



HAL
open science

La phosphatase CDC25B: bases moléculaires de sa localisation intracellulaire et recherche de nouveaux partenaires

Noélie Davezac

► **To cite this version:**

Noélie Davezac. La phosphatase CDC25B: bases moléculaires de sa localisation intracellulaire et recherche de nouveaux partenaires. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2001. Français. NNT: . tel-00010040

HAL Id: tel-00010040

<https://theses.hal.science/tel-00010040>

Submitted on 6 Sep 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

année universitaire : 2001-2002

THESE

Présentée devant l'université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences)
En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Noélie Davezac

LA PHOSPHATASE CDC25B : BASES MOLECULAIRES DE SA LOCALISATION INTRA-CELLULAIRE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES

Soutenu le 18 décembre 2001

Jury :

Mr. Favre G., Professeur à l'université Paul Sabatier-Toulouse	président
Mme. Jesus C., Directeur de Recherche-CNRS-Paris	rapporteur
Mr. Lamb N., Directeur de Recherche-CNRS-Montpellier	rapporteur
Mlle Baldin V., Chargé de recherche-CNRS-Toulouse	Directeur de thèse
Mr Ducommun B., Professeur à l'université Paul Sabatier-Toulouse	Directeur UMR 5088

*Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération
Université Paul Sabatier-CNRS UMR 5088 IFR 109
118 route de Narbonne, Bat. IV.R3-B1, 31062 TOULOUSE CEDEX 4*

Je remercie monsieur le professeur Gilles Favre d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Madame Catherine Jessus et Monsieur Ned Lamb d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail et de participer au jury.

Je tiens à remercier Bernard Ducommun qui m'a accueillie dans son laboratoire du DEA à la thèse.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse, Véronique Baldin qui a su être présente tout en me laissant une grande liberté. Pour tout ça merci Véro.

Et puis une thèse, c'est une équipe alors merci Valérie, Martine, Nathalie, Karine, Béa, Mumu, Odile et Jean-pierre.

Je ne citerai pas tous les gens du « club mitos » mais je vous remercie tous pour la bonne humeur que vous mettez dans le labo.

Pascale, merci pour ta patience et tes conseils qui m'ont été précieux tout le long du monitorat.

Merci aussi à toute l'équipe d'Annie Valette et de Jean-Marie Darbon. qui ont toujours été là pour donner des conseils avisés. Merci aussi pour ces fous rires qui ont ponctué joyeusement ces trois années...

Et puis bien sûr un grand grand merci à tous mes proches qui m'ont soutenue tout le long de cette expérience.

Liste des abréviations

aa : acide aminé

ADNc : acide désoxyribonucléique (complémentaire)

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

CAK : kinase activatrice des CDKs

CamKII : kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type II

cdc : cycle de division cellulaire

CDK : kinase dépendante des cyclines

CKI : inhibiteur des CDKs

CKII : protéine kinase de type II

CKS : sous-unité associée aux CDK

DTT : di-thio-tréitol

FDP : fluorescéine diphosphate

GST : glutathion-S-transférase

MBP : maltose binding protein

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactoside

kDa : kilodalton

MPF : facteur induisant la maturation (maturation promoting factor)

SDS-PAGE : gel d'électrophorèse de polyacrylamide en présence de sodium-dodecyl-sulfate

PCR : réaction en chaîne de la polymérase

Tet : tétracycline

WB : western blot

NLS : signal de localisation nucléaire

NES : signal d'export nucléaire

NPC : complexe de pore nucléaire

IF : immunofluorescence

SOMMAIRE

CHAPITRE I : LE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE.	P 9
I.1. Définition du cycle cellulaire.	P 9
I.2. Les régulateurs du cycle cellulaire : les complexes CDK/Cycline, Découverte et caractérisation.	P 10
I.2.1. Le MPF (Maturation Promoting Factor).	P 10
I.2.2. Les approches génétiques.	P 11
I.2.3. Une famille de CDKs et de Cyclines.	P 11
I.3. Régulation de l'activité des CDKs dans les cellules de mammifères.	P 13
I.3.1. Interaction avec des protéines régulatrices:	P 13
A) Les cyclines.	P 13
B) Les protéines inhibitrices : les CKIs.	P 14
C) Autres protéines interagissant avec les CDKs.	P 16
I.3.2. Régulation de l'activité des CDKs par phosphorylation et déphosphorylation.	P 17
A) Phosphorylation activatrice.	P 17
B) Phosphorylation inhibitrice et déphosphorylation activatrice.	P 18
CHAPITRE II. CDC25 : REGULATEUR UNIVERSEL DU CYCLE CELLULAIRE.	P 19
II.1. Identification et rôle des phosphatases CDC25.	P 19

II.1.1. CDC25 est un régulateur de l'entrée en mitose chez <i>S. pombe</i> .	P 19
II.1.2. CDC25 est une phosphatase.	P 20
II.1.3. CDC25 est une phosphatase universelle.	P 21
II.1.4. Cibles des phosphatases CDC25 humaines.	P 21
II.2. Régulation de l'expression des phosphatases CDC25.	P 24
II.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel.	P 24
II.2.2. Régulation de l'expression protéique des phosphatases CDC25.	P 27
II.2.3. Régulation de l'activité des phosphatases CDC25.	P 28
II.2.3.1. Phosphorylation et régulation enzymatique de CDC25.	
A) Les complexes CDK/Cyclines.	P 29
B) Autres kinases impliquées dans la régulation de l'activité des phosphatases CDC25.	P 30
II.2.3.2. Phosphorylation et localisation cellulaire de CDC25.	P 33
II.2.3.3. Interaction avec des protéines régulatrices.	P 35
II.3. Les phosphatases CDC25 et les systèmes de surveillance.	P 39
II.3.1. Point de contrôle en G1/S.	P 39
II.3.2. Point de contrôle G2/M.	P 41
II.4. Les phosphatases CDC25 et l'oncogénèse.	P 44

CHAPITRE III. BASES MOLECULAIRES DE LA LOCALISATION INTRA-CELLULAIRE DES PHOSPHATASES CDC25B.

P 50

III.1. Le transport nucléocytoplasmique.	P 51
III.1.1. Structure et composants du pore nucléaire.	P 51

III.1.2. Les signaux d'import et d'export nucléaires.	P 52
A) Les signaux de localisation nucléaire NLS.	P 52
B) Les séquences d'export nucléaire NES.	P 53
III.2. Identification des domaines régulant la localisation de CDC25B.	P 54
III.3. Conclusions et perspectives.	P 62
CHAPITRE IV. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE CDC25B.	P 67
IV.1. CDC25B et la protéine kinase Eg3.	P 67
IV.1.1. La protéine kinase Eg3.	P 67
IV.1.2. Mise en évidence du complexe Eg3/CDC25B <i>in vivo</i> .	P 68
IV.1.3. Interaction <i>in vitro</i> .	P 71
IV.1.4. Détermination du site d'interaction sur CDC25B.	P 72
IV.1.5. Phosphorylation de CDC25B par Eg3.	P 73
A) La phosphorylation de CDC25B par Eg3 a-t-elle une répercussion sur l'interaction ?	P 75
B) Eg3 ne module pas l'activité phosphatase de CDC25 <i>in vitro</i> .	P 76
IV.1.6. CDC25B/Eg 3 : quel lien <i>in vivo</i> ?	P 76
IV.1.7. Conclusion et perspectives.	P 78
IV.2 Recherche de nouveaux partenaires <i>in vivo</i> .	P 80
IV.2.1. Etablissement et caractérisation du clone U2OS-tTA- HACDC25B2.11.G.	P 80
IV.2.2. Validation de notre approche.	P 81
IV.3. Recherche de partenaires de CDC25B <i>in vitro</i> .	P 84
IV.3.1. Production et purification de protéines recombinantes.	P 84

IV.3.2. Résultats préliminaires.	P 85
IV.4. Conclusions et Perspectives.	P 85
CHAPITRE V. MATERIEL ET METHODES.	P 90
V.1. Techniques relatives à la culture cellulaire.	P 90
V.1.1. Culture Cellulaire.	P 90
V.1.2. Transfections.	P 90
V.1.3. Marquages métaboliques <i>in vivo</i> .	P 91
V.1.4. Analyse par cytométrie de flux.	P 91
V.2. Expression et purification de protéines recombinantes.	P 91
V.2.1. Production et purification de protéines étiquetées MBP.	P 91
A) Expression chez <i>E. coli</i> .	P 91
B) Purification des protéines.	P 92
V.2.2. Production et purification de protéines étiquetées GST.	P 92
A) Expression chez <i>E. coli</i> .	P 92
B) Purification des protéines.	P 93
V.2.3. Expression de protéines dans le lysat de réticulocytes.	P 93
V.3. Interactions <i>in vitro</i> .	P 93
V.3.1. Interaction <i>in vitro</i> entre la kinase Eg3 et les phosphatases CDC25.	P 94
V.3.2. Interaction <i>in vitro</i> entre des protéines MBP ou MBP-CDC25B et des extraits de cellules HeLa.	P 95
V.4. Immunoprécipitations.	P 95
V.5. Phosphorylation des phosphatases CDC25 par la kinase Eg3 <i>in vitro</i> .	P 96
V.6. Mesure directe de l'activité phosphatase.	P 96

V.7. Méthodes relatives à l'analyse des protéines.	P 97
V.7.1. Electrophorèse SDS-PAGE.	P 97
V.7.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.	P 98
V.7.3. Immunodétection.	P 98
V.7.4. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.	P 98
V.7.5. Détection et quantification des protéines radioactives.	P 99
BIBLIOGRAPHIE.	P 100
ANNEXES.	

RESUME

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est gouvernée par une famille de complexes à activité protéine kinase : les complexes CDK/cycline. L'activité de ces complexes est régulée notamment par la déphosphorylation activatrice de résidus tyrosine et thréonine par les phosphatases à double spécificité CDC25. Trois phosphatases CDC25 ont été identifiées dans les cellules de mammifères, et lors de notre travail, nous avons étudié la phosphatase CDC25B.

Dans les cellules d'adénocarcinome humain (HeLa), nous avons montré que CDC25B présente une localisation nucléaire ou cytoplasmique stricte ou pan cellulaire, suggérant un trafic nucléo-cytoplasmique actif. Par des approches de mutagenèse dirigée et d'expression transitoire de la protéine sauvage ou mutante, nous avons identifié un signal de localisation nucléaire (NLS) et d'export nucléaire (NES) fonctionnels, et montré que la rétention cytoplasmique de CDC25B nécessite son interaction avec les protéines 14-3-3.

Afin de caractériser les mécanismes régulant la fonction de CDC25B *in vivo*, nous avons entrepris la recherche de nouveaux partenaires de cette phosphatase. Partant d'observations biochimiques : la phosphorylation *in vitro* de CDC25B par la protéine kinase Eg3, nous avons établi que ces deux protéines interagissent *in vivo*, dans une lignée surexprimant de manière conditionnelle CDC25B. Une collection de protéines mutantes de CDC25B, nous a permis d'identifier (i) le site d'interaction avec la protéine kinase Eg3, (ii) un site de phosphorylation. Aucune modification de l'activité phosphatase de CDC25B, phosphorylée par Eg3 n'est observée *in vitro*. Cependant, nous avons montré *in vivo*, par une analyse en cytométrie de flux, que l'expression de CDC25B est capable d'annuler l'accumulation des cellules en phase

G2 induite par la surexpression de Eg3. Ces derniers résultats suggèrent fortement une interaction fonctionnelle entre CDC25B et Eg3, dont les mécanismes *in vivo* restent à préciser.

L'isolement de nouveaux partenaires protéiques de CDC25B a été entrepris par leur co-purification grâce à l'utilisation de lignées U2OS exprimant HA-CDC25B de manière conditionnelle, ou de protéines recombinantes MBP-CDC25B. Certains problèmes techniques ne nous ont pas encore permis d'isoler des partenaires, mais les derniers résultats sont prometteurs.

INTRODUCTION

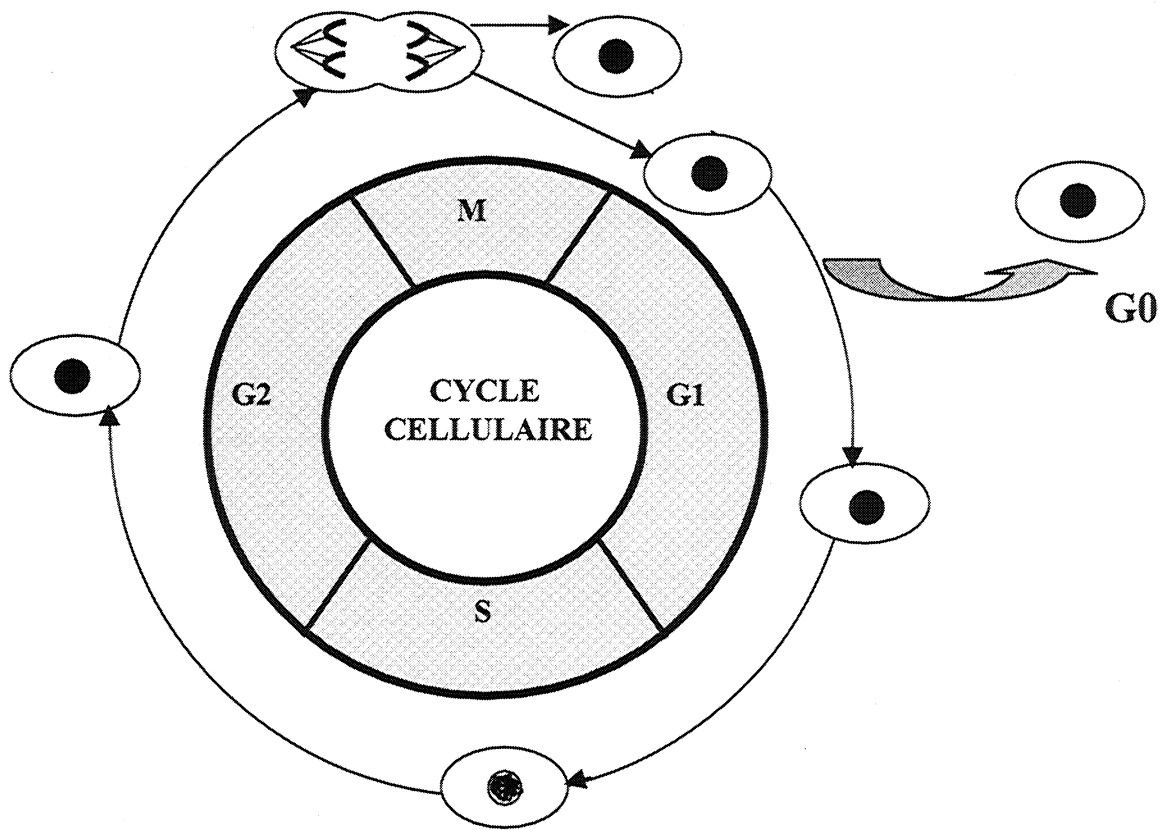


Figure 1: Le cycle de division des cellules eucaryotes:

Une cellule passe successivement quatre phases pour se diviser:

G1 (Gap1): période de croissance cellulaire caractérisée par une transcription et une synthèse active. Au cours de cette phase la cellule a la possibilité de sortir du cycle cellulaire pour entrer en G0, état de quiescence.

S (Synthèse d'ADN): caractérisée par la réplication du matériel génétique.

G2 (Gap2): phase de synthèse protéique nécessaire à l'accomplissement de la mitose.

M (Mitose): caractérisée par la condensation de la chromatine, la destruction de la membrane nucléaire et la mise en place du fuseau mitotique pour permettre la ségrégation des chromosomes puis la scission de la cellule en deux cellules filles.

CHAPITRE I : LE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE

I.1. Définition du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire correspond à une série d'évènements orchestrés dont les étapes successives doivent être chronologiquement achevées. Il peut être décrit comme la transition entre deux états : un état au cours duquel la cellule se prépare à la division et la mitose caractérisée par la ségrégation du matériel génétique suivie de la scission de la cellule en deux cellules filles. Quatre phases temporellement et fonctionnellement distinctes composent le cycle cellulaire des eucaryotes (Figure 1). La phase G1 (Gap1) est caractérisée par une transcription et une synthèse actives permettant l'accumulation de protéines nécessaires à l'accomplissement des étapes suivantes. Au cours de cette phase, la cellule a la possibilité de sortir du cycle pour entrer dans un état de quiescence (G0), si des facteurs environnementaux (facteurs de croissance ou éléments nutritionnels) ne sont pas favorables à sa prolifération ou bien si la cellule a reçu des signaux de différenciation. La phase S (Synthèse d'ADN) est la phase durant laquelle se déroule la réplication de l'ADN. Pendant la phase G2, les protéines nécessaires à la mitose sont synthétisées. Enfin, pendant la Mitose (Flemming, 1882; McCully and Robinow, 1971) pour revue (Mitchison and Salmon, 2001), la cellule condense sa chromatine, détruit sa membrane nucléaire et met en place un fuseau mitotique permettant la ségrégation des chromosomes. La dernière étape de la mitose aboutit à la scission de la cellule en deux cellules filles. Au cours du cycle, existent différents points de contrôle « checkpoints » nécessaires au bon déroulement du cycle de division (Murray and Hunt, 1993). La défaillance d'un

de ces mécanismes conduit à la perte de régulation du cycle et peut être à l'origine d'une prolifération anarchique des cellules.

I.2. Les régulateurs du cycle cellulaire : Découverte et caractérisation des complexes CDK/Cycline.

L'idée de l'existence de facteurs cellulaires capables d'induire certains évènements et d'informer la cellule sur sa position dans le cycle cellulaire résulte d'approches expérimentales basées sur la fusion cellulaire (Johnson and Rao, 1970; Johnson and Rao, 1971). La mise en évidence de ces facteurs de manières biochimique et génétique a permis de montrer que la progression des cellules dans le cycle s'effectue grâce à l'activation séquentielle de protéines kinases dépendantes des cyclines ou CDKs.

I.2.1. Le MPF (Maturation promoting factor).

Dans les années 1970, des études sur la maturation ovocytaire chez le xénope ont mis en évidence l'existence d'une activité cytoplasmique le Maturation Promoting Factor capable de déclencher la maturation méiotique d'un ovocyte immature (Masui and Markert, 1971). L'activité de ce facteur oscille durant le cycle cellulaire : son activité augmente à chaque entrée en mitose et diminue à l'entrée en interphase suivante. L'activation du MPF nécessite une synthèse protéique à chaque entrée en mitose, suggérant que l'expression de protéines particulières est nécessaire à l'activation du MPF. La découverte dans des œufs d'oursins d'une protéine : la cycline, synthétisée au cours de l'interphase et dégradée en mitose a conduit au premier modèle biochimique de l'activité MPF (Hunt, 1989). Dans ce modèle, la cycline était un composant ou un activateur du MPF, qui devait s'accumuler pour que la cellule puisse entrer en mitose, puis être dégradée pour la sortie de mitose (Evans et al., 1983). A partir d'œufs de xénope et d'invertébrés marins, il a été montré que le MPF est composé de deux polypeptides : une kinase homologue à la protéine kinase

CDC2 de levure et une cycline (Gautier et al., 1988; Labbé et al., 1988b; Labbé et al., 1988; Lohka et al., 1988).

I.2.2. Les approches génétiques.

En parallèle, afin d'identifier les gènes contrôlant le cycle cellulaire, deux organismes ont été utilisés : la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* et la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*. La mutagenèse aléatoire du génome de ces deux organismes a permis d'isoler des souches présentant des mutations thermosensibles affectant leur cycle de division cellulaire à température restrictive et d'identifier les gènes impliqués dans les phénotypes observés. Ces mutants appelés CDC^{ts} (Cycle de Division Cellulaire) ont ensuite été utilisés pour cribler une banque d'ADN génomique de chacune des levures (*S. pombe* et *S. cerevisiae*) dans un test de complémentation fonctionnelle. L'identification des gènes dont l'expression restaure la croissance cellulaire a permis de caractériser les gènes essentiels pour la progression des cellules dans leur cycle de division (Hartwell et al., 1974; Nurse, 1975). Ainsi, le gène *cdc2*, codant pour une protéine kinase chez *S. pombe* essentielle à l'entrée en mitose a été identifié (Nurse, 1975). La souche mutante pour *cdc2*, utilisée pour cribler une banque génomique de *S. cerevisiae* et d'ADNc humains a abouti à l'identification des gènes *cdc28* et *cdk1*, les homologues fonctionnels du gène *cdc2* dans ces deux organismes (Beach et al., 1982; Lee and Nurse, 1987). Des homologues de CDC2 ont été retrouvés dans tous les organismes étudiés attestant que la kinase CDC2 est une kinase universelle.

