif-4-Gamma and the Translational Repressors 4e-Binding Proteins." *Molecular and Cellular Biology* **15**(9) : 4990-4997.
- Mamane Y., Petroulakis E., Rong L., Yoshida K., Ler L. W. and Sonenberg N. (2004). "eIF4E--from translation to transformation." *Oncogene* **23**(18) : 3172-3179.
- Maquat L. E., Tarn W. Y. and Isken O. (2010). "The pioneer round of translation : features and functions." *Cell* **142**(3) : 368-374.
- Marash L. and Kimchi A. (2005). "DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death." *Cell Death Differ* **12**(6) : 554-562.
- Marcotrigiano J., Gingras A. C., Sonenberg N. and Burley S. K. (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." *Cell* **89**(6) : 951-961.
- Marcotrigiano J., Gingras A. C., Sonenberg N. and Burley S. K. (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." *Mol Cell* **3**(6) : 707-716.
- Marissen W. E., Triyoso D., Younan P. and Lloyd R. E. (2004). "Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation." *Apoptosis* **9**(1) : 67-75.
- Martineau Y., Azar R., Bousquet C. and Pyronnet S. (2012). "Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins." *Oncogene*.
- Martineau Y., Derry M. C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J. J., Shyu A. B., Imataka H., Gehring K. and Sonenberg N. (2008). "Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation." *Mol Cell Biol* **28**(21) : 6658-6667.
- Matsuo H., Li H., McGuire A. M., Fletcher C. M., Gingras A. C., Sonenberg N. and Wagner G. (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." *Nat Struct Biol* **4**(9) : 717-724.
- McKendrick L., Morley S. J., Pain V. M., Jagus R. and Joshi B. (2001). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo." *Eur J Biochem* **268**(20) : 5375-5385.
- McKenzie E. A., Kent N. A., Dowell S. J., Moreno F., Bird L. E. and Mellor J. (1993). "The centromere and promoter factor, 1, CPF1, of *Saccharomyces cerevisiae* modulates gene activity through a family of factors including SPT21, RPD1 (SIN3), RPD3 and CCR4." *Mol Gen Genet* **240**(3) : 374-386.
- McMahon R., Zaborowska I. and Walsh D. (2011). "Noncytotoxic inhibition of viral infection through eIF4F-independent suppression of translation by 4EGI-1." *J Virol* **85**(2) : 853-864.
- Mendez R., Hake L. E., Andresson T., Littlepage L. E., Ruderman J. V. and Richter J. D. (2000). "Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA." *Nature* **404**(6775) : 302-307.
- Meszaros B., Tompa P., Simon I. and Dosztanyi Z. (2007). "Molecular principles of the interactions of disordered proteins." *J Mol Biol* **372**(2) : 549-561.
- Mili S., Shu H. J., Zhao Y. and Pinol-Roma S. (2001). "Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA : candidate intermediates in formation and export of mRNA." *Mol Cell Biol* **21**(21) : 7307-7319.
- Miller J. E. and Reese J. C. (2012). "Ccr4-Not complex : the control freak of eukaryotic cells." *Crit Rev Biochem Mol Biol*.
- Miyagi Y., Sugiyama A., Asai A., Okazaki T., Kuchino Y. and Kerr S. J. (1995). "Elevated levels of eukaryotic translation initiation factor eIF-4E, mRNA in a broad spectrum of transformed cell lines." *Cancer Lett* **91**(2) : 247-252.
- Miyoshi H., Youtani T., Ide H., Hori H., Okamoto K., Ishikawa M., Wakiyama M., Nishino T., Ishida T. and Miura K. (1999). "Binding analysis of *Xenopus laevis* translation initiation factor 4E (eIF4E) in initiation complex formation." *J Biochem* **126**(5) : 897-904.

- Mizuno A., In Y., Fujita Y., Abiko F., Miyagawa H., Kitamura K., Tomoo K. and Ishida T. (2008). "Importance of C-terminal flexible region of 4E-binding protein in binding with eukaryotic initiation factor 4E." *FEBS Lett* **582**(23-24) : 3439-3444.
- Moerke N. J., Aktas H., Chen H., Cantel S., Reibarkh M. Y., Fahmy A., Gross J. D., Degterev A., Yuan J., Chorev M., Halperin J. A. and Wagner G. (2007). "Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G." *Cell* **128**(2) : 257-267.