I.2.3. Une famille de CDKs et de Cyclines.

Par la suite, une kinase apparentée à CDC2 a été identifiée chez le xénope (Eg1) lors d'un crible différentiel d'expression d'ARN messagers (Paris et al., 1991) et chez l'homme (CDK2) par complémentation fonctionnelle d'un mutant de *S. cerevisiae*

CDK	CYCLINE	FONCTION
CDK1	A,B	G2 ET M
CDK2	A,E	G1 ET S
CDK3	?	?
CDK4	D	G1
CDK5	D,P35	Phosphorylation des neurofilaments
CDK6	D	G1
CDK7	H	Kinase activatrice des CDKs transcription avec TFIIH
CDK8	C	Régulation de l'ARN polymérase II
CDK9	T	Transcription
CDK10		Interagit avec un facteur de transcription Ets2
?	F	G2 ?
?	G	?
?	I	?
?	P	Appartient au groupe des cyclines A et B
?	M	Appartient au groupe des cyclines impliquées dans la transcription
?	O	Uracil DNA glycosylase 2

Figure 2: Les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines
(les références seront ajoutées)

(Elledge and Spottswood, 1991). Cette kinase est essentielle pour l'entrée et la progression en phase S.

Chez l'homme, la recherche d'ADNc apparentés à CDC2 par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a abouti à l'isolement de 10 ADNc (Meyerson et al., 1992) (Figure 2). Ces ADNc codent pour des protéines kinases pouvant s'associer à des cyclines, les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs. L'étude de leur activité (par surexpression ou microinjection d'anticorps neutralisant) a permis de caractériser leur fonction au cours du cycle cellulaire : l'activation séquentielle de CDK4 et CDK6 en G1, de CDK2 à la transition G1/S et en G2 puis de CDK1 à l'entrée en mitose, permet la progression des cellules dans les phases du cycle de division pour revue (Fisher, 1997; Lew and Kornbluth, 1996). Les autres CDK identifiées sont soit activées spécifiquement dans les neurones : CDK5 pour revue (Tang and Wang, 1996) soit impliquées dans la régulation de la transcription : CDK7 (Serizawa et al., 1995), CDK8 (Leclerc et al., 1996), CDK9 et CDK10 (Kasten and Giordano, 2001; Sergere et al., 2000) et ne participent pas directement au contrôle du cycle cellulaire pour revue (de Falco and Giordano, 1998; Leclerc and Leopold, 1996). Notons que CDK7 joue un rôle à la fois dans la transcription et le contrôle du cycle (cf I.3.2.A.)

L'expression des CDKs est constante au cours du cycle cellulaire et la régulation de leur activité est primordiale pour contrôler le bon déroulement du cycle de division. L'activation de ces kinases nécessite de manière générale leur association à des protéines régulatrices : les cyclines qui elles aussi appartiennent à une famille (Figure 2)(Morgan, 1995).

L'activité de la kinase est dépendante de la formation du complexe CDK/Cycline. Ces cyclines sont limitantes pour la progression dans le cycle cellulaire et s'accumulent comme leur nom l'indique de manière cyclique. Les cyclines

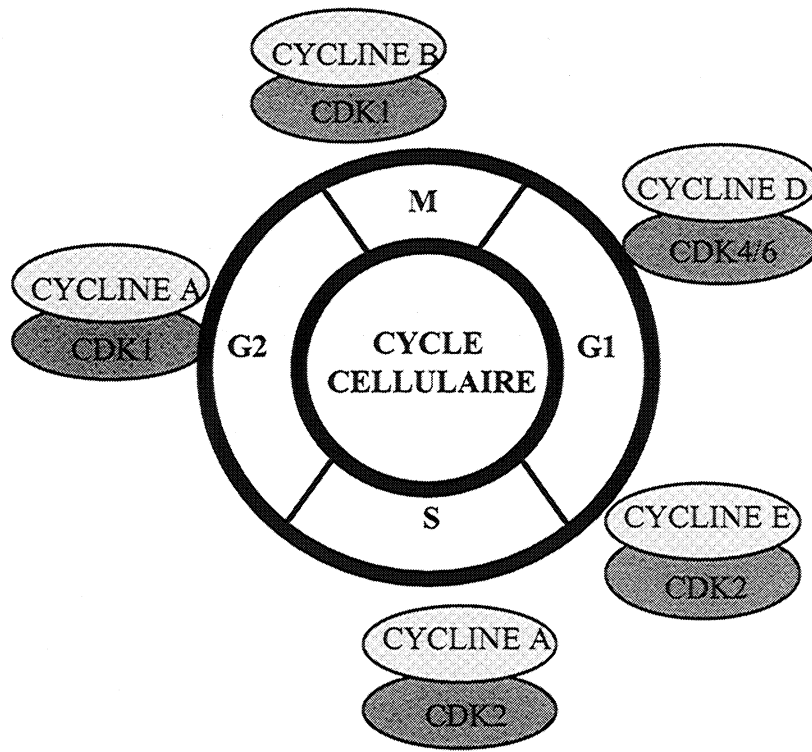


Figure 3: Les complexes CDK/Cyclines régissent l'horloge cellulaire.

Le cycle cellulaire correspond à une série d'événements orchestrés dont les étapes successives sont chronologiquement achevées par l'activation et l'inactivation séquentielle des complexes CDK/Cycline.

intervenant dans la régulation du cycle cellulaire se répartissent selon deux groupes, les cyclines de phase G1 (D et E) régulent la progression en G1 et la transition G1/S tandis que les cyclines G2 ou mitotiques (A et B), initialement identifiées sont nécessaires à la transition G2/M (Murray and Marks, 2001) (Pines, 1995) (Figure 2). Il existe également trois autres classes de cyclines impliquées dans la régulation de la transcription (C, H et T) (Murray and Marks, 2001). Très récemment, l'analyse du génome humain « séquencé » a permis la mise en évidence de nouvelles cyclines (Murray and Marks, 2001). Ainsi, l'homologue humain de la cycline B3 de poulet et trois nouvelles cyclines ont été identifiés. La cycline P est rattachée au groupe des cyclines A et B, la cycline M est reliée au groupe des cyclines qui régulent la transcription et une protéine initialement caractérisée comme une uracil-DNA glycosylase 2 et dont les similitudes avec des cyclines avaient été soulignées est appelée cycline O (Muller and Cardonna, 1993) (Figure 2). La fonction exacte de ces trois nouvelles cyclines est encore inconnue et reste à déterminer.

I.3. Régulation de l'activité des CDKs dans les cellules de mammifères.

I.3.1. Interaction avec des protéines régulatrices:

A) Les cyclines :

Le rôle régulateur des cyclines tient à trois propriétés essentielles.

La première est basée sur le caractère cyclique de l'expression de ces protéines. La cinétique d'expression spécifique de chaque cycline permet de réguler l'activation des CDKs en des points précis du cycle cellulaire (Figure 3). Différentes approches ont abouti à la mise en évidence de ces complexes : des coimmunoprécipitations, la neutralisation des activités par microinjection d'anticorps anti-CDK ou cycline ou encore la surexpression des différents constituants. La cycline D synthétisée en G1 s'associe avec les kinases CDK4 et 6 pour permettre la progression en G1 (Sherr, 1995). Puis la cycline E exprimée en fin de phase G1 interagit avec CDK2 (Dulic et

al., 1992) et enfin la cycline A interagit avec CDK2 et CDK1 (Pagano et al., 1992) pour réguler la réplication et l'avancée des cellules en phase G2. La cycline B, synthétisée depuis la fin de la phase S s'associe à CDK1 pour permettre l'entrée en mitose. La dégradation des cyclines est un mécanisme essentiel conduisant à l'inactivation des CDKs et induisant le passage dans la phase suivante du cycle cellulaire (exemple de la destruction de la cycline B pour que la cellule sorte de mitose (Clute and Pines, 1999)).

La seconde repose sur les changements conformationnels de la kinase associée à la cycline (Morgan, 1996). La structure cristalline du complexe CDK2/CyclineA/ATP a été déterminée. La cycline A se lie sur une des faces du site catalytique induisant de profonds changements conformationnels dans l'hélice PSTAIRE et dans la boucle T. Ces changements activent la kinase en réalignant les résidus du site actif et en enlevant le blocage stérique à l'entrée du site catalytique (Jeffrey et al., 1995).

La troisième propriété fait intervenir la spécificité de substrat (Cross et al., 1999; Draviam et al., 2001; Jacobson et al., 2000) pour revue (Pines, 1995). Notons pour exemple que le complexe CDK1/Cycline B1 provoque la condensation chromatinienne, la réorganisation des microtubules ou encore le désassemblage de la lamina nucléaire tandis que le complexe CDK1/Cycline B2 est restreint au désassemblage de l'appareil de golgi (Draviam et al., 2001).

B) Les protéines inhibitrices : les CKIs.

Les CKIs ou inhibiteurs des CDKs sont des molécules monomériques qui s'associent aux complexes CDK/Cycline dans la majorité des cas afin d'inhiber leur activité kinase (Elledge and Harper, 1994). Les CKIs relient les stimuli exogènes aux protéines régulatrices du cycle cellulaire. A l'heure actuelle, on distingue deux familles de CKIs, ceux qui se lient aux complexes CDK/Cycline et inhibent leur

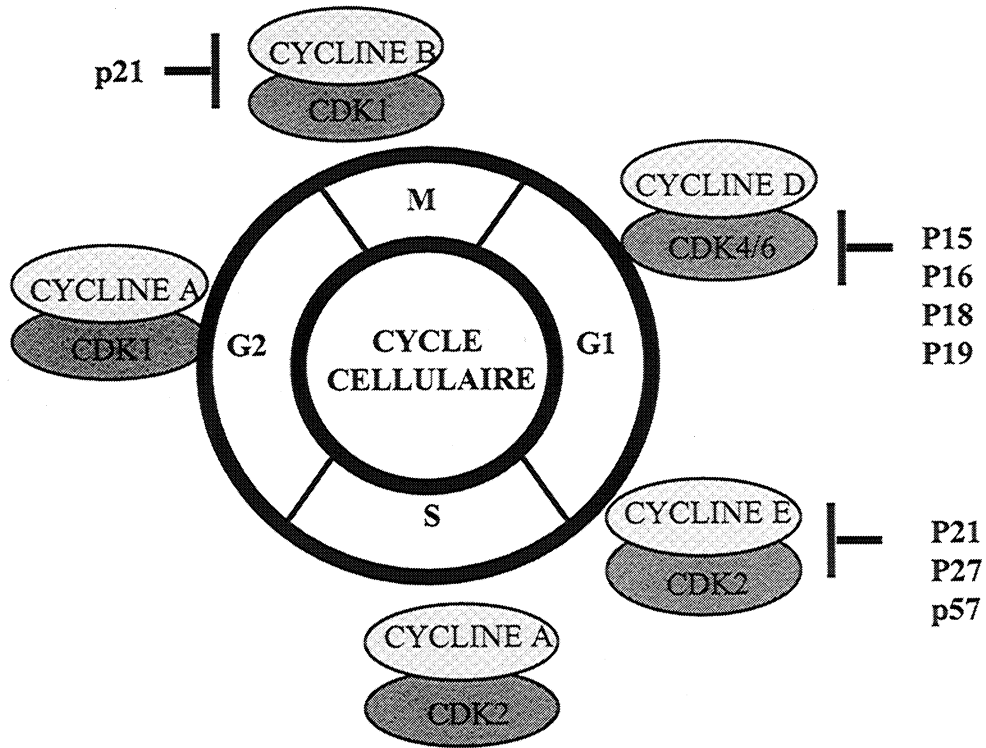


Figure 4: Les inhibiteurs de CDKs.

Des CKIs inhibent les complexes CDK/Cycline (famille de p21) ou se fixent sur les kinases CDKs (famille p15) et empêchent leur interaction avec les cyclines.

activité (famille de p21^{CIP1/WAF1/SDI1}) et ceux qui entrent en compétition avec les cyclines pour l'interaction avec les CDKs (famille de p16^{ink4})(Hall et al., 1995)(Figure 4).

La famille de p21 comprend deux autres membres p27^{KIP1} (Polyak et al., 1994) et p57^{KIP2} (Lee et al., 1995). Ces inhibiteurs sont impliqués à la transition G1/S et s'associent aux complexes CDK2/Cycline E ou A afin d'arrêter le cycle. Il existe différentes voies d'induction des inhibiteurs de CDKs. Après un dommage à l'ADN, où la voie de p53 est activée (Dulic et al., 1994; El-Deiry et al., 1993), on observe une augmentation de l'expression de p21 (Di Leonardo et al., 1994) aboutissant à un arrêt des cellules à la transition G1/S. La synthèse de l'ARNm de p21 peut également être induite indépendamment de p53, par exemple, par le facteur de transcription MyoD au cours de la différenciation terminale des cellules musculaires (Halevy et al., 1995), par le facteur de transcription STAT1 en réponse à l'interféron γ , par le récepteur nucléaire VDR (récepteur de la vitamine D3) après le traitement de cellules leucémiques par la vitamine D3 (Liu et al., 1996) ou par des facteurs de transcription de la famille Sp1 en réponse au TGF β (Li et al., 1995). Outre l'arrêt des cellules à la transition G1/S, l'induction de l'inhibiteur de CDKs p21 dans certains types cellulaires aboutit également à un arrêt du cycle en G2 (Cayrol et al., 1998; Niculescu et al., 1998). L'inhibiteur p21^{cip1} présente dans sa séquence un motif protéique appelé Cy, nécessaire pour l'interaction de cette protéine avec les cyclines afin d'inhiber les complexes CDK/Cycline. La phosphatase CDC25A possède elle aussi ce motif. Or, des expériences montrent que la phosphatase CDC25A entre en compétition avec l'inhibiteur p21^{cip1} pour la liaison avec la cycline E. Ainsi, il a été proposé que grâce au domaine Cy, l'interaction de CDC25A avec la cycline abolisse l'association de l'inhibiteur avec le complexe CDK2/Cycline E mais permette également l'activation de ce complexe par déphosphorylation, lors de l'entrée en phase S (Saha et al., 1997).

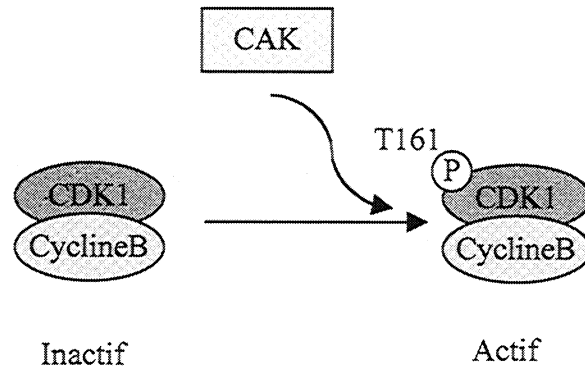
La deuxième famille appelée INK4 comprend 4 membres : p16^{INK4}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} (Figure 4). Ces protéines sont des inhibiteurs se liant spécifiquement aux kinases CDK4 et CDK6, empêchant ainsi la formation d'un complexe actif avec la cycline D (Hannon and Beach, 1994; Hirai et al., 1995; Serrano et al., 1993).

C) Autres protéines interagissant avec les CDKs.

Des protéines appelées sous-unités des CDKs ou CKS ont été également identifiées associées aux complexes CDK/Cycline. La protéine p13suc1, caractérisée initialement chez *S. pombe*, interagit avec la protéine CDC2 et est nécessaire aussi bien pour l'entrée que pour la sortie de mitose (Brizuela et al., 1987). Elle appartient à une famille de protéines dont les masses moléculaires théoriques s'échelonnent de 9 à 18 kDa. Ces protéines sont conservées de la levure à l'homme, où deux homologues CksHs1 et CksHs2 ont été caractérisés, et ont été trouvées associées à la kinase CDK2 (Richardson et al., 1990). Les structures cristallographiques de CksHs1 et de la kinase CDK2 associée à CksHs1 ont été décrites (Arvai et al., 1995; Jeffrey et al., 1995), mais au delà des connaissances sur la séquence ou la structure, très peu de choses sont connues sur la fonction exacte des Cks (Pines, 1996). Une interaction a été mise en évidence entre CksHs1 et P45^{SKP2} (une autre protéine connue pour interagir avec CDK2). Cette interaction pourrait intervenir dans la structure et la fonction des complexes de phase S Cycline/CDK2 (Mongay et al., 2001).

Très récemment, une protéine appelée RINGO a été décrite comme un nouveau régulateur de CDC2 dans le cycle cellulaire méiotique des œufs de xénope. Cette protéine ne s'apparente pas à la famille des cyclines, mais interagit et active les kinases CDK2 et CDC2 non associées aux cyclines. Ce mode de régulation pourrait être une alternative à l'activité des complexes CDK/Cyclines dans des conditions

A



B

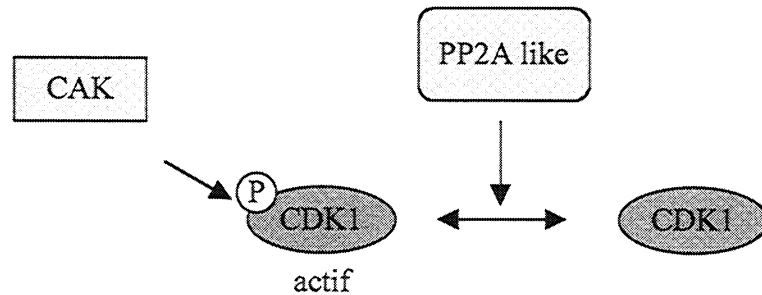


figure 5: Régulation de l'activité des CDKs: phosphorylation activatrice.

A) Le complexe CDK1/Cycline B est phosphorylé sur un résidu thréonine très conservé (T161) par la CAK qui active le complexe. B) Des monomères de CDK1 sont phosphorylés par la CAK et sont actifs sans interaction avec la cycline B1 (ovocytes de xénope).

particulières pour la cellule ou pour avoir une sous population de kinases servant de réservoir d'activité (Karaïskou et al., 2001).

I.3.2. Régulation de l'activité des CDKs par phosphorylation et déphosphorylation.

La seule association à des protéines activatrices ou inhibitrices n'est pas suffisante à la régulation des complexes CDK/cycline. En effet, il a été montré que ces complexes sont également régulés par modifications post-traductionnelles.

A) Phosphorylation activatrice.

L'activation des CDKs nécessite la phosphorylation d'un résidu thréonine dans un domaine très conservé: la thréonine 161 sur CDK1, la thréonine 160 (Solomon et al., 1992) pour CDK2 et 172 pour CDK4 (Kato et al., 1994b). Cette phosphorylation contribuerait, en fonction des complexes CDK/Cycline considérés, à la stabilisation de l'interaction de la CDK avec la cycline (Desai et al., 1995; Ducommun et al., 1991) (Figure 5A). Par ailleurs, l'analyse de la structure tridimensionnelle de CDK2 a permis de mettre en évidence que la phosphorylation de la thréonine 160 induit des changements conformationnels permettant de rendre accessible à l'ATP et aux substrats le site catalytique (De Bondt et al., 1993; Marcote et al., 1993). Une étude très récente du laboratoire de C. Jessus montre cependant pour la première fois chez un eucaryote supérieur que des molécules de CDC2 libres sont soumises au même type de régulation que CDC28 chez *S. Cerevisiae* : possibilité de phosphorylation et déphosphorylation du site Thr161 de CDC2 en l'absence de cycline. (C. Jessus 2000 colloque « Phosphorylation des protéines ») (Figure 5B).