- Mokrejs M., Masek T., Vopalensky V., Hlubucek P., Delbos P. and Pospisek M. (2010). "IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue) : D131-136.
- Moore M. J. (2005). "From birth to death : the complex lives of eukaryotic mRNAs." *Science* **309**(5740) : 1514-1518.
- Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Morin E., Belle R., Bradham C. A., Beane W. S. and Cormier P. (2006). "Translational control genes in the sea urchin genome." *Dev Biol* **300**(1) : 293-307.
- Morita M., Ler L. W., Fabian M. R., Siddiqui N., Mullin M., Henderson V. C., Alain T., Fonseca B. D., Karashchuk G., Bennett C. F., Kabuta T., Higashi S., Larsson O., Topisirovic I., Smith R. J., Gingras A. C. and Sonenberg N. (2012). "A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development." *Mol Cell Biol*.
- Morita M., Suzuki T., Nakamura T., Yokoyama K., Miyasaka T. and Yamamoto T. (2007). "Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth." *Mol Cell Biol* **27**(13) : 4980-4990.
- Morley S. J. and Traugh J. A. (1989). "Phorbol esters stimulate phosphorylation of eukaryotic initiation factors 3, 4B, and 4F." *J Biol Chem* **264**(5) : 2401-2404.
- Mothe-Satney I., Yang D., Fadden P., Haystead T. A. and Lawrence J. C., Jr. (2000). "Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression." *Mol Cell Biol* **20**(10) : 3558-3567.
- Mu Z. M., Chin K. V., Liu J. H., Lozano G. and Chang K. S. (1994). "PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia." *Mol Cell Biol* **14**(10) : 6858-6867.
- Muckenthaler M., Gray N. K. and Hentze M. W. (1998). "IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F." *Mol Cell* **2**(3) : 383-388.
- Murata T. and Shimotohno K. (2006). "Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E." *J Biol Chem* **281**(30) : 20788-20800.
- Napoli I., Mercaldo V., Boyl P. P., Eleuteri B., Zalfa F., De Rubeis S., Di Marino D., Mohr E., Massimi M., Falconi M., Witke W., Costa-Mattioli M., Sonenberg N., Achsel T. and Bagni C. (2008). "The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP." *Cell* **134**(6) : 1042-1054.
- Nasmyth K. (2001). "A prize for proliferation." *Cell* **107**(6) : 689-701.
- Nedelec S., Foucher I., Brunet I., Bouillot C., Prochiantz A. and Trembleau A. (2004). "Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29) : 10815-10820.
- Nicchitta C. V., Lerner R. S., Stephens S. B., Dodd R. D. and Pyhtila B. (2005). "Pathways for compartmentalizing protein synthesis in eukaryotic cells : the template-partitioning model." *Biochem Cell Biol* **83**(6) : 687-695.
- Niedzwiecka A., Marcotrigiano J., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Wyslouch-Cieszynska A., Dadlez M., Gingras A. C., Mak P., Darzynkiewicz E., Sonenberg N., Burley S. K. and Stolarski R. (2002). "Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein : recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins." *J Mol Biol* **319**(3) : 615-635.
- Niessing D., Blanke S. and Jackle H. (2002). "Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation." *Genes Dev* **16**(19) : 2576-2582.

- Okumura F., Zou W. and Zhang D. E. (2007). "ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP." *Genes Dev* **21**(3) : 255-260.
- Oldfield C. J., Meng J., Yang J. Y., Yang M. Q., Uversky V. N. and Dunker A. K. (2008). "Flexible nets : disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners." *BMC Genomics* **9 Suppl 1** : S1.
- Orton K. C., Ling J., Waskiewicz A. J., Cooper J. A., Merrick W. C., Korneeva N. L., Rhoads R. E., Sonenberg N. and Traugh J. A. (2004). "Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk." *J Biol Chem* **279**(37) : 38649-38657.
- Othumpangat S., Kashon M. and Joseph P. (2005a). "Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride." *J Biol Chem* **280**(26) : 25162-25169.
- Othumpangat S., Kashon M. and Joseph P. (2005b). "Sodium arsenite-induced inhibition of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) results in cytotoxicity and cell death." *Mol Cell Biochem* **279**(1-2) : 123-131.