Chez les mammifères, la kinase activatrice ou CAK est formée de CDK7/Cycline H/Mat1. La levure bourgeonnante utilise la kinase CAK1 (Morgan, 1997) tandis que la levure à fission possède les deux types de kinases Mcs6-Mcs2 (CDK7/Cycline H) et Csk1 (Cak1) qui peuvent activer les complexes CDK/Cycline

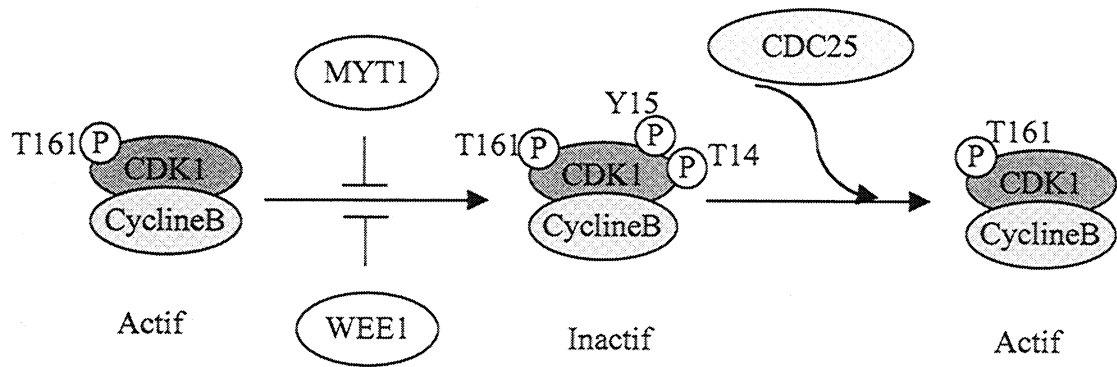


Figure 6: Phosphorylations inhibitrices et déphosphorylations activatrices.

Le complexe CDK1/Cycline B est inactivé par la phosphorylation sur deux résidus Y15 et T14 par les kinases WEE1 et MYT1 puis activé par la déphosphorylation de ces deux résidus par la phosphatase CDC25.

(Lee et al., 1999). Il n'y a pas d'homologue de CAK1 dans le génome humain, suggérant que l'espèce humaine et la levure à fission utilisent deux kinases différentes pour la même réaction. Il semble que cette étape soit une voie importante de la régulation de l'activité des CDKs étant donné qu'aucune régulation physiologique de CDK7/Cycline H ou de CAK1 n'est connue à ce jour (Murray and Marks, 2001). Chez les mammifères, la kinase CAK est impliquée dans la progression du cycle cellulaire mais également la réparation de l'ADN et la transcription par l'ARN polymérase II. Il a été montré que l'addition de MAT1 à un complexe CDK7/CyclineH induit un changement de substrat : la partie C terminale de l'ARN polymérase II est favorisée par rapport à la CDK2. La protéine MAT1 initialement reconnue comme facteur d'assemblage du complexe CDK7/CyclineH (Devault et al., 1995) agirait donc également sur la spécificité de substrat (Yankulov and Bentley, 1997).

B) Phosphorylation inhibitrice et déphosphorylation activatrice.

Les complexes CDK/Cycline nécessitent des phosphorylations activatrices mais doivent être maintenus dans un état inactif tant que leur fonction n'est pas requise. Interviennent alors des phosphorylations inhibitrices contrebalancées par des déphosphorylations activatrices lorsque la fonction du complexe CDK/Cycline est nécessaire.

Ce troisième niveau de régulation met en jeu une balance entre phosphorylation et déphosphorylation de deux résidus adjacents : la thréonine 14 et la tyrosine 15 (Krek and Nigg, 1991). Ces résidus sont conservés chez tous les membres de la famille CDK localisés au niveau du site de liaison à l'ATP (Coleman and Dunphy, 1994; Lew and Kornbluth, 1996). Ce mécanisme permet de maintenir les complexes CDK/Cycline dans un état inactif puis de les activer au moment précis où ils doivent jouer leur rôle (Figure 6). La protéine kinase WEE1, présente dans de nombreux organismes, a été

initialement identifiée chez la levure *S. pombe* comme un régulateur négatif de l'activité du complexe CDC2/Cycline B. Dans les cellules en interphase, WEE1 phosphoryle CDC2 sur le résidu tyrosine 15 afin d'empêcher son activation avant la mitose (McGowan and Russell, 1993; Parker et al., 1991; Russell and Nurse, 1987). La kinase MIK1 dont le rôle est partiellement redondant à celui de WEE1, phosphoryle aussi le résidu tyrosine 15 de CDC2 chez *S. pombe* (Lee et al., 1994; Lundgren et al., 1991).

Chez les eucaryotes supérieurs, une autre kinase MYT1 permet l'inhibition du complexe CDK1/Cycline B en phosphorylant la kinase sur le résidu thréonine 14 (Kornbluth et al., 1994; Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995). Cette kinase appartient à la famille de WEE1 (Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995) et sa particularité est une association à la membrane (Mueller et al., 1995). Cette régulation par phosphorylation est bien documentée pour le complexe CDK1/Cycline B, mais il n'en est pas de même pour les autres complexes CDK/Cycline (Gu et al., 1992; Terada et al., 1995).

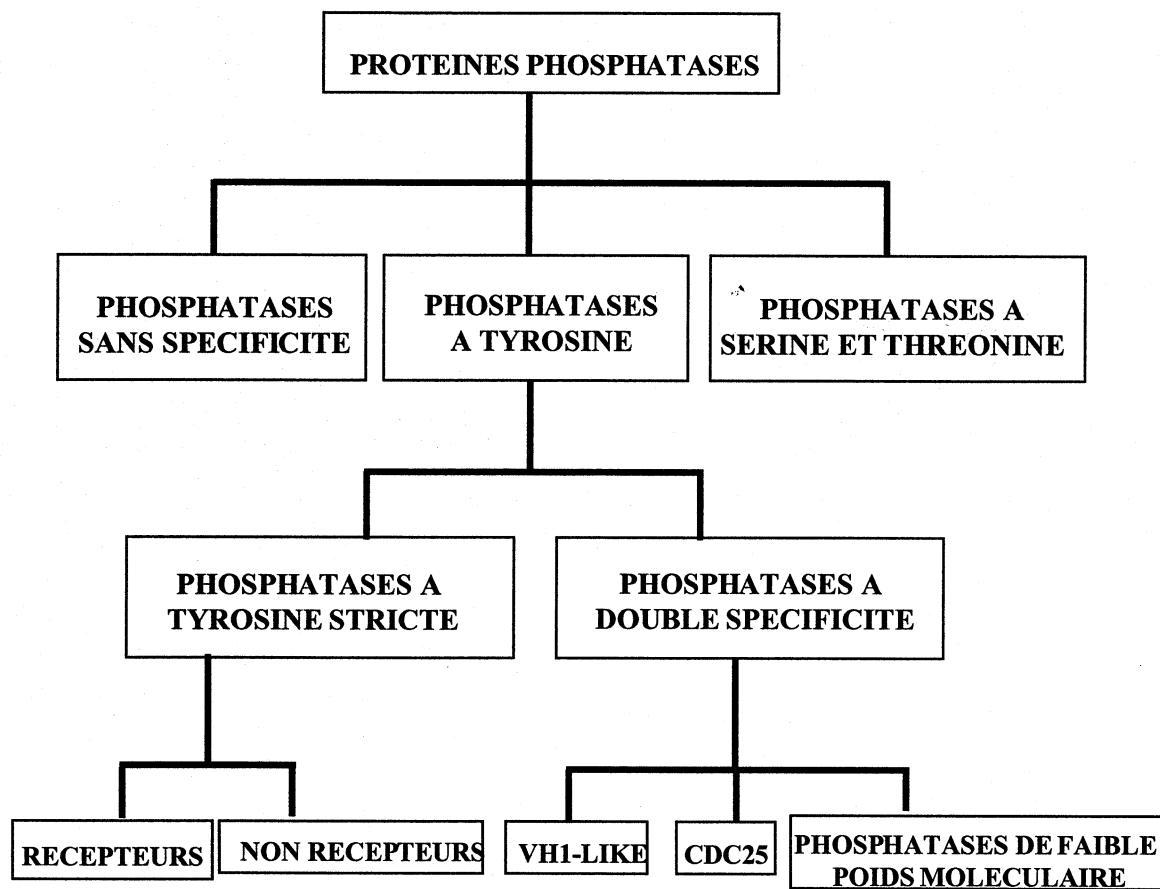
La déphosphorylation activatrice de ces deux résidus est assurée par la phosphatase CDC25 (Figure 6) qui fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE II. CDC25 : REGULATEUR UNIVERSEL DU CYCLE CELLULAIRE

II.1. Identification et rôle des phosphatases CDC25.

II.1.1. CDC25 est un régulateur de l'entrée en mitose chez *S. pombe*.

La mutation aléatoire du génome de *S. pombe* et l'obtention de souches mutantes CDC thermosensibles pour la croissance cellulaire, ont permis d'isoler le gène *cdc25* par complémentation fonctionnelle dans la souche *cdc25-22ts* et de montrer qu'il est essentiel pour l'entrée en mitose chez *S. pombe*. Par ailleurs, la surexpression de la protéine CDC25 dans une souche sauvage induit une entrée



Alignement de séquence entre VH1-like et CDC25

VH1-like

RVLVHCQAGISRSA

CDC25

I I V FHCE FSSERGP

Figure 7: Les différentes familles de phosphatases.

La hiérarchie proposée est basée sur la comparaison des séquences en acides aminés (d'après Fauman et Saper, 1996).

prématurée des cellules en mitose de manière dose dépendante. CDC25 est donc un régulateur de la transition G2/M (Russell and Nurse, 1986). L'inactivation du gène *cdc25* chez *S. pombe* entraîne un blocage des cellules en G2 caractérisé par l'accumulation du complexe CDC2/CyclineB inactif, car CDC2 est phosphorylée sur le résidu tyrosine 15 (Gould and Nurse, 1989; Russell and Nurse, 1986). Par ailleurs, un mutant de CDC2 (Tyrosine 15 remplacée par une phénylalanine non phosphorylable) induit l'entrée en mitose indépendamment de la fonction de CDC25. Ces résultats montrent que la protéine CDC25 est impliquée dans la déphosphorylation du complexe CDC2/Cycline B.

II.1.2. CDC25 est une phosphatase.

CDC25 semblait donc jouer un rôle dans la déphosphorylation de CDC2, cependant sa séquence ne la rapprochait pas d'une phosphatase. Des études biochimiques ont été réalisées *in vitro* avec la protéine CDC25 purifiée et ont montré qu'elle active directement le complexe CDC2/Cycline B en déphosphorylant le résidu tyrosine 15 de CDC2 (Gautier et al., 1991; Millar et al., 1991b; Strausfeld et al., 1991). Ces résultats démontrèrent que CDC25 était bien une phosphatase atypique. L'identification et la caractérisation de la phosphatase à double spécificité VH1 ont permis de classer les phosphatases CDC25 dans cette sous-famille (Guan et al., 1991) (Figure 7). Le motif HCXXXXXR commun aux phosphatases à tyrosine est présent sur CDC25. La mutation du résidu cystéine du motif HC en sérine entraîne l'inactivation de la protéine CDC25 (Gautier et al., 1991). La phosphatase CDC25 est capable d'hydrolyser le para-nitro-phényl-phosphate (pNPP), un composé synthétique dont la structure mime une tyrosine phosphorylée. L'activité enzymatique, localisée dans la région COOH de la protéine, est inhibée en présence d'orthovanadate de sodium, inhibiteur de phosphatases à tyrosine (Dunphy and Kumagai, 1991; Millar et al., 1991b). Contrairement à VH1, CDC25 présente une très grande spécificité de

ORGANISMES	HOMOLOGUE DE CDC25	REFERENCES
<i>S. Pombe</i>	CDC25	Russel and Nurse, 1986
<i>S. Cerevisiae</i>	MIH1	Russel et al, 1989
<i>A. nidulans</i>	NIMT	O'Connel et al, 1992
Drosophile	STRING TWINE	Edgar and O'Farrel, 1989 Alphey et al, 1992
Patelle	CDC25	Van der Kooij et al, 1996
Xénope	XCDC25-1 XCDC25-A	Kumagai and Dunphy, 1992 Okasaki et al, 1996
Souris	CDC25M1 CDC25M2	Nargi and Woodford-Thomas, 1994 Kazikuka et al, 1992
Homme	CDC25A CDC25B CDC25C	Galaktionov and Beach, 1991 Galaktionov and Beach, 1991 Nagata et al, 1991 Sadhu et al, 1990

Figure 8: Les phosphatases CDC25 dans différents organismes (liste non exhaustive).

substrats pour les complexes CDK/Cycline phosphorylés comparés aux autres protéines phosphorylées sur tyrosine comme p60src et la caséine ou encore le pNPP (Gautier et al., 1991). De plus, la nécessité d'agents réducteurs comme le di-thio-thréitol (DTT) pour leur activité *in vitro* et le rôle crucial de résidus acides aspartiques pour la catalyse font des phosphatases CDC25 des phosphatases à double spécificité non conventionnelles (Dunphy and Kumagai, 1991; Eckstein et al., 1996).

II.1.3 CDC25 est une phosphatase universelle.

Des homologues fonctionnels du gène *cdc25* de levure ont été identifiés dans de nombreux organismes (Figure 8) par complémentation de la souche *cdc25-22ts* de *S.pombe*, ou par PCR grâce à des amorces dégénérées des régions conservées de *cdc25* et de *mih1* (homologue de *cdc25* chez *S.Cerevisiae*). Chez l'homme, trois gènes distincts, codant pour les protéines CDC25A, CDC25B et CDC25C, sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Galaktionov and Beach, 1991; Nagata et al., 1991; Sadhu et al., 1990) (Figure 9).

Les différentes protéines CDC25 présentent une homologie de séquence relativement faible entre elles. Le pourcentage d'acides aminés identiques est de 25% sur la totalité de la séquence et de 45% au niveau de la région COOH-terminale sur un domaine de 20 kDa contenant le site catalytique. Malgré cette divergence de séquences, elles complètent de manière plus ou moins efficace la déficience fonctionnelle de CDC25 dans la souche *S. pombe cdc25-22^{ts}* (Edgar and O'Farrell, 1989; Galaktionov and Beach, 1991; Millar and Russell, 1992; Nagata et al., 1991; Sadhu et al., 1990).

II.1.4. Cibles des phosphatases CDC25 humaines.

Afin de connaître le point d'exécution et les cibles des différentes CDC25 de mammifères, plusieurs stratégies ont été utilisées comme l'utilisation d'anticorps neutralisant, d'oligonucléotides antisens ou encore la surexpression de ces protéines.

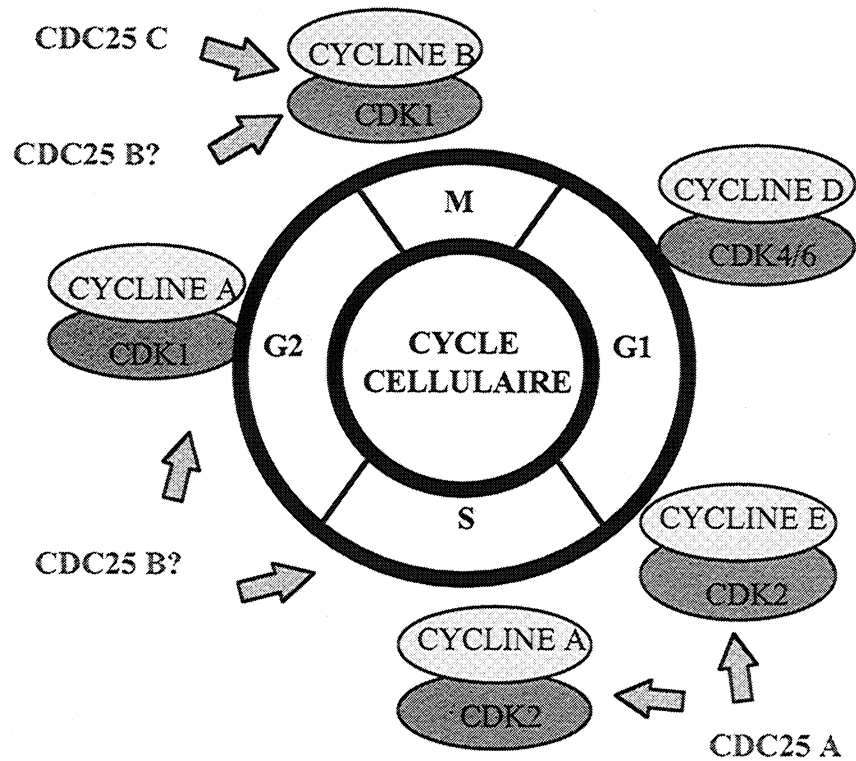


Figure 9: Point d'exécution des phosphatases CDC25 chez les mammifères.

La phosphatase CDC25C déclenche l'entrée en mitose en activant le complexe CDK1/Cycline B.

La phosphatase CDC25A permet le passage des cellules en phase S en activant le complexe CDK2/Cycline E et le complexe CDK2/Cycline A.

La ou les cibles de la phosphatase CDC25B ne sont pas encore clairement identifiées. Cependant, cette phosphatase aurait un rôle depuis la fin de la phase S jusqu'à l'entrée en mitose.

Ces différentes approches ont permis de placer chacune des phosphatases dans le cycle cellulaire (Figure 9).

L'inactivation de la phosphatase CDC25A avec des anticorps spécifiques entraîne l'inhibition de la synthèse d'ADN et induit par conséquent un arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (Hoffmann et al., 1994; Jinno et al., 1994). Par ailleurs, l'inactivation de la phosphatase CDC25B par la même technique entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Lammer et al., 1998) de même que pour CDC25C (Hoffmann et al., 1993). Ces résultats indiquent que CDC25C joue un rôle à la transition G2/M et sa cible est le complexe CDK1/Cycline B (Hoffmann et al., 1993; Millar et al., 1991a).

Ces résultats ont été confirmés par des approches de surexpression. La surexpression de la phosphatase CDC25B entraîne une accumulation des cellules en G2/M et induit la nucléation des microtubules au niveau des centrosomes. Ce changement dans la dynamique des microtubules, présumé être initié par l'activation du complexe CDK1/Cycline B au cours de la mitose, suggère que ce complexe soit une cible de CDC25B *in vivo* (Gabrielli et al., 1996). Dans des lignées stabilisées pour l'expression conditionnelle de CDC25A, l'expression ectopique de la phosphatase induit une accélération de l'entrée en phase S en activant de manière prématurée les complexes CDK2/Cycline E et CDK2/Cycline A (Blomberg and Hoffmann, 1999). Toutefois, la seule surexpression de CDC25C n'est pas suffisante à une entrée en mitose, la cotransfection de la cycline B est requise (Karlsson et al., 1999).

Enfin, l'utilisation d'oligonucléotides antisens, inhibant l'expression de CDC25B, aboutit à un arrêt des cellules en phase S (Garner-Hamrick and Fisher, 1998). Ces derniers résultats suggèrent que CDC25B soit également impliquée dans la progression en phase S.

In vitro, l'utilisation de protéines recombinantes CDC25 a permis également de préciser les cibles des différentes phosphatases humaines. Un mutant catalytiquement

inactif de la phosphatase CDC25A interagit fortement avec les complexes CDK2/Cycline A probablement par stabilisation du complexe enzyme–substrat (Xu and Burke, 1996).

Un travail similaire a été entrepris avec un mutant catalytiquement inactif de CDC25B. Ce mutant interagit *in vitro* avec le complexe CDK2/CyclineA responsable du contrôle de la progression en phase S (Xu and Burke, 1996). Toujours *in vitro*, la phosphatase CDC25B active les complexes CDK2/Cycline A et CDK1/Cycline B inactifs purifiés respectivement à partir d'un extrait cellulaire en phase S et en G2 (Lammer et al., 1998). Ces études réalisées *in vitro* précisent le caractère des cibles des phosphatases CDC25 plaçant CDC25A en amont des complexes CDK2/cycline E ou A et CDC25B en amont de CDK2 cycline A et CDK1/ Cycline B (Figure 9).