- Oulhen N., Boulben S., Bidinosti M., Morales J., Cormier P. and Cosson B. (2009). "A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system." *PLoS One* **4**(3) : e5070.
- Pacheco A., Lopez de Quinto S., Ramajo J., Fernandez N. and Martinez-Salas E. (2009). "A novel role for Gemin5 in mRNA translation." *Nucleic Acids Res* **37**(2) : 582-590.
- Paku K. S., Umenaga Y., Usui T., Fukuyo A., Mizuno A., In Y., Ishida T. and Tomoo K. (2012). "A conserved motif within the flexible C-terminus of the translational regulator 4E-BP is required for tight binding to the mRNA cap-binding protein eIF4E." *Biochem J* **441**(1) : 237-245.
- Pan P. and van Breukelen F. (2011). "Preference of IRES-mediated initiation of translation during hibernation in golden-mantled ground squirrels, *Spermophilus lateralis*." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(2) : R370-377.
- Paris J., Swenson K., Piwnica-Worms H. and Richter J. D. (1991). "Maturation-specific polyadenylation : in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein." *Genes Dev* **5**(9) : 1697-1708.
- Parker R. and Song H. (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2) : 121-127.
- Pascreau G., Delcros J. G., Cremet J. Y., Prigent C. and Arlot-Bonnemains Y. (2005). "Phosphorylation of maskin by Aurora-A participates in the control of sequential protein synthesis during *Xenopus laevis* oocyte maturation." *J Biol Chem* **280**(14) : 13415-13423.
- Passmore L. A., Schmeing T. M., Maag D., Applefield D. J., Acker M. G., Algire M. A., Lorsch J. R. and Ramakrishnan V. (2007). "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome." *Mol Cell* **26**(1) : 41-50.
- Pause A., Belsham G. J., Gingras A. C., Donze O., Lin T. A., Lawrence J. C., Jr. and Sonenberg N. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." *Nature* **371**(6500) : 762-767.
- Pelletier J. and Sonenberg N. (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." *Nature* **334**(6180) : 320-325.
- Pestova T. V., Kolupaeva V. G., Lomakin I. B., Pilipenko E. V., Shatsky I. N., Agol V. I. and Hellen C. U. (2001). "Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13) : 7029-7036.
- Peterson R. T., Desai B. N., Hardwick J. S. and Schreiber S. L. (1999). "Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycinassociated protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8) : 4438-4442.

- Petroulakis E., Parsyan A., Dowling R. J., LeBacquer O., Martineau Y., Bidinosti M., Larsson O., Alain T., Rong L., Mamane Y., Paquet M., Furic L., Topisirovic I., Shahbazian D., Livingstone M., Costa-Mattioli M., Teodoro J. G. and Sonenberg N. (2009). "p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs." *Cancer Cell* **16**(5) : 439-446.
- Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Artus C. G., Zoller T., Cougot N., Basuk E., Bertrand E. and Filipowicz W. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." *Science* **309**(5740) : 1573-1576.
- Platanias L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." *Nat Rev Immunol* **5**(5) : 375-386.
- Poulin F., Gingras A. C., Olsen H., Chevalier S. and Sonenberg N. (1998). "4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family." *J Biol Chem* **273**(22) : 14002-14007.
- Preiss T. and Hentze M. W. (2003). "Starting the protein synthesis machine : eukaryotic translation initiation." *Bioessays* **25**(12) : 1201-1211.
- Proud C. G. (2007). "Signalling to translation : how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery." *Biochem J* **403**(2) : 217-234.
- Ptushkina M., Malys N. and McCarthy J. E. (2004). "eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor." *EMBO Rep* **5**(3) : 311-316.
- Ptushkina M., von der Haar T., Karim M. M., Hughes J. M. and McCarthy J. E. (1999). "Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state." *Embo Journal* **18**(14) : 4068-4075.
- Pyronnet S. (2000). "Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1." *Biochem Pharmacol* **60**(8) : 1237-1243.
- Pyronnet S., Dostie J. and Sonenberg N. (2001). "Suppression of cap-dependent translation in mitosis." *Genes Dev* **15**(16) : 2083-2093.
- Pyronnet S., Imataka H., Gingras A. C., Fukunaga R., Hunter T. and Sonenberg N. (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." *Embo Journal* **18**(1) : 270-279.