Pour résumer, l'ensemble de ces données expérimentales impliquent la phosphatase CDC25B dans la progression des cellules en phase S, en G2 et en mitose, la phosphatase CDC25A à la transition G1/S et en phase S et enfin, CDC25C à l'entrée en mitose (Figure 9).

Afin de comprendre la contribution unique de CDC25C dans le cycle cellulaire embryonnaire ou adulte, des souris délétées pour CDC25C ont été générées (Chen et al., 2001). La phosphorylation de CDC2, la cinétique d'entrée en mitose et la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN ne sont pas perturbées dans les cellules (MEFs) sans CDC25C, ce qui laisse supposer une prise de relais par les autres CDC25 (Chen et al., 2001).

Les complexes CDK/Cycline ne seraient pas les cibles uniques des phosphatases CDC25. En effet, la phosphatase CDC25A interagit également *in vivo* et *in vitro* avec le facteur de transcription CUT impliqué dans la prolifération cellulaire. La déphosphorylation de résidus sérine par CDC25A permet la liaison de CUT sur la TATA box du promoteur du gène codant pour le CKI p21cip1 permettant ainsi sa

répression (Coqueret et al., 1998). Ainsi, la phosphatase CDC25A par l'activation du complexe CDK2/Cycline E d'une part et l'inhibition de l'expression de l'inhibiteur p21^{cip1} d'autre part contrôle l'entrée des cellules en phase S.

II.2. Régulation de l'expression des phosphatases CDC25.

L'expression des protéines est le résultat d'une balance entre la régulation de la transcription, la synthèse et la dégradation des produits de traduction. Différents niveaux de régulation sont mis en œuvre selon les organismes pour CDC25.

II.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel.

Chez l'homme, un certain nombre d'éléments sont connus sur la régulation transcriptionnelle des phosphatases CDC25.

L'expression de l'ARN messager de la phosphatase CDC25C augmente progressivement pendant la phase S pour devenir maximale à la fin de la phase G2 et en mitose (Millar et al., 1991a; Sadhu et al., 1990). La transcription spécifique du gène *cdc25C* au cours des phases S, G2 et M est due à l'association périodique d'un répresseur sur les éléments CDE (élément dépendant du cycle cellulaire) contenus dans le promoteur du gène. Ainsi, la liaison de protéines spécifiques sur l'élément CDE répriment la transcription de *CDC25C*, mais aussi de *CDK1* et de la cycline A pendant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Lucibello et al., 1995; Zwicker et al., 1995). Cependant, bien qu'il y ait des différences au niveau transcriptionnel, la protéine présente un profil constant tout au long du cycle cellulaire.

L'ARNm de la phosphatase *CDC25A* présente une expression importante dès la fin de la phase G1 et pendant la phase S, contrairement à *CDC25B* et *C* (Jinno et al., 1994). Cette expression est régulée notamment par le facteur de transcription hétérodimérique Myc/Max en se fixant directement sur un motif consensus et spécifique CACGTG (Galaktionov et al., 1996). Inversement, l'inhibition de la transcription du gène *c-myc* par les cytokines, l'interféron α et le TGF β induit la

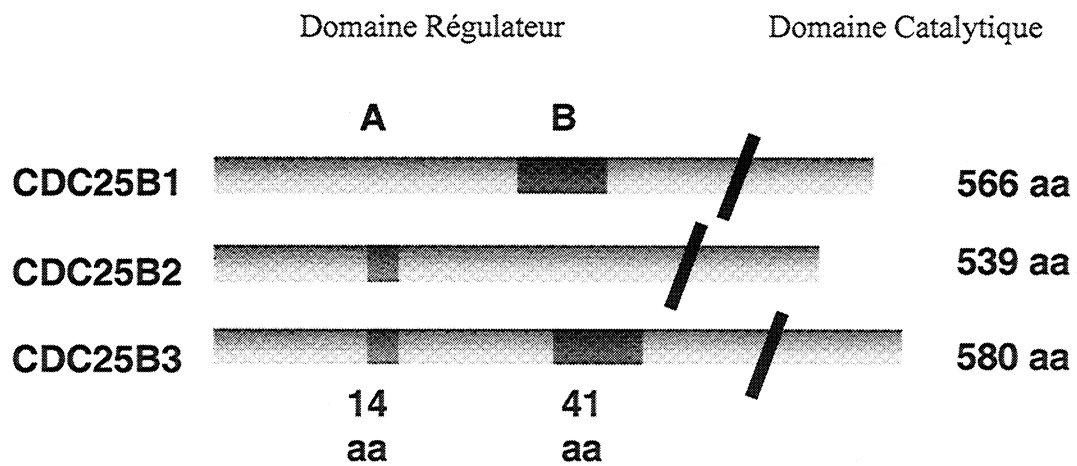


Figure 10: CDC25B1, B2 et B3, trois isoformes de la phosphatase CDC25B.
 Ces trois isoformes diffèrent par l'insertion ou la délétion de deux régions de 14 et 41 acides aminés localisées dans la partie amino-terminale de la phosphatase.

répression de l'expression du gène CDC25A et par conséquent l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (Iavarone and Massague, 1997; Tiefenbrun et al., 1996). Cependant la répression transcriptionnelle de CDC25A médiée par le TGF β dans les kératinocytes fait également intervenir un site E2F (Iavarone and Massague, 1999). CDC25A est une cible essentielle pour E2F1, dont l'activité est requise pour une induction efficace de la phase S par E2F1 et les membres de la famille Rb (Chen and Prywes, 1999; Vigo et al., 1999). L'équipe d'Ingrid Hoffmann a montré que la dérégulation du promoteur de CDC25A par le sérum pouvait être médiée au travers de deux sites d'attachement à E2F (Katich et al., 2001). Il est à noter que lors d'infection virale (HPV-16), la protéine E7 transactive le promoteur de CDC25A (Katich et al., 2001).

L'ARN messager de la phosphatase CDC25B s'accumule dès la phase S pour atteindre un maximum au cours de la phase G2 jusqu'en mitose (Jinno et al., 1994; Nagata et al., 1991). Le gène CDC25B, comme le gène de CDC25A possède un site de liaison à l'hétérodimère Myc/Max et serait régulé au niveau transcriptionnel par ce facteur de transcription (Galaktionov et al., 1996). Très récemment, une étude menée sur le promoteur du gène CDC25B murin a établi que l'activation du promoteur est largement médiée par NF-Y et SP1/3 en interagissant avec un des quatre sites d'attachement. Un élément répresseur (CCRR) serait essentiel à ce mécanisme (Korner et al., 2001). Ces données ouvrent donc une nouvelle voie tant pour la régulation des phosphatases CDC25 que pour d'autres régulateurs possédant ces éléments.

Au niveau transcriptionnel, un autre mode de régulation intervient pour les phosphatases: l'épissage alternatif.

Sur la base d'un crible fonctionnel réalisé chez *S. pombe*, trois ADNc CDC25B (CDC25B1, B2 et B3) humains ont été identifiés. Ils résultent d'un épissage alternatif du même ARN pré-messager (Baldin et al., 1997b)(Figure 10). Ces trois formes

diffèrent par l'insertion ou la délétion de deux séquences codant respectivement pour 14 et 41 acides aminés et localisées dans la séquence codant pour la partie N-terminale de la protéine, zone régulatrice de la protéine. L'expression relative de chaque variant d'épissage (ARNm) de CDC25B a été examinée par RT-PCR et montre une expression variable selon le type cellulaire testé (Baldin et al., 1997b). Plus récemment, deux autres formes de CDC25B ont été identifiées: CDC25B4 et B5 (Forrest et al., 1999). Ces deux nouveaux variants d'épissage se trouvent également dans la partie régulatrice de CDC25B. Ici encore, l'abondance des ARNm de ces différents isoformes de CDC25B est variable selon les lignées étudiées (Forrest et al., 1999). Ces variations de quantité des différentes formes de CDC25B amènent plusieurs questions. L'expression de tel ou tel variant d'épissage est elle liée à l'état transformé ou non de la cellule ? Différents travaux qui seront analysés plus loin (CDC25 oncogènes potentiels) suggèrent que cette hypothèse est fort probable. On ne peut cependant pas exclure que l'expression de certains variants soit dépendante du type cellulaire. En effet, le variant B3 est présent dans des fibroblastes primaires alors que les trois variants sont détectés dans des cellules d'origine épithéliale. Une autre hypothèse serait une évolution du patron d'expression des différents isoformes en fonction de l'âge de la cellule : dans des fibroblastes primaires embryonnaires seule la forme CDC25B3 est détectable (Baldin et al., 1997b).

Ce mode de régulation transcriptionnelle n'est pas spécifique à la phosphatase CDC25B. En effet, un mécanisme similaire vient d'être rapporté pour les phosphatases CDC25A et C (Wegener et al., 2000). Il existe quatre nouveaux variants de CDC25C (CDC25C2, C3, C4, C5) et un pour CDC25A. A l'exception d'un (CDC25C3), tous les variants ont un domaine catalytique intact. Les variations sont localisées dans la partie amino-terminale de la protéine entraînant la perte de sites de phosphorylation par les kinases CDK et la kinase CaMKII. La perte de ces sites de phosphorylation

induit probablement une activité phosphatase réduite et une fonction altérée. L'expression de ces nouveaux variants a été étudiée dans différentes lignées cellulaires : les transcrits les plus longs prédominent dans ces lignées tumorales suggérant qu'ils pourraient avoir un rôle dans les cellules à forte capacité de division (Wegener et al., 2000). La forme CDC25C5 est surexprimée dans des cellules en état de différenciation neuronale traitées par l'acide rétinoïque suggérant que CDC25 pourrait intervenir dans les processus de différenciation.

II.2.2. Régulation de l'expression protéique des phosphatases CDC25.

A l'heure actuelle, une seule étude est connue sur la régulation de la traduction des ARNm des phosphatases CDC25 et concerne la phosphatase CDC25 de *S. pombe*. Cette étude porte sur l'initiation de la traduction de l'ARN messager de *cdc25* médiée par le facteur d'initiation de traduction eucaryote (eIF4A). En construisant des souches de levure *S. pombe* possédant une activité réduite de eIF4A, les auteurs ont découvert que la traduction des ARNm de CDC25 était particulièrement sensible à cette réduction d'activité de eIF4A. Des approches génétiques et biochimiques ont montré que l'initiation de la traduction des ARNms de CDC25, exercée grâce à la partie 5' non traduite, agissait comme un senseur moléculaire afin qu'une masse cellulaire minimale (synthèse protéique) soit atteinte avant le début de la mitose (Daga and Jimenez, 1999). Par ailleurs, le taux de protéine CDC25 de *S.pombe* est régulé par ubiquitinylation et dégradation par le protéasome. L'invalidation du gène *pub1* codant pour la protéine ubiquitine ligase1 entraîne l'accumulation de la phosphatase et par conséquent l'activation prématurée de l'entrée en mitose (Nefsky and Beach, 1996).

Pour les phosphatases humaines, aucune étude sur la régulation traductionnelle des ARN messagers n'est publiée. Par contre, différents travaux ont été réalisés sur la stabilité de ces phosphatases.

Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré que la phosphatase CDC25B est dégradée par le protéasome. Cette dégradation est dépendante de la phosphorylation par le complexe CDK1/Cycline A alors que la phosphorylation par le complexe CDK1/Cycline B protège CDC25 de la dégradation (Baldin et al., 1997a; Cans et al., 1999). Deux systèmes cellulaires ont été utilisés pour l'étude *in vivo* suggérant que ce mécanisme est général. Aussi, nous pouvons envisager que la phosphorylation par le complexe CDK1/Cycline A régisse l'horloge de dégradation de CDC25B afin d'éviter une entrée précoce en mitose. Le fait que le complexe CDK1/Cycline B, activé postérieurement à CDK1/Cycline A, n'ait aucun effet sur cette dégradation argumente dans ce sens.

Plus récemment, des travaux ont montré que la phosphatase CDC25A est également dégradée par la machinerie ubiquitine-protéasome, soit dans des cellules cyclantes ou lors de la différenciation terminale de cellules myéloïdes (Bernardi et al., 2000). Par ailleurs, l'irradiation UVs de cellules d'ostéosarcomes U2OS ou de fibroblastes humains normaux IMR90 (Falck et al., 2001; Mailand et al., 2000) entraîne également la dégradation de CDC25A laissant penser que des dommages à l'ADN dans des cellules humaines aboutissent à la destruction spécifique de CDC25A. Enfin, dans un cycle normal (cellules HeLa transfectées par un vecteur exprimant de l'ubiquitine et traitées par un inhibiteur du protéasome) CDC25A est ubiquitinylée et augmente rapidement (Molinari et al., 2000). La dégradation protéasome dépendante de CDC25A semble donc un mécanisme général afin de moduler l'activité de CDC25A.

II.2.3. Régulation de l'activité des phosphatases CDC25.

Les phosphatases CDC25 possèdent une activité intrinsèque. Mais, la modulation de leur activité, passage d'un état de faible activité à un état de forte activité, leur confère des points d'exécution précis au cours du cycle cellulaire

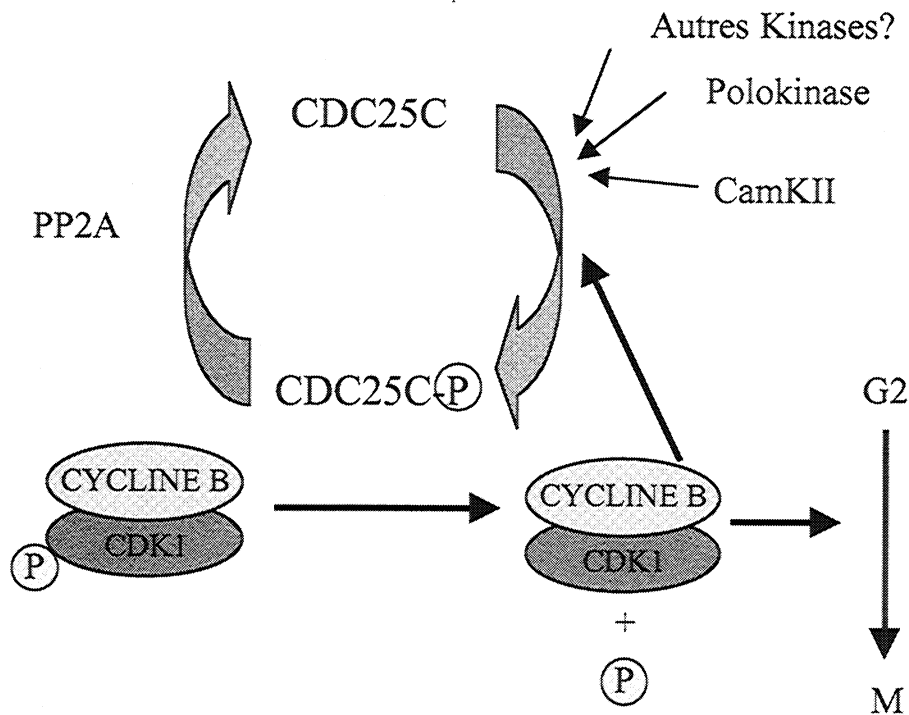


Figure 11: Régulation de l'activité de la phosphatase CDC25C.

La phosphorylation de CDC25C par le complexe CDK1/Cycline B permet l'activation de CDC25C, qui en retour va déphosphoryler et activer ce même complexe, pour permettre l'entrée des cellules en mitose (M).

D'autres kinases comme la polokinase ou la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type II (CamKII) phosphorylent et activent CDC25C. A l'opposé, la phosphatase PP2A régule négativement l'activité de CDC25C.

(Dunphy and Kumagai, 1991). L'activation de la phosphatase peut être directe mais peut également être la conséquence d'un changement de localisation intra-cellulaire. En effet, un changement de compartiment cellulaire peut séparer l'enzyme de son substrat et ainsi modifier l'activité de l'enzyme. Pour cela, deux mécanismes sont mis en jeu : la phosphorylation et l'interaction avec des partenaires.

II.2.3.1. Phosphorylation et régulation enzymatique de CDC25.

Les premières données sur la phosphorylation des phosphatases CDC25 mettent en jeu les cibles de ces phosphatases (complexes CDK/Cycline) établissant ainsi des boucles de rétrocontrôle (Figure 11).

A) Les complexes CDK/Cyclines.

L'augmentation de l'activité de la phosphatase CDC25C humaine, comme chez le xénope est corrélée à sa phosphorylation en mitose (Hoffmann et al., 1993; Jessus and Beach, 1992; Kumagai and Dunphy, 1992; Strausfeld et al., 1994). Des études réalisées *in vitro*, ont précisé que le complexe CDK1/CyclineB phosphoryle et active CDC25C (Hoffmann et al., 1993; Strausfeld et al., 1994). Ainsi, une boucle d'auto-amplification du signal est mise en place, dans laquelle la phosphatase CDC25C activée par le complexe CDK1/Cycline B déphosphoryle et active ce même complexe en retour et déclenche l'entrée des cellules en mitose (Hoffmann et al., 1993). Chez le xénope, les sites phosphorylés ont été identifiés. Il s'agit des résidus sérine et thréonine, présents dans un site consensus ST/PK tous localisés dans la région NH₂-terminale de la protéine CDC25 (Kumagai and Dunphy, 1992). La mutation de ces résidus prévient l'activation de la phosphatase CDC25 et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G₂ (Izumi and Maller, 1993). La déphosphorylation de CDC25C par la phosphatase à sérine et thréonine PP2A ramène l'activité phosphatase de CDC25C à son niveau basal et empêche ainsi l'activation du complexe CDK1/Cycline B tant que la réplication n'est pas achevée (Clarke et al., 1993; Kumagai and Dunphy, 1992). Ces

résultats argumentent en faveur de la nécessité de phosphorylation pour atteindre une activation optimale des phosphatases CDC25.

Un mécanisme identique mettant en jeu le complexe CDK2/Cycline E a été décrit pour la phosphatase CDC25A dont l'activité augmente au moment de l'entrée en phase S. En effet, l'immunodéplétion du complexe CDK2/CyclineE d'un extrait protéique de cellules en phase S inhibe la phosphorylation et l'activation de CDC25A normalement observées avec un extrait non déplété (Hoffmann et al., 1994). Ainsi, une boucle d'auto-amplification du signal, comparable à celle décrite pour CDC25C, permet l'activation de CDC25A pour déclencher l'entrée en phase S.

La régulation de l'activité enzymatique de CDC25B par les complexes CDK/Cycline semble différer sensiblement de celle des phosphatases CDC25A et C. *In vivo*, CDC25B est phosphorylée et active en phase G2 et M suggérant donc que 1) la phosphorylation est importante pour l'activation de CDC25B au cours de ces phases et 2) laisse penser que le complexe CDK1/Cycline B pourrait être impliqué (Lammer et al., 1998). Cependant, des travaux en cours dans le laboratoire (Baldin et al, soumis) montrent qu'*in vitro* tous les complexes CDK/Cycline testés bien que phosphorylant les trois isoformes de CDC25B n'induisent pas d'augmentation de l'activité intrinsèque de la phosphatase. Il semblerait donc que la régulation de CDC25B par les complexes CDK/Cycline échappe au mécanisme décrit précédemment pour CDC25A et C.

B) Autres kinases impliquées dans la régulation de l'activité des phosphatases CDC25.

Si les complexes CDK/Cycline sont des régulateurs importants de l'activité des phosphatases CDC25, ils ne sont pas les seuls et de nombreuses données de la littérature montrent que d'autres kinases sont impliquées dans la régulation de leur activité et de ce fait de leur fonction (Figure 11).

- Les Polo kinases.