- Pyronnet S. and Sonenberg N. (2001). "Cell-cycle-dependent translational control." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1) : 13-18.
- Qi S., Mizuno M., Yonezawa K., Nawa H. and Takei N. (2010). "Activation of mammalian target of rapamycin signaling in spatial learning." *Neurosci Res* **68**(2) : 88-93.
- Qin H., Raught B., Sonenberg N., Goldstein E. G. and Edelman A. M. (2003). "Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I." *J Biol Chem* **278**(49) : 48570-48579.
- Qin X. and Sarnow P. (2004). "Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(14) : 13721-13728.
- Rau M., Ohlmann T., Morley S. J. and Pain V. M. (1996). "A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate." *J Biol Chem* **271**(15) : 8983-8990.
- Raught B., Gingras A. C., Gygi S. P., Imataka H., Morino S., Gradi A., Aebersold R. and Sonenberg N. (2000). "Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI." *Embo Journal* **19**(3) : 434-444.
- Raught B. G. A. (2007). "Signaling to translation Initiation." *Cold Spring Harbor Laboratory Press* : 346-400.
- Remenyi A., Scholer H. R. and Wilmanns M. (2004). "Combinatorial control of gene expression." *Nat Struct Mol Biol* **11**(9) : 812-815.
- Richter J. D. (1999). "Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2) : 446-456.

- Richter J. D. and Sonenberg N. (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." *Nature* **433**(7025) : 477-480.
- Rivera-Pomar R., Niessing D., Schmidt-Ott U., Gehring W. J. and Jackle H. (1996). "RNA binding and translational suppression by bicoid." *Nature* **379**(6567) : 746-749.
- Robalino J., Joshi B., Fahrenkrug S. C. and Jagus R. (2004). "Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent." *J Biol Chem* **279**(11) : 10532-10541.
- Robert F. and Pelletier J. (2009). "Translation initiation : a critical signalling node in cancer." *Expert Opin Ther Targets* **13**(11) : 1279-1293.
- Rogers G. W., Jr., Richter N. J., Lima W. F. and Merrick W. C. (2001). "Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F." *J Biol Chem* **276**(33) : 30914-30922.
- Roig J., Huang Z., Lytle C. and Traugh J. A. (2000). "p21-activated protein kinase gamma-PAK is translocated and activated in response to hyperosmolarity. Implication of Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase in a two-step mechanism for gamma-PAK activation." *J Biol Chem* **275**(22) : 16933-16940.
- Roig J. and Traugh J. A. (1999). "p21-activated protein kinase gamma-PAK is activated by ionizing radiation and other DNA-damaging agents. Similarities and differences to alpha-PAK." *J Biol Chem* **274**(44) : 31119-31122.
- Roig J. and Traugh J. A. (2001). "Cytostatic p21 G protein-activated protein kinase gamma-PAK." *Vitam Horm* **62** : 167-198.
- Rojo F., Najera L., Lirola J., Jimenez J., Guzman M., Sabadell M. D., Baselga J. and Ramon y Cajal S. (2007). "4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis." *Clin Cancer Res* **13**(1) : 81-89.
- Rolli-Derkinderen M., Machavoine F., Baraban J. M., Grolleau A., Beretta L. and Dy M. (2003). "ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1." *J Biol Chem* **278**(21) : 18859-18867.
- Rom E., Kim H. C., Gingras A. C., Marcotrigiano J., Favre D., Olsen H., Burley S. K. and Sonenberg N. (1998). "Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein." *J Biol Chem* **273**(21) : 13104-13109.
- Rong L., Livingstone M., Sukarieh R., Petroulakis E., Gingras A. C., Crosby K., Smith B., Polakiewicz R. D., Pelletier J., Ferraiuolo M. A. and Sonenberg N. (2008). "Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs." *RNA* **14**(7) : 1318-1327.
- Rosenberg M. I., Lynch J. A. and Desplan C. (2009). "Heads and tails : evolution of antero-posterior patterning in insects." *Biochim Biophys Acta* **1789**(4) : 333-342.
- Rosettani P., Knapp S., Vismara M. G., Rusconi L. and Cameron A. D. (2007). "Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms." *J Mol Biol* **368**(3) : 691-705.