Les polokinases, qui forment une famille, sont impliquées dans de nombreux évènements cellulaires permettant le déroulement de la mitose : la destruction de la membrane nucléaire, la mise en place du fuseau mitotique, la condensation des chromosomes et la cytokinèse (pour revue (Glover et al., 1996; Nigg, 1998). Elles ont été identifiées dans des organismes aussi phylogénétiquement éloignés que sont la levure *S. Cerevisiae* (Kitada et al., 1993), la drosophile, le xénope (Descombes and Nigg, 1998) et l'homme (Hamanaka et al., 1994) (Li et al., 1996) (Genbank accession # AF059617). Chez le xénope, la kinase Plx1, co-purifiant avec CDC25, phosphoryle et active la phosphatase (Kumagaï and Dunphy, 1996). La phosphorylation de CDC25C par cette kinase est requise pour initier la boucle d'auto-amplification conduisant à l'activation du complexe CDK1/CyclineB nécessaire à l'entrée en mitose (Abrieu et al., 1998). Chez les mammifères, trois kinases apparentées, PLK1, PRK/FNK et SNK constituent la famille des Polo Kinases (Lane and Nigg, 1997). Les kinases humaines PLK1, dont l'activation est concomitante à celle du complexe CDK1/Cycline B en mitose, et PRK/FNK exprimée dans les étapes précoces du cycle cellulaire, pourraient réguler également l'activité des phosphatases CDC25 (Li et al., 1996). La démonstration a été réalisée pour la kinase PLK1 qui phosphoryle et active la phosphatase CDC25C (Roshak et al., 2000). Cependant, une étude réalisée chez le xénope montre que la phosphorylation de CDC25 par le complexe CDK1/Cycline B et la kinase Plx1 n'est pas suffisante pour activer la phosphatase *in vivo* (Karaiskou et al., 1998). Ainsi, le déclenchement de l'entrée en mitose par l'activation de la phosphatase serait la résultante d'un mécanisme complexe de phosphorylation au cours duquel d'autre(s) kinase(s) jouerai(ent) un rôle essentiel.

- la kinase CamKII.

Cette kinase est un membre de la superfamille des kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline, ubiquitaires, régulant de nombreux processus cellulaires et notamment le cycle cellulaire où le calcium, second messager intra-cellulaire, intervient (pour revue (Schulman, 1993; Torok et al., 1998)). L'inactivation de la kinase CamKII, soit par la microinjection d'anticorps spécifiques, soit par l'utilisation d'un inhibiteur chimique, KN-93, induit un blocage des cellules humaines à la transition G2/M. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que la kinase CamKII phosphoryle et active directement la phosphatase CDC25C (Patel et al., 1999). Ces données suggèrent que cette kinase joue un rôle important dans le contrôle de l'entrée en mitose et pourrait participer à l'activation de CDC25C *in vivo* .

- la protéine kinase CKII.

La protéine kinase CKII est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire très conservée et composée de deux sous-unité catalytiquement actives (α et/ou α') et de deux sous-unités régulatrices (β). La protéine kinase CKII est nécessaire en phase G1 (Lorenz et al., 1994; Russo et al., 1992) mais également à la transition G2/M (Escargueil et al., 2000; Ford et al., 2000; Hanna et al., 1995). Des travaux réalisés dans notre laboratoire montrent que la protéine kinase CKII phosphoryle *in vitro* les différentes formes de CDC25B, et que ces deux protéines interagissent aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Theis-Febvre et al, en préparation). L'interaction et/ou la phosphorylation de CDC25B par CKII aboutit à une activation de la phosphatase (*in vitro* et *in vivo*). Le rôle physiologique de cette phosphorylation n'est pas encore clairement établi, mais il est envisageable qu'elle intervienne dans l'étape d'initiation de la nucléation des microtubules (Gabrielli et al., 1996) ou bien qu'elle soit l'amorce de l'activation de CDC25B pour son rôle « starter » de l'entrée en mitose.

- la kinase Raf : un modulateur de CDC25.

La kinase Raf, impliquée dans la signalisation cellulaire, (pour revue : (Campbell et al., 1998; Kerkhoff and Rapp, 1998; Rommel and Hafen, 1998)), interagit avec CDC25A et CDC25B *in vivo* et *in vitro*. La phosphorylation de CDC25A par Raf entraîne une augmentation de son activité catalytique. Par ailleurs, une co-localisation de la protéine GTPase Ras, de la kinase Raf et des phosphatases CDC25A ou B sous la membrane plasmique dans les cellules humaines HeLa a été mise en évidence (Galaktionov et al., 1995a). Ces résultats suggèrent que les phosphatases CDC25A et/ou B soient recrutées et activées dans un complexe multimoléculaire Ras-Raf-CDC25 pour permettre l'entrée en phase S en réponse à des signaux extra-cellulaires de prolifération. Ainsi, les phosphatases CDC25A et B permettraient une connexion directe entre les voies de signalisation cellulaire activée par les facteurs de croissance et le cycle cellulaire.

Chez le xénope, l'association de Raf avec CDC25 permettant la phosphorylation et l'activation de la phosphatase contribuerait à l'activation du complexe CDK1/Cycline B pour induire la maturation ovocytaire après une stimulation par la progestérone (pour revue (Jesus and Ozon, 1995)).

II.2.3.2. Phosphorylation et localisation cellulaire de CDC25.

La localisation intra-cellulaire des protéines peut aussi intervenir pour la régulation de leur fonction c'est le cas par exemple des facteurs de transcription ou de certaines kinases (MAP kinases) (pour revue (Lavoie et al., 1996)). Les phosphatases CDC25 semblent elles aussi être soumises à des changements de localisation cellulaire impliquant une régulation de l'activité. Nous ne traiterons dans ce paragraphe que l'implication des phosphorylations sur les localisations intra-cellulaires des phosphatases CDC25, la localisation intra-cellulaire de ces phosphatases sera présentée et discutée dans le chapitre III.

Lors des dommages à l'ADN, les kinases humaines CHK1 et CHK2 (CDS1 chez *S. pombe*) (cf chapitre III), impliquées dans des mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome, phosphorylent le résidu sérine 216 de la phosphatase CDC25C lorsque l'ADN est endommagé ou n'est pas correctement répliqué (Blasina et al., 1999; Furnari et al., 1997; Matsuoka et al., 1998; Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Zeng et al., 1998). La phosphorylation de CDC25 par ces kinases provoque son association avec les protéines de la famille 14-3-3 qui séquestrent la phosphatase dans le cytoplasme et ainsi inhibent l'entrée en mitose. Ce résidu S216 est également phosphorylé *in vitro* par une autre kinase, C-TAK1 (kinase associée à CDC25) (Peng et al., 1998). Cependant, la phosphorylation sur ce résidu est constante pendant toute l'interphase et disparaît en mitose comme les complexes CDC25C/14.3.3. Ceci suggère que la régulation de la localisation, via la phosphorylation de la sérine 216 et son association à 14-3-3 ne soit pas limitée aux réponses des systèmes de surveillance mais soit un mécanisme de régulation d'un cycle cellulaire « normal ». La kinase C-TAK1 serait impliquée dans cette phosphorylation de CDC25C en interphase. Le fait que la kinase C-TAK1 soit ubiquitaire et constitutivement active au cours du cycle cellulaire laisse penser que la majorité de CDC25C serait phosphorylée par C-TAK1 afin de la séquestrer au niveau cytoplasmique et ainsi la conserver inactive. Bien que l'activité de C-TAK1 ne décroisse pas en mitose, on peut imaginer qu'une phosphatase soit activée à la transition G2/M empêchant ainsi la formation du complexe CDC25C/14-3-3 (Dalal et al., 1999).

Au laboratoire, nous avons montré que la phosphatase CDC25B1 est phosphorylée par le complexe CDK1/Cycline B sur la sérine 146. La mutagenèse dirigée de ce site et des expériences *in vivo* ont permis d'établir que la phosphorylation de cette sérine par le complexe CDK1/Cycline B est nécessaire à la séquestration nucléaire de CDC25B et interviendrait par ce biais sur la fonction de la phosphatase

(Baldin et al, soumis). De plus, la phosphorylation par la kinase p38 en réponse à des irradiations Uvs induit une relocalisation de CDC25B (mais nous verrons ceci plus en détails dans le paragraphe II.3).

A ce jour, aucune étude n'est connue sur des phosphorylations pouvant intervenir sur la localisation intra-cellulaire de CDC25A.

II.2.3.3. Interaction avec des protéines régulatrices.

Comme nous venons de le voir, les phosphorylations des phosphatases CDC25 par différentes kinases jouent un rôle majeur dans la régulation de leur activité. Mais l'interaction des phosphatases CDC25 avec d'autres protéines cellulaires permet également la régulation de leur activité. Nous présenterons ici quelques candidats potentiels.

-Les cyclines : Les cyclines pourraient également agir sur l'activité et/ou la localisation des phosphatases CDC25. En effet, les cyclines mitotiques de type B pourraient être des régulateurs de l'activité catalytique des phosphatases CDC25A et B. L'addition stoechiométrique de cycline B suffit à activer ces phosphatases *in vitro* et semble spécifique puisqu'elle n'est pas retrouvée avec les cyclines de phase G1 comme la cycline D (Galaktionov and Beach, 1991). L'analyse des séquences des cyclines a mis en évidence que seule la cycline B possède un motif peptidique appelé domaine P, présent également dans les phosphatases à tyrosine comme VH1. Ceci pourrait expliquer le paradoxe suivant : la cycline B et CDC25A sont capables d'interagir alors qu'elles n'ont pas le même patron d'expression *in vivo*. Des expériences complémentaires ont montré que la mutation de ce domaine P, empêche l'activation de la phosphatase CDC25C par la kinase CDK1 associée à la cycline B chez le xénope (Zheng and Ruderman, 1993). Il a été ainsi proposé que l'interaction inter-moléculaire de CDC25 avec la cycline B apporte le domaine P, absent dans la séquence de cette phosphatase, afin de reconstituer, en trans, un site

actif commun à tous les membres de la famille des phosphatases à tyrosine . Ainsi, la présence de ce motif permettrait d'augmenter dans une première étape l'activité catalytique de CDC25, permettant ensuite l'activation du complexe CDK1/Cycline B voire dans une seconde étape la phosphorylation de CDC25.

Par ailleurs, une interaction entre la cycline B et CDC25B a été mise en évidence *in vitro* (Karlsson et al., 1999) et participerait cette fois à la régulation de la localisation intra-celulaire de la phosphatase. Les auteurs proposent que cette interaction soit à l'origine de l'export de CDC25B du noyau vers le cytoplasme. Depuis, ce résultat n'a pu être reproduit et *in vivo*, dans des cellules surexprimant CDC25B cette interaction n'a pu être mise en évidence (Davezac et al., 2000a). L'interaction avec les cyclines pourrait non seulement participer à l'activation catalytique des phosphatases, mais serait aussi importante pour la reconnaissance et l'adressage spécifique des protéines CDC25 à leur(s) cible(s) *in vivo* .

Trois autres types de protéines interagissent avec les phosphatases CDC25 et ont un effet inhibiteur sur CDC25.

- Les CKS : La protéine p13suc1, partenaire des complexes CDK/Cycline (Brizuela et al., 1987) a été rapportée comme étant un inhibiteur de l'activité de la phosphatase CDC25A alors qu'elle n'a aucun effet sur CDC25B *in vitro*. Cette inhibition est réversée par l'addition de cycline B (Galaktionov and Beach, 1991). Bien que le mécanisme moléculaire régissant cette régulation soit inconnu, l'interaction avec les protéines CKS pourrait participer à la régulation différentielle de l'activité des phosphatases humaines par les complexes CDK/Cycline.

- PIN1 : La protéine PIN1, qui appartient à la famille des peptidyl-proline isomérases ou rotamases (Gothel and Marahiel, 1999), est essentielle pour la régulation de la mitose (Lu et al., 1996). Elle induit des modifications

conformationnelles des protéines cibles par l'isomérisation cis/trans des résidus proline adjacents à des résidus sérine et thréonine phosphorylés (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997a). Ce site spécifique d'interaction est présent dans la séquence de nombreuses protéines phosphorylées en mitose comme CDC25, les kinases de la famille polo, WEE1 et MYT1 (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998; Yaffe et al., 1997a). Les résultats concernant CDC25C montrent que 1) l'activité de la phosphatase phosphorylée par un extrait mitotique de xénope est inhibée par l'interaction avec la protéine PIN1 *in vitro* (Shen et al., 1998) et 2) que PIN1 catalyse l'isomérisation de la proline de motifs phospho-Sérine/Thréonine de la phosphatase CDC25C afin de faciliter leur déphosphorylation par PP2A (Zhou et al., 2000). Très récemment, il a été montré que PIN1 (sous sa forme native) génère un changement conformationnel dans CDC25, aboutissant à une inhibition de l'activité catalytique de la phosphatase effet non retrouvé avec des mutants inactifs de PIN1 (Stukenberg and Kirschner, 2001).

- les protéines 14-3-3. Les protéines 14-3-3 constituent une famille dont les membres sont conservés jusqu'à l'homme et dont les fonctions sont variées selon les cibles. Ces protéines peuvent servir de molécules adaptatrices permettant de réguler les interactions et/ou l'activité des protéines impliquées notamment dans les voies de transduction et le contrôle du cycle cellulaire (Baldin, 2000). L'interaction avec leur cible est médiée par un motif consensus RSXSXP nécessitant dans la plupart des cas une phosphorylation sur sérine, mais pas de manière systématique (Yaffe et al., 1997b). L'interaction entre CDC25 et les protéines 14-3-3 a été mise en évidence pour la première fois lors d'un crible double hybride chez la levure (Conklin et al., 1995). La phosphorylation de la phosphatase CDC25C sur le résidu S216 (situé dans le motif consensus de liaison à 14-3-3)(Peng et al., 1997), sur les résidus S99, S192 et S359 dans la protéine CDC25 de levure *S.pombe* (Zeng et al., 1998) ou sur le résidu S287 de CDC25C de xénope (Kumagai et al., 1998b), favorise

leur association avec les protéines 14-3-3 et inhibe l'entrée en mitose. Chez la levure et le xénope, cette interaction a pour conséquence d'induire une accumulation cytoplasmique de la phosphatase empêche l'accès à sa cible CDC2/CyclineB et inhibe donc l'entrée en mitose (Kumagai and Dunphy, 1999; Lopez-Girona, 1999; Yang et al., 1999). Des résultats identiques ont été obtenus dans les cellules humaines concernant l'interaction CDC25C/14-3-3 et la nécessité d'une phosphorylation sur la sérine 216 (Peng et al., 1997). Cette interaction permet la séquestration cytoplasmique de CDC25C (Graves et al., 2001). Au laboratoire, nous avons montré que CDC25B interagit également avec les protéines de la famille 14-3-3 par l'intermédiaire de deux sites (de haute et basse affinité) et que l'intégrité de la S323 (équivalent sur CDC25B3 de la S216 sur CDC25C) était nécessaire à cette interaction (Mils et al., 2000). Nous avons également montré que cette interaction était requise pour la rétention cytoplasmique de cette phosphatase (Davezac et al., 2000a).

Par ailleurs, l'activité phosphatase de CDC25 peut être directement inhibée par l'interaction avec les protéines 14-3-3. La première étude sur ce sujet a été réalisée en 1998 et met en évidence les résultats suivants. La forme mutante (S287A) de CDC25 présente une activation modérée (inférieure à un facteur 2) de son activité phosphatase vis à vis du complexe CDK1/Cycline B inactif, par rapport à CDC25 sauvage en présence de 14-3-3 ϵ (Kumagai et al., 1998b). Plus récemment, la surexpression de CDC25B mutée sur la sérine 323 (S323A) dans des cellules HeLa bloquées en phase G2, permet une activation plus efficace des complexes CDK1/Cycline B que la forme sauvage de CDC25B. De plus, la transfection de la protéine 14-3-3 β inhibe l'activation du complexe CDK1/Cycline B dans le cas d'une co-transfection avec CDC25B sauvage mais pas avec le mutant CDC25B S323A. Ces différentes expériences montrent que les 14-3-3 inhibent également l'activité catalytique des phosphatases CDC25B (Forrest and Gabrielli, 2001).

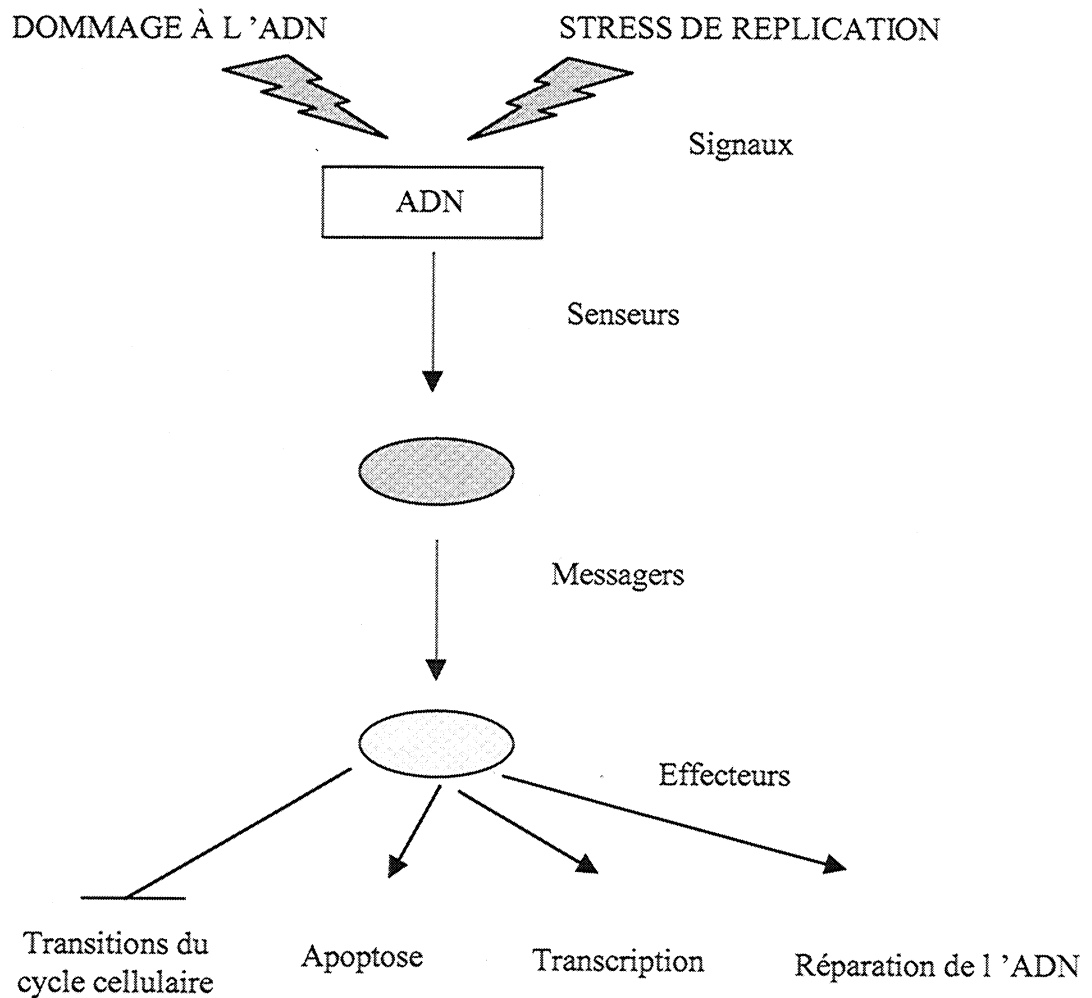


Figure 12 : Vue d'ensemble des signaux de stress jusqu'à la réponse cellulaire.
 Les différentes « agressions » subies par l'ADN sont des signaux qui vont être détectés par les protéines « senseurs » afin d'activer une réponse cellulaire adéquate mettant en jeu des protéines messagers et effectrices.

II.3. Les phosphatases CDC25 et les systèmes de surveillance.

Afin d'assurer une duplication et une transmission fidèles de l'information génétique dans les cellules filles, les événements du cycle cellulaire doivent se dérouler de façon ordonnée et dans leur intégralité. Des systèmes de régulation appelés systèmes de surveillance ou checkpoint vérifient que chacune des étapes du cycle cellulaire soit exécutée dans son intégralité. Dans le cas contraire, une cascade d'événements faisant intervenir différentes protéines ayant des fonctions de senseurs, de messagers et d'effecteurs est activée afin d'arrêter le cycle cellulaire (Figure 12).

Les mécanismes de surveillance sont activés consécutivement à la détection des défauts de réplication au cours de la phase S, des dommages sur l'ADN et d'anomalies aussi bien au niveau du fuseau mitotique qu'au niveau de l'alignement des chromosomes en métaphase lors de la mitose (Elledge, 1996; Mercer, 1998; Murray, 1994; Orr-Weaver and Weinberg, 1998) (Figure 12). Lorsque l'ADN est endommagé, ces mécanismes induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en phase G2 pour empêcher la réplication et la ségrégation des chromosomes.

II.3.1. Point de contrôle en G1/S.

Quand le matériel génétique est endommagé un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 facilite la réparation de l'ADN empêchant la réplication et la propagation conséquente de mutations potentielles dues au hasard. La capacité des checkpoints du cycle cellulaire à inhiber l'entrée des cellules en phase S est intimement associée à la fonction du suppresseur de tumeur p53 (Vogelstein et al., 2000). La figure 13 présente de façon non exhaustive les différents événements survenant dans la cellule suite aux dommages à l'ADN (pour revue (Bartek and Lukas, 2001)). De manière précoce intervient une activation des kinases de la famille des PI3 kinases like ATM ou ATR (le choix entre les deux dépendrait de la nature même de la lésion à l'ADN). Ces dernières phosphorylent certains substrats dont les kinases CHK1 et CHK2 (encore

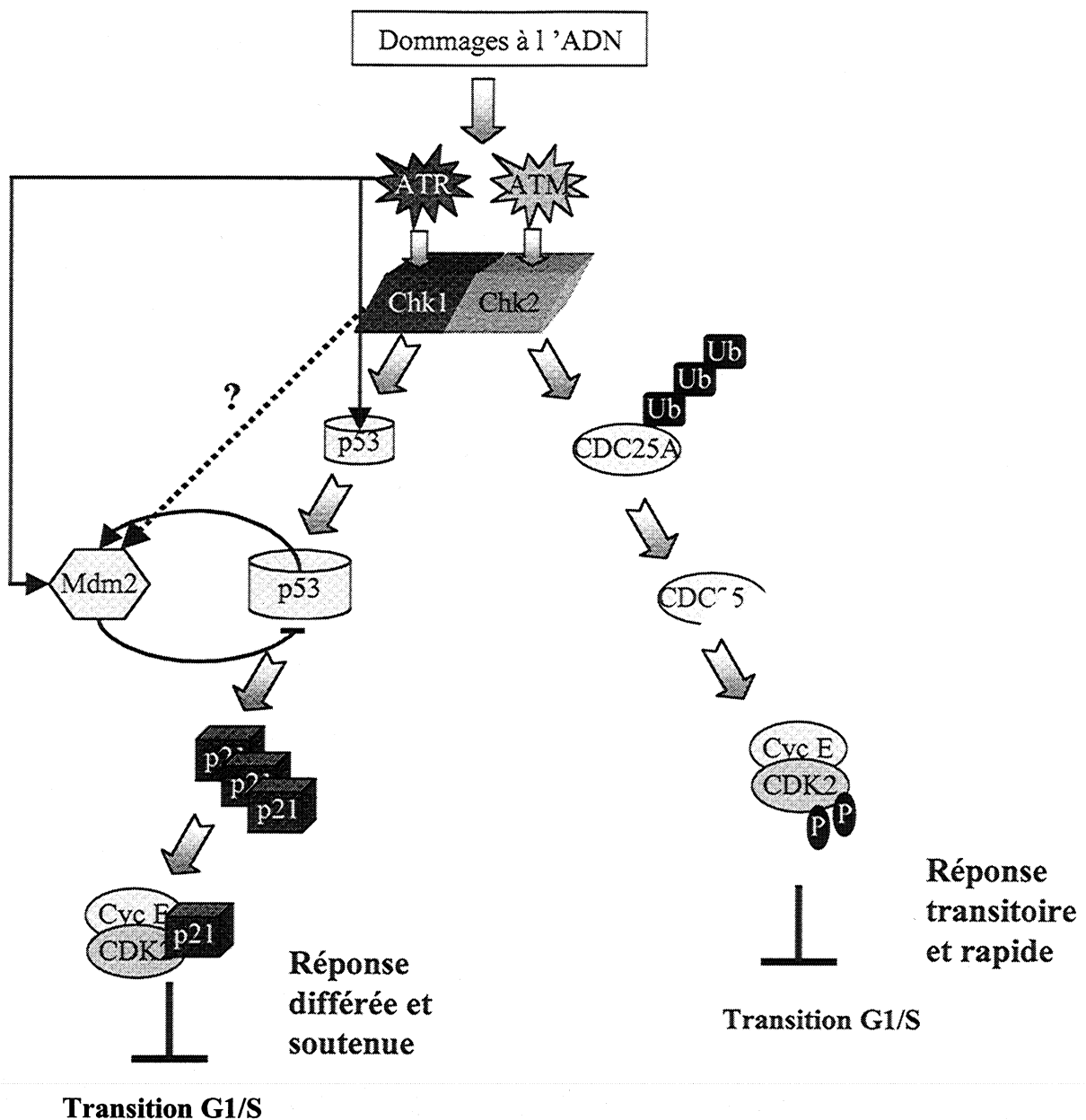


Figure 13: Le complexe CDK2/Cycline E intègre les voies de checkpoint induisant une réponse rapide mais également une réponse tardive à un stress génotoxique. Les dommages à l'ADN induisent des cascades de kinases impliquant ATM/ATR et CHK1/CHK2 ciblant CDC25A pour une protéolyse rapide par le système ubiquitine/protéasome. Cet événement, indépendant de la transcription et de la synthèse de protéines de novo, aboutit à une rapide inhibition de l'activité CDK2/Cycline E en maintenant la kinase CDK2 phosphorylée sur les résidus Tyr15 et Thr14. L'activation de la réponse tardive médiée par p53 requiert la stabilisation de p53 par les kinases CHK1 et CHK2 (d'après Bartek et Lukas, 2001)

une fois le choix est fait en fonction des types de dommages) qui ainsi activées propagent le signal à des effecteurs en aval (Rotman and Shiloh, 1999; Zhou and Elledge, 2000).

Des données récentes (Hirao et al., 2000; Shieh et al., 2000) montrent que CHK1 et CHK2 activées phosphorylent p53 sur la sérine 20, un événement qui aboutit à une stabilisation de la protéine et donc à son accumulation. En effet, la phosphorylation de la sérine 20 empêche la fixation de Mdm2 à p53, responsable en temps normal du ciblage de p53 vers le protéasome. Cependant, d'autres modifications de p53 ainsi que la phosphorylation de Mdm2 par ATM/ATR et CHK1/CHK2 semblent être impliquées (Carr, 2000; Khosravi et al., 1999; Rotman and Shiloh, 1999). Des changements dynamiques de la localisation intra-cellulaire de ces deux protéines interviennent (Vogelstein et al., 2000) (Giannakakou et al., 2000; Vousden and Woude, 2000) (Figure 13). La stabilisation de p53 permet donc la transcription d'un grand nombre de gènes parmi lesquels l'inhibiteur de CDKs p21^{cip1}. L'augmentation de l'expression de cet inhibiteur en G1 permet l'inactivation du complexe CDK2/Cycline E et bloque les cellules à l'entrée de la phase S (Dulic et al., 1994; Kastan et al., 1992; Kuerbitz et al., 1992).

Cependant, toutes les réponses au stress génotoxique ne peuvent être attribuées à p53. En effet, des cellules dépourvues de p21^{cip1} ou de p53 ont une inhibition transitoire de CDK2 après des dommages à l'ADN (Carr, 2000; Rotman and Shiloh, 1999) suggérant l'implication d'autres mécanismes. Ainsi, lors d'un traitement aux ultraviolets, la phosphorylation des complexes CDK4/Cycline D sur le résidu Y15 de CDK4 a été observée (Terada et al., 1995). Ces résultats suggèrent que l'inactivation de ce complexe soit la conséquence de l'inactivation de la phosphatase CDC25 et/ou l'activation de la kinase WEE1. Des travaux publiés ces derniers mois montrent que l'inactivation de la phosphatase CDC25A pourrait expliquer les retards de la transition

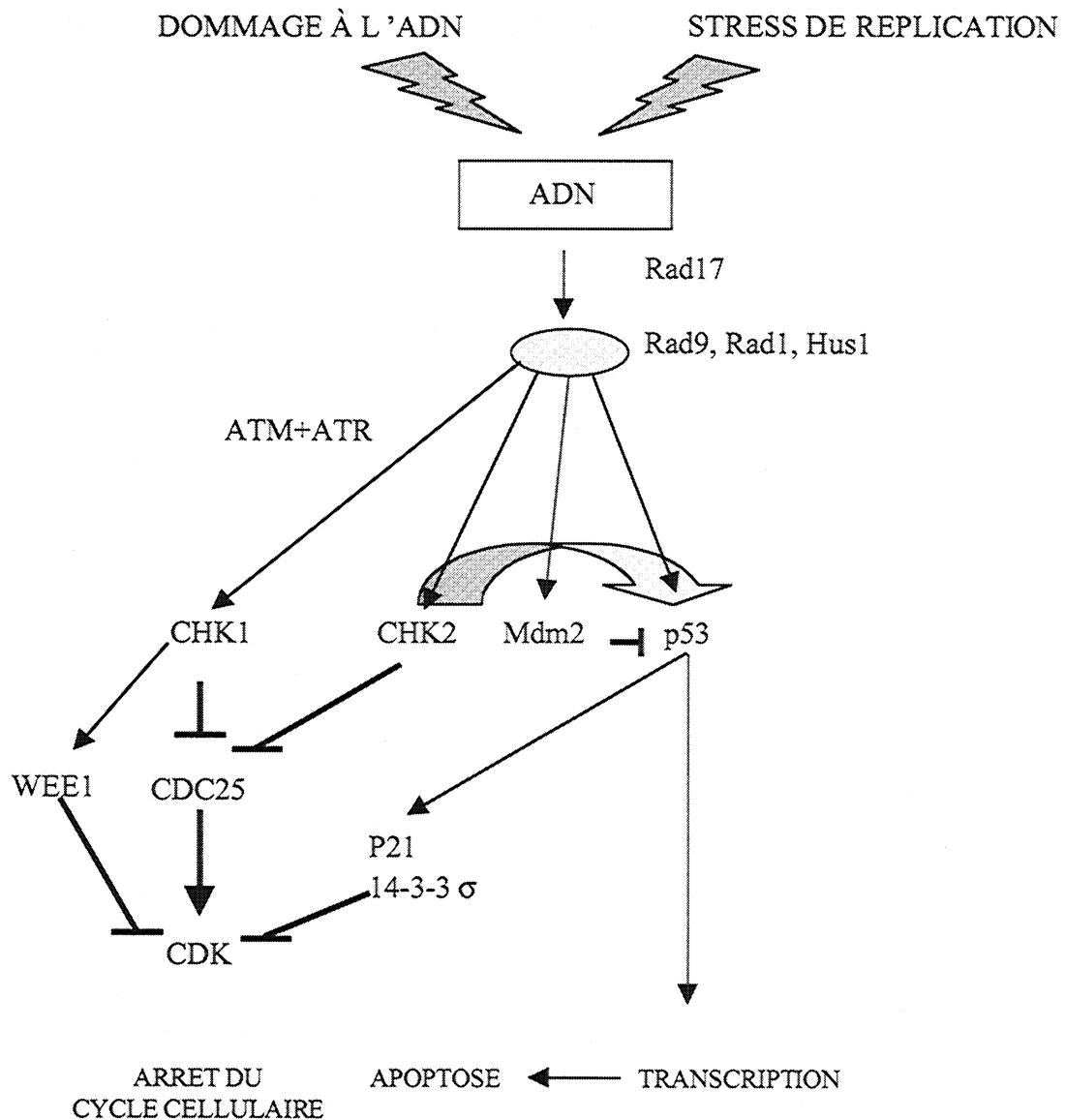


Figure 14: Organisation des voies de réponse aux dommages sur l'ADN chez les mammifères. Les flèches représentent des régulations positives tandis que les terminaisons perpendiculaires représentent des étapes inhibitrices. Ce schéma reste très général et ne tient pas compte de certains détails comme les régulations possibles entre ATM/ATR et Rad1, Rad9, Rad17 ou Hus1 (d'après Zhou et Elledge, 2000).

G1/S indépendants de p53 ou encore les réponses transitoires du checkpoint de phase S (Costanzo et al., 2000; Mailand et al., 2000) (Figure 13). L'activité phosphatase CDC25A décroît rapidement lors d'une exposition aux UVs ou au rayonnement gamma des cellules de mammifères. Cette diminution de l'activité s'explique par une dégradation accélérée de CDC25A par la voie du protéasome dépendante de l'ubiquitine (Mailand et al., 2000). Les complexes CDK2/Cycline E demeurent donc inactifs et le cycle est bloqué à la transition G1/S. Le lien fonctionnel entre ATM, la kinase CHK2 et CDC25A a récemment été établi. La destruction de CDC25A après des radiations ionisantes requiert 1) l'activation d'ATM, CHK2 et 2) la phosphorylation de la sérine 123 de CDC25A par CHK2 (Falck et al., 2001).

II.3.2. Point de contrôle G2/M.

Différents travaux montrent que des lésions sur l'ADN, occasionnées par un traitement des cellules avec différents génotoxiques comme les radiations ionisantes, les rayons ultraviolets ou l'étoposide, induisent également un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. Cet arrêt est caractérisé par l'inactivation du complexe CDK1/Cycline B par phosphorylation sur le résidu Y15 (Gabrielli et al., 1997; Kumagai et al., 1998a; Peng et al., 1997; Poon et al., 1997; Rhind and Russell, 1998; Sanchez et al., 1997; Sert et al., 1999). L'inactivation du complexe CDK1/Cycline B met en jeu une cascade d'événements impliquant à nouveau les différentes protéines transmettrices dont nous avons précédemment parlées (Figure 14).

En effet, les membres de la famille d'ATM jouent un rôle central dans le checkpoint des dommages à l'ADN en régulant notamment les kinases CHK1 et CHK2 (Figure 14). Ces dernières conduiraient à l'inactivation du complexe CDK1/Cycline B via l'activation de la protéine kinase CHK1 qui phosphoryle la protéine WEE1 *in vivo* chez la levure *S.pombe*. Cependant, cette phosphorylation réalisée *in vitro* n'active pas la kinase WEE1 (O'Connell et al., 1997; Walworth et al.,

1993). Des études génétiques révèlent que l'arrêt en G2 est inhibé lorsque simultanément WEE1 est inactivée et CDC25 surexprimée (Rhind et al., 1997). De plus, les travaux de Raleigh et de ses collaborateurs argumentent dans ce sens. Les auteurs ont observé que lors de dommages à l'ADN les taux de protéines WEE1 augmentent et CDC25 est inactivée, aboutissant ainsi à un mécanisme de double fermeture pour assurer un arrêt du cycle cellulaire et une stabilité génomique (Raleigh and O'Connell, 2000). Bien que les mécanismes régulant l'activité de WEE1 soient inconnus, ces résultats suggèrent que la kinase WEE1 soit impliquée dans l'arrêt en G2 en réponse à des dommages à l'ADN.

CDC25 est également la cible des checkpoints et des travaux récents favorisent son implication dans l'inhibition de l'entrée en mitose chez *S.pombe*, le xénope et l'homme. Après un traitement avec des radiations ionisantes, la protéine CHK1 activée par phosphorylation, phosphoryle *in vivo* la protéine CDC25C sur la sérine 216 chez l'homme, la sérine 99 chez *S.pombe* ou 287 chez le xénope (Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997). Des études montrent que cette phosphorylation inhibe l'activité de la phosphatase aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* chez *S.pombe* (Blasina et al., 1999; Furnari et al., 1999). Cependant, chez l'homme, la phosphorylation de la sérine 216 n'a aucun effet sur l'activité phosphatase de CDC25C (Sanchez et al., 1997) mais comme nous l'avons décrit précédemment, la phosphorylation de CDC25 par CHK1 favorise son interaction avec les protéines 14-3-3 et donc sa localisation cytoplasmique (Furnari et al., 1997; Kumagai et al., 1998b; Peng et al., 1997). Il faut toutefois noter que la S323 de CDC25B (l'équivalent de la S216 sur CDC25C) également impliquée dans l'interaction avec les protéines 14-3-3 n'est pas phosphorylée par CHK1 (Mils et al., 2000). Cependant, une autre protéine a récemment fait son apparition dans les mécanismes de contrôle en phase G2 : la kinase p38. *In vitro*, la kinase p38 se lie et phosphoryle CDC25B1 sur les sérines 309 (sur CDC25B1 équivalent de la S323 sur

CDC25B3) et 361 et CDC25C sur la sérine 216 (Bulavin et al., 2001). *In vivo*, l'inhibition de la kinase p38 empêche la phosphorylation de CDC25B sur la sérine 309 et l'interaction avec les protéines 14-3-3 après irradiation aux UVs et la mutation de ce site est suffisante pour inhiber l'initiation du point de contrôle. Notons qu'*in vivo*, l'interaction entre CDC25C et 14-3-3 n'est pas affectée par l'inhibition de p38 après irradiation aux UVs (Bulavin et al., 2001).

Chez la levure, le xénope et l'homme l'interaction CDC25C/14-3-3 entraîne la séquestration de la phosphatase dans le cytoplasme. Néanmoins, cette idée de relocalisation au niveau cytoplasmique nécessaire à la phosphatase CDC25 pour un checkpoint efficace est remise en question par un travail récent. En effet, l'addition d'une NLS exogène force l'entrée de la phosphatase dans le noyau de cellules endommagées, mais ne permet pas de passer outre ce point de contrôle. Donc l'exclusion nucléaire de CDC25 n'est pas indispensable pour la mise en place du checkpoint. Les auteurs proposent qu'une inhibition directe de l'activité phosphatase par CHK1, pourrait être suffisante pour la mise en place du point de contrôle (Lopez-Girona et al., 2001).

Cependant, CDC25 et WEE1 ne sont pas les seules cibles des points de contrôle G2/M et trois autres cibles seront présentées brièvement.

-Les dommages à l'ADN semblent également réguler la cycline B. En effet, après irradiation γ , les taux d'ARNm de cycline B sont transitoirement réduits probablement liés à une diminution de leur stabilité (Maity et al., 1995). La localisation de la cycline B est elle aussi affectée après activation du checkpoint. Ainsi, l'adressage nucléaire de la cycline B (étiquetée avec une NLS) cause des événements mitotiques précoces après des dommages à l'ADN (Jin et al., 1998) et qu'un arrêt en G2 peut être levé par l'expression d'une cycline B dépourvue de NES avec un traitement à la caféine (Toyoshima et al., 1998).