- Rousseau D., Gingras A. C., Pause A. and Sonenberg N. (1996a). "The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth." *Oncogene* **13**(11) : 2415-2420.
- Rousseau D., Kaspar R., Rosenwald I., Gehrke L. and Sonenberg N. (1996b). "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3) : 1065-1070.
- Ruggero D., Montanaro L., Ma L., Xu W., Londei P., Cordon-Cardo C. and Pandolfi P. P. (2004). "The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis." *Nat Med* **10**(5) : 484-486.
- Rutgers H. C., Batt R. M., Proud F. J., Sorensen S. H., Elwood C. M., Petrie G., Matthewman L. A., Forster-van Hijfte M. A., Boswood A., Entwistle M. and Fensome R. H. (1996). "Intestinal permeability and function in dogs with small intestinal bacterial overgrowth." *J Small Anim Pract* **37**(9) : 428-434.

- Salaun P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Belle R., Sonenberg N. and Cormier P. (2003). "eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo." *Dev Biol* **255**(2) : 428-439.
- Sarnow P. (1989). "Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro." *J Virol* **63**(1) : 467-470.
- Schalm S. S. and Blenis J. (2002). "Identification of a conserved motif required for mTOR signaling." *Curr Biol* **12**(8) : 632-639.
- Scheper G. C. and Proud C. G. (2002). "Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation?" *Eur J Biochem* **269**(22) : 5350-5359.
- Scheper G. C., van Kollenburg B., Hu J., Luo Y., Goss D. J. and Proud C. G. (2002). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA." *J Biol Chem* **277**(5) : 3303-3309.
- Schild D. (1995). "Suppression of a new allele of the yeast RAD52 gene by overexpression of RAD51, mutations in srs2 and ccr4, or mating-type heterozygosity." *Genetics* **140**(1) : 115-127.
- Schmidt E. V. (2004). "The role of c-myc in regulation of translation initiation." *Oncogene* **23**(18) : 3217-3221.
- Schneider R. J. and Mohr I. (2003). "Translation initiation and viral tricks." *Trends Biochem Sci* **28**(3) : 130-136.
- Schwanhausser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W. and Selbach M. (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." *Nature* **473**(7347) : 337-342.
- Schwede A., Ellis L., Luther J., Carrington M., Stoecklin G. and Clayton C. (2008). "A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells." *Nucleic Acids Res* **36**(10) : 3374-3388.
- Seibt J., Dumoulin M. C., Aton S. J., Coleman T., Watson A., Naidoo N. and Frank M. G. (2012). "Protein Synthesis during Sleep Consolidates Cortical Plasticity In Vivo." *Curr Biol* **22**(8) : 676-682.
- Semotok J. L., Cooperstock R. L., Pinder B. D., Vari H. K., Lipshitz H. D. and Smibert C. A. (2005). "Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early Drosophila embryo." *Curr Biol* **15**(4) : 284-294.
- Shen X., Tomoo K., Uchiyama S., Kobayashi Y. and Ishida T. (2001). "Structural and thermodynamic behavior of eukaryotic initiation factor 4E in supramolecular formation with 4E-binding protein 1 and mRNA cap analogue, studied by spectroscopic methods." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **49**(10) : 1299-1303.
- Sheth U. and Parker R. (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." *Science* **300**(5620) : 805-808.
- Shibata S., Morino S., Tomoo K., In Y. and Ishida T. (1998). "Effect of mRNA cap structure on eIF-4E phosphorylation and cap binding analyses using Ser209-mutated eIF-4Es." *Biochem Biophys Res Commun* **247**(2) : 213-216.
- Shih J. W., Tsai T. Y., Chao C. H. and Wu Lee Y. H. (2008). "Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein." *Oncogene* **27**(5) : 700-714.
- Shih J. W., Wang W. T., Tsai T. Y., Kuo C. Y., Li H. K. and Wu Lee Y. H. (2012). "Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response." *Biochem J* **441**(1) : 119-129.
- Shoemaker B. A., Portman J. J. and Wolynes P. G. (2000). "Speeding molecular recognition by using the folding funnel : the fly-casting mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16) : 8868-8873.
- Siddiqui N., Tempel W., Nedyalkova L., Volpon L., Wernimont A. K., Osborne M. J., Park H. W. and Borden K. L. (2012). "Structural insights into the allosteric effects of 4EBP1 on the eukaryotic translation initiation factor eIF4E." *J Mol Biol* **415**(5) : 781-792.

- Silvera D., Formenti S. C. and Schneider R. J. (2010). "Translational control in cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(4) : 254-266.
- Sonenberg N. (2008). "eIF4E, the mRNA cap-binding protein : from basic discovery to translational research." *Biochem Cell Biol* **86**(2) : 178-183.
- Sonenberg N. and Gingras A. C. (1998). "The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth." *Curr Opin Cell Biol* **10**(2) : 268-275.
- Sonenberg N. and Hinnebusch A. G. (2007). "New modes of translational control in development, behavior, and disease." *Mol Cell* **28**(5) : 721-729.
- Sonenberg N. and Hinnebusch A. G. (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes : mechanisms and biological targets." *Cell* **136**(4) : 731-745.
- Sonenberg N., Morgan M. A., Merrick W. C. and Shatkin A. J. (1978). "A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10) : 4843-4847.
- Sonoda J. and Wharton R. P. (2001). "Drosophila Brain Tumor is a translational repressor." *Genes Dev* **15**(6) : 762-773.
- Soto Rifo R., Ricci E. P., Decimo D., Moncorge O. and Ohlmann T. (2007). "Back to basics : the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation." *Nucleic Acids Res* **35**(18) : e121.
- Spassov D. S. and Jurecic R. (2003). "The PUF family of RNA-binding proteins : does evolutionarily conserved structure equal conserved function?" *IUBMB Life* **55**(7) : 359-366.
- St Johnston D. (2005). "Moving messages : the intracellular localization of mRNAs." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5) : 363-375.
- Stebbins-Boaz B., Cao Q., de Moor C. H., Mendez R. and Richter J. D. (1999). "Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E." *Mol Cell* **4**(6) : 1017-1027.
- Stoneley M. and Willis A. E. (2004). "Cellular internal ribosome entry segments : structures, trans-acting factors and regulation of gene expression." *Oncogene* **23**(18) : 3200-3207.
- Strudwick S. and Borden K. L. (2002). "The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus." *Differentiation* **70**(1) : 10-22.
- Sudhakar A., Ramachandran A., Ghosh S., Hasnain S. E., Kaufman R. J. and Ramaiah K. V. (2000). "Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B." *Biochemistry* **39**(42) : 12929-12938.
- Tait S., Dutta K., Cowburn D., Warwicker J., Doig A. J. and McCarthy J. E. (2010). "Local control of a disorder-order transition in 4E-BP1 underpins regulation of translation via eIF4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(41) : 17627-17632.
- Tee A. R. and Proud C. G. (2002). "Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif." *Mol Cell Biol* **22**(6) : 1674-1683.
- Teleman A. A., Chen Y. W. and Cohen S. M. (2005). "4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth." *Genes Dev* **19**(16) : 1844-1848.
- Teleman A. A., Hietakangas V., Sayadian A. C. and Cohen S. M. (2008). "Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in Drosophila." *Cell Metab* **7**(1) : 21-32.
- Temme C., Zaessinger S., Meyer S., Simonelig M. and Wahle E. (2004). "A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila." *Embo Journal* **23**(14) : 2862-2871.
- Temme C., Zhang L., Kremmer E., Ihling C., Chartier A., Sinz A., Simonelig M. and Wahle E. (2010). "Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation." *RNA* **16**(7) : 1356-1370.

- Tomoo K., Abiko F., Miyagawa H., Kitamura K. and Ishida T. (2006). "Effect of N-terminal region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide." *J Biochem* **140**(2) : 237-246.
- Tomoo K., Matsushita Y., Fujisaki H., Abiko F., Shen X., Taniguchi T., Miyagawa H., Kitamura K., Miura K. and Ishida T. (2005). "Structural basis for mRNA Cap-Binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods." *Biochim Biophys Acta* **1753**(2) : 191-208.
- Tompa P. and Csermely P. (2004). "The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones." *FASEB J* **18**(11) : 1169-1175.
- Tompa P. and Kovacs D. (2010). "Intrinsically disordered chaperones in plants and animals." *Biochem Cell Biol* **88**(2) : 167-174.
- Topisirovic I. and Borden K. L. (2005). "Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) : an unexpected relationship." *Histol Histopathol* **20**(4) : 1275-1284.