Type de tumeurs (références)	CDC25A	CDC25B	CDC25C
Cancers du sein (Galaktionov et al, 1995)		Surexpression dans 32% des cas	
Cancers ovariens (Broggini et al, 2000)	Expression dans 100% des cas mauvais pronostic	Expression dans 100% des cas mauvais pronostic	Expression dans 20% des cas
Carcinomes de la tête et du cou (Gasparotto et al, 1997)	Surexpression dans 80% des cas	Surexpression dans 50% des cas	
Lymphomes non hodgkiniens (Hernandez et al, 1998)		Surexpression dans 56% des cas	
Lymphomes non Hodgkiniens (Hernandez et al, 2000)	Surexprimé dans 35% des cas et + fréquent dans les lymphomes agressifs	CDC25B2 Surexprimé dans 35% des cas et + fréquent dans les lymphomes agressifs	
Cancer du colon (dixon et al, 1998)	Augmentation de l'activité phosphatase liée à CDC25A dans 52% des cas		
Carcinomes colorectaux (Takemasa et al, 2000)	Surexpression dans 47% des cas mais pas de mauvais pronostic	Surexpression dans 43% des cas mais mauvais pronostic	
Carcinomes colorectaux (Hernandez et al, 2001)	Surexpression dans 12% des cas	Surexpression dans 56% des cas et CDC25B2 exprimé dans 79% des cas contre 26% dans tissus normaux	CDC25C surexprimé dans 26% des cas et CDC25C2 exprimée dans 100% des cas et 56% des tissus sains.
Carcinomes gastriques (Kudo et al, 1997)	Surexpression dans 38% des cas	Surexpression dans 70% des cas	
Cancers oesophagiens (Miyata et al, 2000)		CDC25B surexprimé dans 46% des cancers radiosensibles et 6% des cancers radiorésistants	
Cancers oesophagiens (Nishioka et al, 2001)	Exprimée dans le cytoplasme de 46% des cellules cancéreuses et 51% dans le noyau	Exprimée dans le cytoplasme de 48% des cellules cancéreuses	
Cancers oesophagiens (Hu et al, 2001)		Surexpression de CDC25B dans 79% des tumeurs primaires de cellules squameuses de cancers oesophagiens	
Cancer du poumon (Wu et al, 1998)	Surexpression dans 60% des cas	Surexpression dans 45% des cas	
Cancer du poumon (Sasaki et al, 2001)		Forte expression de CDC25B liée à un facteur de mauvais pronostic pour la survie.	

Figure 15: Implication de CDC25A, B ou C dans différents types de cancers.

-L'isoforme 14-3-3 σ serait également requise pour la séquestration du complexe CDK1/Cycline B dans le cytoplasme en réponse à un dommage à l'ADN. En effet, le traitement à l'adriamycine de cellules somatiques invalidées pour 14-3-3 σ conduit à des catastrophes mitotiques corrélées à une localisation nucléaire du complexe CDK1/Cycline B. Des expériences de coimmunoprécipitations démontrent l'association de 14-3-3 σ avec CDK1 et Cycline B (Chan et al., 1999). 14-3-3 σ est régulée après irradiation γ de manière dépendante de p53 et pourrait contribuer au blocage induit par les dommages à l'ADN (Hermeking et al., 1997) (Figure 14).

-En dehors de la régulation de 14-3-3 σ , p53 peut également réguler l'induction de p21 lors d'un arrêt en G2 suite des dommages à l'ADN. Des travaux récents montrent que des cellules déficientes en p21 échappent l'arrêt en G2 tandis que les cellules sauvages s'arrêtent (Bunz et al., 1998).

II.4. Les phosphatases CDC25 et l'oncogénèse.

De nombreuses études ont été réalisées sur le potentiel oncogénique des phosphatases CDC25 (Figure 15). Ces différents travaux ont fait l'objet de plusieurs revues (Cans et al., 1998; Davezac et al., 2000b; Nilsson and Hoffman, 1999). Pour résumer succinctement les différentes données sur plusieurs types de cancers et leur liaison avec les phosphatases CDC25, nous pourrions dire que les phosphatases CDC25A et B ont été retrouvées surexprimées dans différents cancers tandis que CDC25C ne l'a été que très rarement (deux fois). Une des premières études abordant le potentiel oncogénique des phosphatases CDC25 date de 1995 et repose sur des résultats obtenus après cotransfection de fibroblastes murins par les ADNc des différents CDC25 humains et par HA-RAS^{G12V} (mutation activatrice du proto-oncogène RAS). Les résultats obtenus montrent une coopération entre RAS activé et CDC25A ou B aboutissant à une transformation des cellules et à la formation de foyers

à confluence (Galaktionov et al., 1995b). Parallèlement, les auteurs de cette première étude ont analysé l'expression des phosphatases CDC25 dans des cancers du sein. Seule la phosphatase CDC25B a été retrouvée fortement exprimée dans 32% des cas. Afin de comprendre le rôle des phosphatases CDC25A et B dans la transformation oncogénique des glandes mammaires, l'expression de CDC25B a été ciblée à ce niveau en utilisant le promoteur viral MMTV (mouse mammary tumor virus) dans des souris transgéniques. La surexpression de CDC25B augmente la prolifération de cellules épithéliales mammaires aboutissant à la formation d'hyperplasies alvéolaires précoces. De plus, une nette diminution de l'apoptose a été observée pendant l'évolution de la glande mammaire. Ces résultats suggèrent que l'expression dérégulée de la phosphatase CDC25B génère des hyperplasies de la glande mammaire (Ma et al., 1999). Une autre étude réalisée également sur des souris transgéniques surexprimant CDC25B dans la glande mammaire grâce à un promoteur MMTV-LTR montre que ces souris sont plus sensibles à l'induction de tumeurs mammaires par le carcinogène 9,10-diméthyl-1, 2-benzanthracène (DMBA) confirmant ainsi, les résultats précédents (Yao et al., 1999).

Dans un souci de simplification, je ne présenterai dans cette partie que les dernières données parues très récemment, les résultats antérieurs à 1999 étant résumés en annexe I dans la revue « Rôle des phosphatases CDC25 dans le contrôle de la prolifération » et figure 15.

Récemment, diverses études se sont intéressées au facteur de pronostic en relation avec la surexpression des phosphatases CDC25.

Des études sur les carcinomes humains colorectaux ont été entreprises et ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes : les ARN messagers de CDC25B sont surexprimés dans 56% des cas. Mais le variant CDC25B2 est surexprimé dans 79% des carcinomes contre 26% dans les tissus sains. Dans les cancers colorectaux, la

relation entre une forte expression de CDC25B (43% des cancers colorectaux) et un mauvais pronostic a pu être établie. Le taux de CDC25B serait donc un nouveau marqueur de pronostic indépendant des cancers colorectaux (Takemasa et al., 2000). Une analyse similaire dans le cas de cancers ovariens (Broggini M., 2000) et de lymphomes non hodgkiniens (Hernandez et al., 2000) a abouti également à une relation entre un facteur de mauvais pronostic et les taux d'expression de CDC25A et B, et de CDC25B pour les cancers du poumon (Sasaki et al., 2001).

Une forte expression des phosphatases CDC25A et B a aussi été mise en évidence (par différentes techniques RT-PCR, immunocytochimie, western blot) dans des cellules de cancers oesophagiens mais seule la phosphatase CDC25A serait un nouveau facteur de pronostic pour ces cancers (Nishioka et al., 2001). Avec la technique des micro-arrays, une autre équipe montre également la surexpression de CDC25B dans des carcinomes de cellules squameuses de l'œsophage (Hu et al., 2001).

La phosphatase CDC25B a également été impliquée dans la sensibilité à la radiothérapie dans les cancers oesophagiens. CDC25B qui n'est pas exprimée dans les épithéliums normaux était fortement exprimée dans 46% des tumeurs radiosensibles et 6% des tumeurs radiorésistantes. La sensibilité à la radiothérapie est significativement corrélée à la surexpression de CDC25B. Cette phosphatase est donc un nouvel indicateur de radiosensibilité dans les cancers oesophagiens (Miyata et al., 2000). Des expériences menées *in vitro* sur des cellules transfectées par CDC25B et irradiées ont montré que ces clones étaient plus sensibles aux irradiations que les contrôles (Miyata et al., 2001).

Nous venons d'avoir un aperçu des différents cancers dans lesquels les phosphatases CDC25 sont impliquées, cependant, elles semblent jouer également un rôle dans d'autres pathologies.

Les kinases CDKs sont absentes des neurones qui sont différenciés à un stade terminal dans le cerveau adulte. Toutefois, l'expression et l'activation du complexe CDK1/Cycline B ont été décrites dans des neurones poursuivant un processus dégénératif dans la maladie d'Alzheimer. Un fort marquage de CDC25A (par immunocytochimie) est observé en parallèle des marqueurs de dégénérescence neuronale. L'activité de CDC25A immunoprécipitée de cerveaux malades est plus importante que celle immunoprécipitée à partir de tissus sains. Ces données suggèrent que CDC25A soit impliquée dans l'activation mitotique pendant la dégénérescence neuronale (Ding et al., 2000). Une autre équipe a mis en évidence une forte expression et une activité enzymatique élevée de CDC25B dans la maladie d'Alzheimer. De manière surprenante, l'activité de CDC25B est également détectée à un niveau basal dans des neurones sains. La phosphatase CDC25B est donc active dans des neurones postmitotiques normaux dépourvus de CDK1/Cycline B, suggérant la présence d'autres cibles pour cette phosphatase (Vincent et al., 2001).

Enfin, dans le but d'identifier les gènes présentant une expression altérée après infection par *Helicobacter Pylori* (un pathogène humain impliqué dans l'ulcère gastrique), une équipe a utilisé la technique des micro-arrays. Les sondes utilisées provenaient de cellules infectées ou non par la bactérie et ont mis en évidence une diminution de l'expression de CDC25B. Cependant, les taux d'ARNm de CDC25B analysés par Northern Blot ne varient pas significativement entre malades et témoins sains. Les auteurs concluent néanmoins que la diminution de CDC25B pourrait être à l'origine de l'inhibition de la croissance cellulaire lors d'une infection par *Helicobacter Pylori* (Chiou et al., 2001).

Du fait de leur potentiel oncogénique mais également de leurs propriétés essentielles de régulateurs positifs du cycle cellulaire, les phosphatases CDC25 représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour de nouvelles approches de

thérapie anti-tumorale voire à visée beaucoup plus large si les résultats énoncés précédemment se confirment. A l'heure actuelle, des inhibiteurs des phosphatases CDC25B sont activement recherchés. Des cribles visant à identifier des molécules capables d'inhiber l'activité des phosphatases CDC25 ont été proposés (Baratte et al., 1992), brevetés (Draetta et al., 1995) et ont permis d'identifier certains inhibiteurs (Ducruet et al., 2000; Fritzen et al., 2000; Horiguchi et al., 1994; Rice et al., 1997).

RESULTATS

III. BASES MOLECULAIRES DE LA LOCALISATION INTRA-CELLULAIRE DES PHOSPHATASES CDC25B.

La première étude concernant la localisation intra-cellulaire des phosphatases CDC25 a été réalisée sur CDC25C (Girard et al., 1992). Les auteurs montrent par immunofluorescence indirecte des changements de localisation de la phosphatase en fonction du cycle cellulaire laissant penser que la séparation de CDC25C et de son substrat CDK1/Cycline B serait un des moyens de régulation de l'activité de l'un (CDC25C) et de l'autre (CDK1/Cycline B).

La question que nous nous sommes donc posée au départ était la suivante : Existe t'il des différences de localisation des trois variants de la phosphatase CDC25B en fonction du cycle cellulaire ? Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé l'expression ectopique des trois isoformes étiquetées avec l'épitope HA car aucun anticorps n'est actuellement spécifique de CDC25B1, B2 ou B3.

Nous avons montré qu'il existait peu de différences de localisation entre les trois isoformes mais que chacune se retrouvait soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme ou dans les deux compartiments cellulaires. Ces résultats laissaient supposer une navette entre le noyau et le cytoplasme ce qui nous a amenés à déterminer les mécanismes impliqués dans cette localisation. Nous avons mis en évidence l'existence d'un signal de localisation nucléaire fonctionnel (NLS) et d'un signal d'export nucléaire fonctionnel (NES) au sein de la protéine. De plus, nous avons démontré l'implication des protéines de la famille 14-3-3 dans la rétention cytoplasmique de CDC25B.

Mais avant de présenter ces résultats je ferai une petite introduction sur le transport nucléo-cytoplasmique, afin de rappeler les grandes lignes des mécanismes impliqués.

III.1 Le transport nucléocytoplasmique.

Les protéines requises dans le noyau doivent être spécifiquement transportées de leur lieu de synthèse dans le cytoplasme vers le noyau. Les processus du transport nucléo-cytoplasmique sont précisément contrôlés et nous allons survoler les déterminants moléculaires impliqués dans ce processus.

Le complexe de pore nucléaire ou NPC intervient dans les transports actifs et passifs (Agutter and Prochnow, 1994) et se localise dans l'enveloppe nucléaire (Figure 16). La structure et la fonction du NPC sont conservées chez tous les eucaryotes. Il est composé de plus de 50 protéines différentes avec des stoechiométries variables et sa masse avoisine celle d'un organelle : 10^5 kDa. Il existe entre 10^2 et 5×10^7 NPCs par noyau selon le métabolisme de la cellule et l'état de différenciation. Comme son nom l'indique, le NPC est en forme de pore au travers duquel les molécules inférieures à 40-45 kDa peuvent diffuser passivement. Les protéines dont la masse moléculaire excède 45 kDa nécessitent une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Hall et al., 1984; Kalderon et al., 1984a; Kalderon et al., 1984b; Lanford and Butel, 1984) afin d'être adressées au noyau. Le transport de protéines dépendant d'une NLS est dépendant également de l'ATP et de la température (Newmeyer and Forbes, 1988) (Richardson et al., 1988) et peut être inhibé par une lectine (WGA= Wheat Germ Agglutinin) (Finlay et al., 1987) qui se lie aux protéines du pore.

III.1.1. Structure et composants du pore nucléaire.

La plupart des modèles suggèrent une symétrie octogonale rotationnelle pour le complexe de 100 nm de diamètre, avec deux structures en anneaux concentriques sur les faces cytoplasmiques et nucléoplasmiques de l'enveloppe nucléaire et un pore

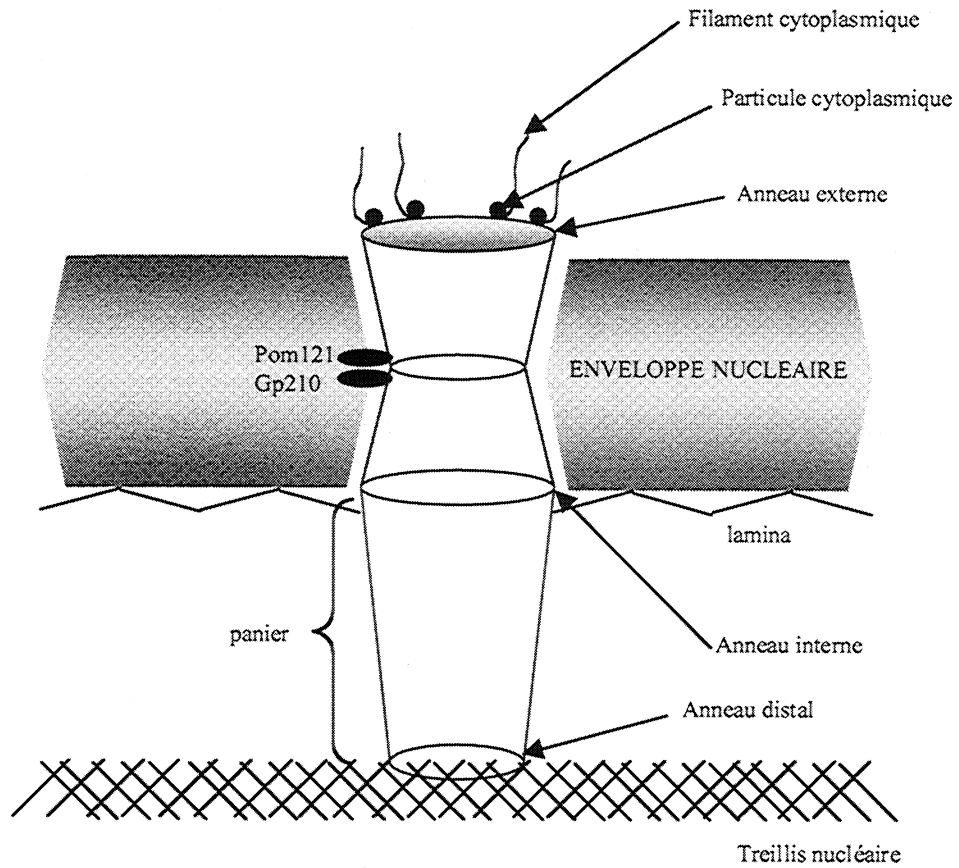


Figure 16: Le complexe de pore nucléaire (NPC).

Les relations avec l'enveloppe nucléaire, la lamina nucléaire et le treillis nucléaire sont montrées.
(d'après Jans et Ubner, 1996)

central de 9 nm de diamètre au travers duquel le transport nucléocytoplasmique actif a lieu (Akey, 1990) (Akey and Goldfarb, 1989) (Figure 16).

Le complexe de pore nucléaire comprend entre 50 et 100 protéines différentes (Fontoura et al., 1999). Environ 5 à 10 % de la masse du NPC est constituée d'une classe de protéines périphériques non ancrées à la membrane appelées nucléoporines. Elles possèdent des parties N-acetylglycosamine glycosylées liées en O qui sont la base de l'inhibition par le WGA (pour revue (Jans and Hübner, 1996)).

III.1.2. Les signaux d'import et d'export nucléaires.

A) Les signaux de localisation nucléaire NLS :

Les signaux de localisation nucléaire (Hall et al., 1984; Kalderon et al., 1984b; Lanford and Butel, 1984) sont de courtes séquences peptidiques nécessaires et suffisantes pour la localisation nucléaire des protéines qui les contiennent. Ces séquences ont été identifiées sur la base de deux critères : 1) la mutation ou la délétion de la NLS aboutit à la relocalisation cytoplasmique de la protéine en question et 2) la NLS est active dans l'adressage nucléaire d'une protéine « carrier » normalement localisée dans le cytoplasme si elle est covalamment couplée au carrier ou si elle est en fusion traductionnelle avec.