- Topisirovic I., Capili A. D. and Borden K. L. (2002). "Gamma interferon and cadmium treatments modulate eukaryotic initiation factor 4E-dependent mRNA transport of cyclin D1 in a PML-dependent manner." *Mol Cell Biol* **22**(17) : 6183-6198.
- Topisirovic I., Culjkovic B., Cohen N., Perez J. M., Skrabaneck L. and Borden K. L. (2003). "The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth." *Embo Journal* **22**(3) : 689-703.
- Topisirovic I., Kentsis A., Perez J. M., Guzman M. L., Jordan C. T. and Borden K. L. (2005). "Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels." *Mol Cell Biol* **25**(3) : 1100-1112.
- Topisirovic I., Siddiqui N., Lapointe V. L., Trost M., Thibault P., Bangeranye C., Pinol-Roma S. and Borden K. L. (2009). "Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP." *Embo Journal* **28**(8) : 1087-1098.
- Tsukiyama-Kohara K., Poulin F., Kohara M., DeMaria C. T., Cheng A., Wu Z., Gingras A. C., Katsume A., Elchebly M., Spiegelman B. M., Harper M. E., Tremblay M. L. and Sonenberg N. (2001). "Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1." *Nat Med* **7**(10) : 1128-1132.
- Tuazon P. T., Morley S. J., Dever T. E., Merrick W. C., Rhoads R. E. and Traugh J. A. (1990). "Association of initiation factor eIF-4E in a cap binding protein complex (eIF-4F) is critical for and enhances phosphorylation by protein kinase C." *J Biol Chem* **265**(18) : 10617-10621.
- Ueda T., Watanabe-Fukunaga R., Fukuyama H., Nagata S. and Fukunaga R. (2004). "Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development." *Mol Cell Biol* **24**(15) : 6539-6549.
- Umenaga Y., Paku K. S., In Y., Ishida T. and Tomoo K. (2011). "Identification and function of the second eIF4E-binding region in N-terminal domain of eIF4G : comparison with eIF4E-binding protein." *Biochem Biophys Res Commun* **414**(3) : 462-467.
- Vajanto I., Rissanen T. T., Rutanen J., Hiltunen M. O., Tuomisto T. T., Arve K., Narvanen O., Manninen H., Rasanen H., Hippelainen M., Alhava E. and Yla-Herttuala S. (2002). "Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ." *J Gene Med* **4**(4) : 371-380.
- Veyrune J. L., Campbell G. P., Wiseman J., Blanchard J. M. and Hesketh J. E. (1996). "A localisation signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and beta-globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes." *J Cell Sci* **109** (Pt 6) : 1185-1194.
- Volpon L., Osborne M. J., Capul A. A., de la Torre J. C. and Borden K. L. (2010). "Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12) : 5441-5446.

- Volpon L., Osborne M. J., Topisirovic I., Siddiqui N. and Borden K. L. (2006). "Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands." *Embo Journal* **25**(21) : 5138-5149.
- von der Haar T., Gross J. D., Wagner G. and McCarthy J. E. (2004). "The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression." *Nat Struct Mol Biol* **11**(6) : 503-511.
- Wagner E., Clement S. L. and Lykke-Andersen J. (2007). "An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies." *Mol Cell Biol* **27**(5) : 1686-1695.
- Walsh D. and Mohr I. (2004). "Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells." *Genes Dev* **18**(6) : 660-672.
- Walsh D., Perez C., Notary J. and Mohr I. (2005). "Regulation of the translation initiation factor eIF4F by multiple mechanisms in human cytomegalovirus-infected cells." *J Virol* **79**(13) : 8057-8064.
- Wan X., Mendoza A., Khanna C. and Helman L. J. (2005). "Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma." *Cancer Res* **65**(6) : 2406-2411.
- Wang S., Rosenwald I. B., Hutzler M. J., Pihan G. A., Savas L., Chen J. J. and Woda B. A. (1999). "Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas." *Am J Pathol* **155**(1) : 247-255.
- Wang X., Beugnet A., Murakami M., Yamanaka S. and Proud C. G. (2005). "Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins." *Mol Cell Biol* **25**(7) : 2558-2572.
- Wang X., Flynn A., Waskiewicz A. J., Webb B. L., Vries R. G., Baines I. A., Cooper J. A. and Proud C. G. (1998). "The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways." *J Biol Chem* **273**(16) : 9373-9377.
- Wang X., Li W., Parra J. L., Beugnet A. and Proud C. G. (2003). "The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation." *Mol Cell Biol* **23**(5) : 1546-1557.
- Wang Z. and Burge C. B. (2008). "Splicing regulation : from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code." *RNA* **14**(5) : 802-813.
- Warner J. R. (1999). "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." *Trends Biochem Sci* **24**(11) : 437-440.
- Waskiewicz A. J., Johnson J. C., Penn B., Mahalingam M., Kimball S. R. and Cooper J. A. (1999). "Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo." *Mol Cell Biol* **19**(3) : 1871-1880.
- Waters L. C., Strong S. L., Ferlemann E., Oka O., Muskett F. W., Neverka V., Banerjee S., Schmedt T., Henry A. J., Klempnauer K. H. and Carr M. D. (2011). "Structure of the tandem MA-3 region of Pdcd4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G : molecular mechanisms of a tumor suppressor." *J Biol Chem* **286**(19) : 17270-17280.
- Westmoreland T. J., Marks J. R., Olson J. A., Jr., Thompson E. M., Resnick M. A. and Bennett C. B. (2004). "Cell cycle progression in G1 and S phases is CCR4 dependent following ionizing radiation or replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* **3**(2) : 430-446.
- Whalen S. G., Gingras A. C., Amankwa L., Mader S., Branton P. E., Aebersold R. and Sonenberg N. (1996). "Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins." *J Biol Chem* **271**(20) : 11831-11837.
- Willett M., Brocard M., Davide A. and Morley S. J. (2011). "Translation initiation factors and active sites of protein synthesis co-localize at the leading edge of migrating fibroblasts." *Biochem J* **438**(1) : 217-227.
- Wreden C., Verrotti A. C., Schisa J. A., Lieberfarb M. E. and Strickland S. (1997). "Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA." *Development* **124**(15) : 3015-3023.

- Yamaguchi S., Ishihara H., Yamada T., Tamura A., Usui M., Tominaga R., Munakata Y., Satake C., Katagiri H., Tashiro F., Aburatani H., Tsukiyama-Kohara K., Miyazaki J., Sonenberg N. and Oka Y. (2008). "ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress." *Cell Metab* **7**(3) : 269-276.
- Yamashita A., Chang T. C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C. Y. and Shyu A. B. (2005). "Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover." *Nat Struct Mol Biol* **12**(12) : 1054-1063.
- Yanagiya A., Suyama E., Adachi H., Svitkin Y. V., Aza-Blanc P., Imataka H., Mikami S., Martineau Y., Ronai Z. A. and Sonenberg N. (2012). "Translational Homeostasis via the mRNA Cap-Binding Protein, eIF4E." *Mol Cell*.
- Yang H. S., Jansen A. P., Komar A. A., Zheng X., Merrick W. C., Costes S., Lockett S. J., Sonenberg N. and Colburn N. H. (2003). "The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." *Mol Cell Biol* **23**(1) : 26-37.
- Youtani T., Tomoo K., Ishida T., Miyoshi H. and Miura K. (2000). "Regulation of human eIF4E by 4E-BP1 : binding analysis using surface plasmon resonance." *IUBMB Life* **49**(1) : 27-31.
- Zekri L., Huntzinger E., Heimstadt S. and Izaurralde E. (2009). "The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release." *Mol Cell Biol* **29**(23) : 6220-6231.
- Zhang X., Virtanen A. and Kleiman F. E. (2010). "To polyadenylate or to deadenylate : that is the question." *Cell Cycle* **9**(22) : 4437-4449.
- Zhu N., Gu L., Findley H. W. and Zhou M. (2005). "Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53." *Biochem Biophys Res Commun* **335**(4) : 1272-1279.
- Zid B. M., Rogers A. N., Katewa S. D., Vargas M. A., Kolipinski M. C., Lu T. A., Benzer S. and Kapahi P. (2009). "4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in Drosophila." *Cell* **139**(1) : 149-160.
- Zuberek J., Kubacka D., Jablonowska A., Jemielity J., Stepinski J., Sonenberg N. and Darzynkiewicz E. (2007). "Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs." *RNA* **13**(5) : 691-697.