Il n'existe pas réellement de séquence consensus stricte (Garcia-Bustos et al., 1991; Roberts, 1989) mais généralement, ce sont des séquences enrichies en acides aminés basiques (Dingwal and Laskey, 1991). La mieux caractérisée est celle de l'antigène T du virus SV40 (PKKKRKV¹³²) dans laquelle la substitution du résidu K¹²⁸ par N ou T abolit sa fonction et aboutit à une relocalisation cytoplasmique totale de la protéine. Une variante couramment rencontrée est une NLS constituée de deux séries de résidus basiques séparés par 10 à 12 acides aminés (NLS bi-partite) (Robbins et al., 1991) (Schreiber et al., 1992). En l'absence de NLS consensus, des analyses de prédiction de structure secondaire ont été entreprises et suggèrent que la structure

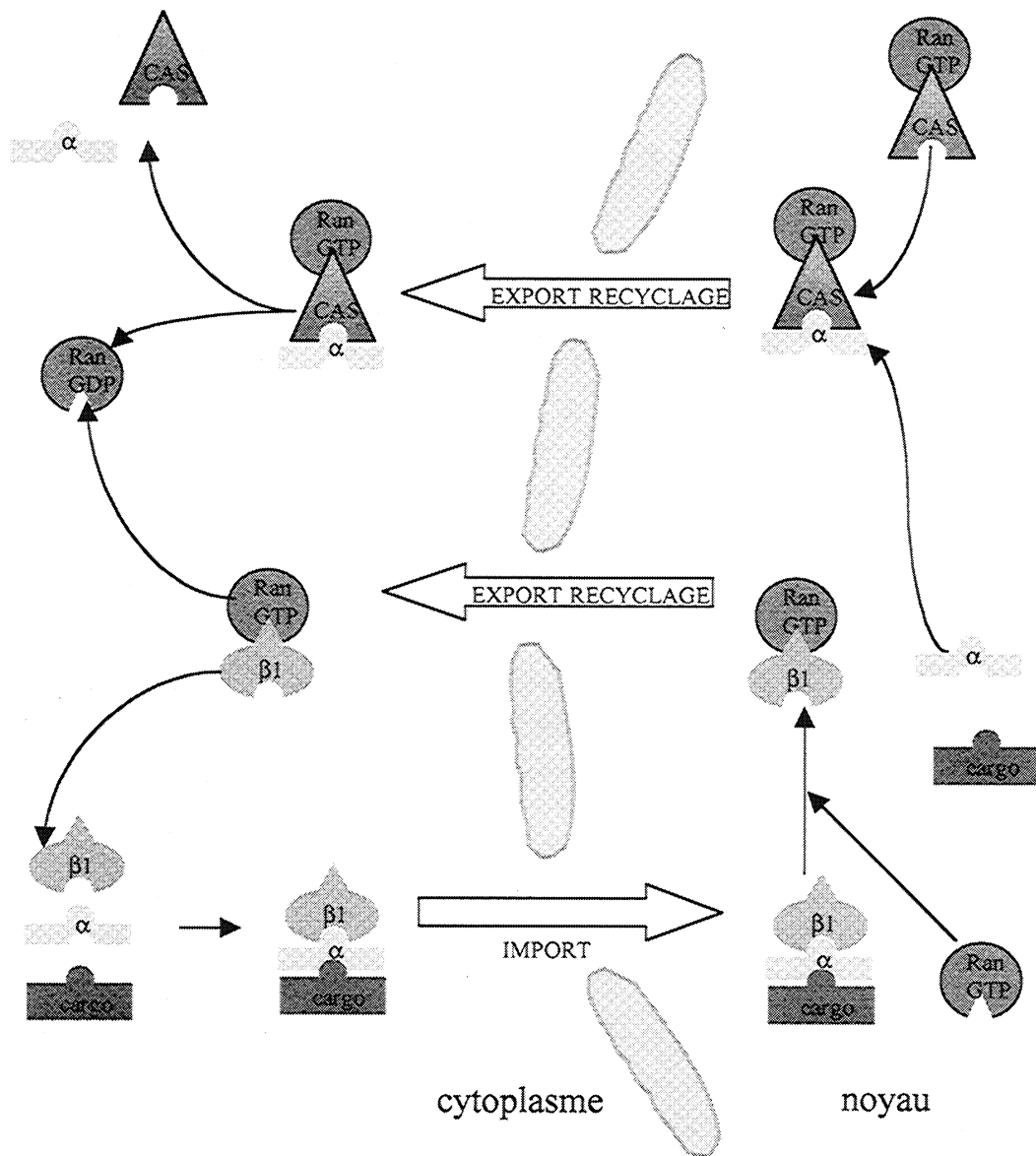


Figure 17: Modèle pour l'import nucléaire de protéines contenant des NLS classiques. La protéine avec NLS (cargo) se lie dans le cytoplasme à l'hétérodimère de karyophérines $\alpha\beta1$, qui est stable à cause des niveaux bas de RanGTP. Le complexe trimérique résultant se lie grâce à la karyophérine $\beta1$ aux nucléoporines au niveau des fibres cytoplasmiques du complexe de pore nucléaire (NPC). Ran GTP se dissocie ensuite du complexe karyophérine $\alpha\beta1$ et relâche la sous-unité α et la protéine cargo dans le noyau. Après l'achèvement de l'import, la karyophérine α et le complexe karyophérine $\beta1$ / RanGTP sont exportés grâce à une voie séparée dans le cytoplasme. L'export nucléaire de la karyophérine α est médié par CAS un membre de la famille des karyophérines β (d'après Moroianu, 1999).

secondaire des protéines peut être à l'origine de la formation de signaux NLS (Lanford and Butel, 1984; Roberts, 1989) (Roberts et al., 1987) (Silver et al., 1988). Enfin, il semblerait que des signaux de glycosylation spécifique pourraient fonctionner comme des NLSs sous certaines conditions grâce à une voie dépendante de l'ATP et de la température et inhibée par WGA mais dont une compétition avec des protéines carrier portant une NLS est inefficace (Duverger et al., 1993; Duverger et al., 1995).

La NLS est reconnue dans le cytoplasme par un complexe protéique hétérodimérique composé de karyophérine α et β 1 (appelées également importines α et β) pour revue (Moroianu, 1998) (Figure 17). La sous-unité α de la karyophérine se lie à la NLS (Adam and Adam, 1994; Imamoto et al., 1995) tandis que la sous-unité β 1 médie l'adressage au NPC vers les nucléoporines qui contiennent des répétitions (Görlich et al., 1995). La GTPase Ran joue un rôle important dans ce mécanisme grâce à une concentration en gradient de RanGTP au travers du NPC : faible dans le cytoplasme et haute dans le noyau (pour revue (Mattaj and Englmeier, 1998) (Moroianu, 1999)). Ran GTP interagit avec les karyophérines β /importines et ceci cause la dissociation des complexes d'import dans le noyau avec la formation de complexes RanGTP/Kap β (Chook and Blobel, 1999) (Figure 17).

B) Les séquences d'export nucléaire NES.

Les NES sont définies comme des séquences nécessaires et suffisantes pour permettre un transport rapide et actif du noyau vers le cytoplasme. Les premières NES caractérisées sont celle de PKI, protéine inhibitrice de PKA (Wen et al., 1995) et de la protéine Rev de HIV1 (Fischer et al., 1995). Les séquences NES sont caractérisées par des stretches de leucine pouvant rendre compte d'un consensus pour les protéines de la classe Rev/Rex : L-X2-3-L(FIVM)-X2-3-L-X-L (Bogerd et al., 1996). Cependant, ces séquences consensus ne sont pas applicables à toutes les protéines et il existe une

grande variabilité de séquences pour une NES fonctionnelle. Les séquences NES de cycline B1 de différents organismes varient quelque peu par rapport à ce consensus (Yang et al., 1998).

Dans l'export, la présence de RanGTP dans le noyau permet la formation du complexe trimérique protéine transportée/récepteur d'export/RanGTP. Toutes les karyophérines β impliquées dans l'export (CAS, exportine1/CRM1p, exportine T, Msn5p) fixent leur « cargaison » en présence de RanGTP (Fornerod et al., 1997; Kutay et al., 1997). Les complexes d'export sont transloqués au travers du NPC vers le cytoplasme où l'hydrolyse du GTP grâce à l'action combinée de RanGAP et RanBP1 aboutit à la dissociation de Ran du complexe. Le récepteur d'export est alors capable de relarguer sa cargaison (Kutay et al., 1997)(Figure 17). Le récepteur d'export CRM1 ou exportine 1 identifié de la levure à l'homme et se liant aux NES de manière RanGTP dépendante (Fornerod et al., 1997; Kudo et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997) possède un inhibiteur spécifique la leptomycine B (Nishi et al., 1994).

III.2. Identification des domaines régulant la localisation de CDC25B.



Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization

Noélie Davezac¹, Véronique Baldin¹, Brian Gabrielli², Alistair Forrest², Nathalie Theis-Febvre¹, Minoru Yashida³ and Bernard Ducommun^{*1}

¹LBCMCP-CNRS UMR5088, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France; ²Queensland Institute of Medical Research, Post Office Royal Brisbane Hospital, Queensland 4029, Australia; ³Department of Biotechnology, Graduate School of Agriculture & Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

The CDC25B dual specificity phosphatase is involved in the control of the G2/M transition of the cell cycle. Subcellular localization might represent an important aspect of the regulation of its activity. We have examined in transiently transfected asynchronous HeLa cells the localization of HA-tagged CDC25B proteins and found that they are nuclear or cytoplasmic suggesting the existence of an active shuttling. Accordingly, localization analysis of deletion and truncation proteins indicates that CDC25B contains a putative nuclear localization signal located between residues 335 and 354. We also demonstrated that a short 58 residues deletion of the amino-terminus end of CDC25B is sufficient to retain it to the nucleus. Mutational analysis indicates that a nuclear export sequence is located between residues 28 and 40. In addition, treatment of the cells with the exportin inhibitor, Leptomycin B, has the same effect. The mutation of Ser-323, a residue that is essential for the interaction with 14-3-3 proteins, also abolishes cytoplasmic staining. The subcellular localization of CDC25B is therefore dependent on the combined effects of a nuclear localization signal, a nuclear export signal and on the interaction with 14-3-3 proteins. *Oncogene* (2000) 19, 2179–2185.

Keywords: cell cycle; cyclin-dependent kinases; CDC25B; localization; nuclear export sequence

Introduction

The eukaryotic cell cycle is controlled by members of the well-known CDK (cyclin-dependent kinase) family. The CDC2 protein kinase was the first member identified in yeast where its function is required both at the G1 to S phase and G2 to M phase transition. Homologous and related kinases were subsequently found in every eukaryotic organism and it was demonstrated that they control the key cell cycle events. The regulation of the kinase activity of these proteins is achieved through (i) their association with a cyclin regulatory subunit; (ii) their interaction with CKI (cyclin-dependent kinase inhibitors); and (iii) cycle of phosphorylation and dephosphorylation (Morgan, 1995). Our knowledge of the kinases and phosphatases that regulate the activity of CDC2 also largely benefited from the studies performed in yeast. For instance, CDC25 was first identified in *Schizosaccharomyces pombe* as a dose dependent activator of mitosis (Russell and Nurse, 1986). CDC25

is a dual specificity phosphatase that directly activates the CDC2 kinase at the G2/M transition by dephosphorylating tyrosine 15 and threonine 14 (Morgan, 1995). On the contrary, these residues are phosphorylated by the WEE1/MIK1 and the MYT1 kinases. In yeast there is only one form of CDC25 while in vertebrate cells three CDC25 phosphatases have been identified (Galaktionov and Beach, 1991; Nagata *et al.*, 1991; Sadhu *et al.*, 1990). CDC25C and CDC25B are thought to activate CDK/cyclin complexes at the G2/M transition and CDC25A appears to regulate G1/S complexes (Jesus and Ozon, 1995).

The exact role of CDC25B is still controversial and a matter of debate. On the basis of antisense oligonucleotides studies, it has been proposed that CDC25B is required for progression in S phase (Garner-Hamrick and Fisher, 1998). Other reports are more in favour of a role for CDC25B in G2 as a regulator of centrosomal microtubule nucleation (Gabrielli *et al.*, 1996) and as a starter of mitosis (Nishijima *et al.*, 1997). In favour of this hypothesis is the fact that CDC25B is an unstable protein that is degraded by a proteasome-dependent pathway upon phosphorylation by the CDC2/Cyclin A complex (Baldin *et al.*, 1997a). Furthermore, ablation of CDC25B by microinjection of specific antibodies blocks cell cycle progression by inhibition of entry into mitosis (Lammer *et al.*, 1998). Using micro injection of GFP tagged form of CDC25 and time-lapse microscopy, Karlsson and co-workers very recently showed that overexpression of CDC25B was more potent than CDC25C in causing premature entry into mitosis (Karlsson *et al.*, 1999), suggesting that the CDC25B phosphatase has a role in the control of the initiation of mitosis.

Controversial findings have been reported on the localization of CDC25B phosphatase. CDC25B was found to be nuclear in G2 phase and appears to translocate to cytoplasm at prophase (Gabrielli *et al.*, 1996, 1997). In a recent report, it was argued that CDC25B is located in the nucleus in G1 and then in the cytoplasm in S and G2 phases (Karlsson *et al.*, 1999). We identified the existence of splicing variants of CDC25B in human cells (Baldin *et al.*, 1997b; Forrest *et al.*, 1999). These isoforms differ by the presence or the absence of two peptides, peptide A (14 residues) and peptide B (41 residues), that are both located in the amino-terminus regulatory region of the phosphatase. It is therefore conceivable that these domains may play a role in the regulation of the CDC25B phosphatase activities and in their subcellular localization. Accordingly, it was suggested by Woo *et al.* (1999) that CDC25B2 was located in the cytoplasm in G1 and then in the nucleus in S to G2/M phase, while in contrast CDC25B3 was located in both the nucleus

*Correspondence: B Ducommun

Received 6 December 1999; revised 20 February 2000; accepted 28 February 2000

and the cytoplasm all along the cell cycle. By contrast, Karlsson's study claims that all three CDC25B variants display similar localization (Karlsson *et al.*, 1999).

Given the major discrepancies between the results published on that issue, we have examined in HeLa cells the localization of CDC25B protein and the molecular basis of its regulation. We have found that CDC25B is exported from the nucleus by a CRM1/exportin-dependent mechanism and also requires an intact interaction with 14.3.3 proteins.

Results

Localization of CDC25B

Transiently transfected HeLa cells were used to investigate by indirect immunofluorescence with monoclonal anti-HA antibodies the intra cellular localization of epitope-tagged versions of CDC25B wild type and mutant proteins.

Figure 1a shows the typical staining that was observed 24 h after transfection with the CDC25B3 variant. About 10–15% of the cells were transfected and expressed the CDC25B3 protein both in the cytoplasm and in the nucleus or alternately only in one of these sub cellular compartments. In order to get a quantitative view of these results, the experiment was repeated five times and more than 200 cells were counted for each independent transfection. As shown in Figure 1b, which summarizes these data, about 25% of cells expressing the CDC25B3 variant displayed a nuclear staining with cytoplasmic exclusion while about 15% presented a cytoplasmic staining with nuclear exclusion. The remaining cells (60%) displayed a cytoplasmic and nuclear staining. In agreement with a recent report (Karlsson *et al.*, 1999), similar results were obtained with the two other splice variants of CDC25B (not shown).

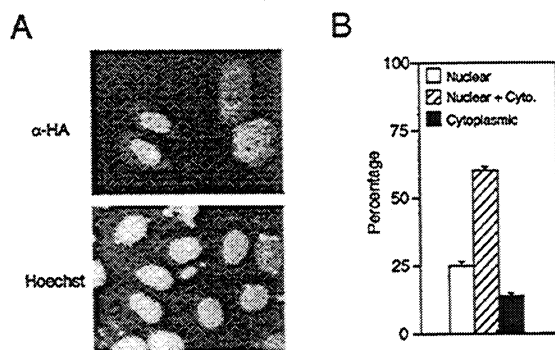


Figure 1 Subcellular localization of CDC25B. (a) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA₃ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of CDC25B3. Cells were fixed 24 h after transfection and stained with anti-HA antibodies and Hoechst 33342. The percentage of HA positive transfected cells varied between 10–15%. (b) Quantification of CDC25B variants intracellular localization. Percentage of cells displaying an exclusive nuclear staining (white bars), an exclusive cytoplasmic staining (black bars) or a cytoplasmic and nuclear staining (hatched bars) were derived from five independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The standard error to the mean is indicated

Nuclear localization of CDC25B3 is dependent on a nuclear localization signal

The CDC25B3 sequence contains a putative bipartite nuclear localization signal that is located between residues 335 and 353 (Figure 2a). To address the role of that region in the subcellular localization of CDC25B3, we made use of truncation and deletion mutants that were transfected in HeLa cells. In agreement with the prediction, we show that an internal deletion of CDC25B (Δ 138–356) that remove this region is sufficient to retain the protein in the cytoplasm (Figure 2b, top panel). Furthermore, we also demonstrate that truncated proteins 1–251 and 1–311 that comprise only the amino-terminal domain of CDC25B are also retained in the cytoplasm. To further substantiate these results we constructed a CDC25B-NLS mutant in which the KRR motif (residues 350–352) was substituted for AGA. As shown in Figure 2c,d, this mutant protein was only localized in the cytoplasm of the transfected HeLa cells. We can conclude from these experiments that the putative NLS is functional and is essential for the nuclear localization of CDC25B.

Nuclear exclusion of CDC25B is dependent on a nuclear export signal

We performed a search for a nuclear export sequence (NES) in CDC25B. Examination of CDC25B3 sequence reveals two leucine rich domains in the amino-terminus end of CDC25B3 between residues 29–40 (LPGLLLGSHGLL) and residues 55–67 (LTQTMH-DLAGLGS). These two sequences only partially match the canonical L(X)_{2–3}L(X)_{2–3}LXL motif for NES (Bogerd *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 1995) but a number of variations on this initial theme have already been reported (Yan *et al.*, 1998). In addition, alignment with a number of CDC25 proteins from other species including *Xenopus*, in which a functional NES has been identified (Yang *et al.*, 1999), reveals that both domains encompass evolutionary conserved residues and that the first one aligns with the *Xenopus* CDC25C NES (see Figure 3a).

In order to test the hypothesis that CDC25B3 could contain a functional NES, we made use of mutant proteins that were truncated in the amino-terminus end. As shown in Figure 3b,c, deletion of 58 residues was sufficient to retain CDC25B3 in the nucleus of about 75% of the cells as compared to about 25% with wild type CDC25B3. Larger deletion had a similar and even stronger effect. In every case, no cells expressing truncated forms of CDC25B3 displayed exclusively cytoplasmic staining. Two residues whose mutation abolished *Xenopus* CDC25 nuclear export are indicated in Figure 3a. We mutated the corresponding Leu-34 and Ser-36 residues in human CDC25B and examined the subcellular localization of that mutant protein. As reported in Figure 3c, in about 75% of the cells L34A-S36A-CDC25B3 displayed an exclusive nuclear localization.

Leptomycin B (LMB) is an inhibitor of exportin/CRM1 that is involved in nuclear export (Kudo *et al.*, 1997, 1998, 1999; Nishi *et al.*, 1994). We tested the effect of LMB by adding it to HeLa cells that were transiently transfected to express CDC25B3 and mutants. As illustrated in Figure 4a and quantitated

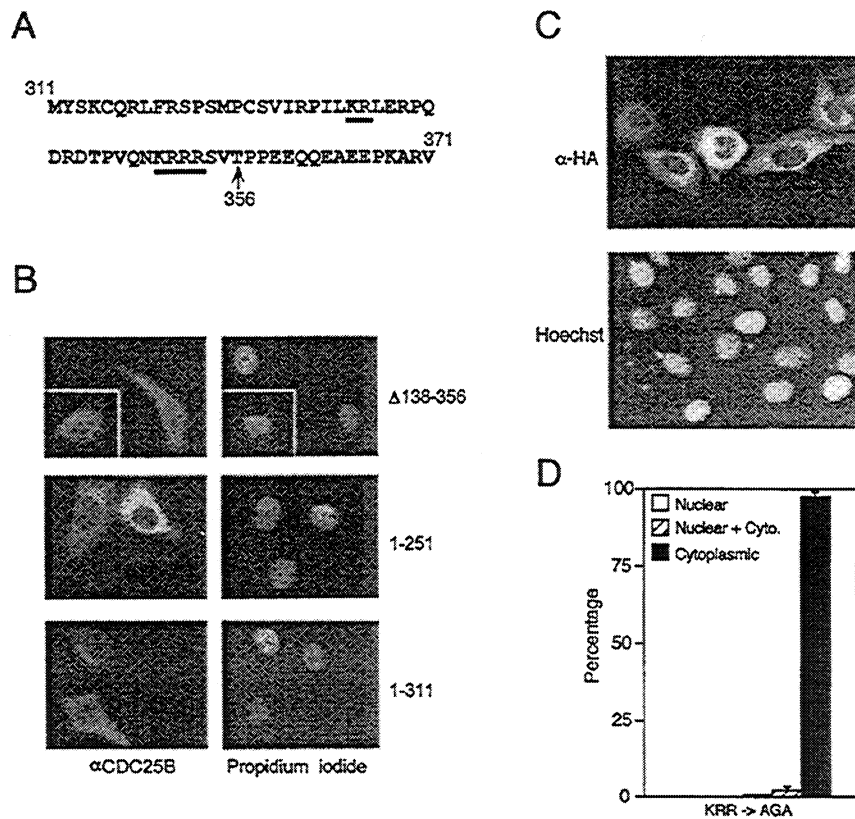


Figure 2 CDC25B contains a putative NLS that is required for its nuclear targeting. (a) The CDC25B sequence surrounding the putative bipartite nuclear localization signal (underlined) is presented. The arrow indicates residue 356. (b) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pUCSR α vector allowing the expression of the Δ 138–356 CDC25B3 protein and the 1–251 and 1–311 carboxy-terminal deletion mutants. These three constructs do not carry the putative NLS. Cells were fixed 24 h after transfection and stained with anti-CDC25B antibodies and propidium iodide. (c) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with a pcDNA $_3$ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of CDC25B3-NLS, a mutant in which the KRR motif (350–352) was substituted for AGA. Cells were fixed 24 h after transfection and stained with anti-HA antibodies and Hoechst 33342. (d) Quantification of the percentage of cells expressing the CDC25B-NLS mutant (KRR->AGA) and displaying nuclear staining (white bars), cytoplasmic staining (black bars) or cytoplasmic and nuclear staining (hatched bars) derived from four independent experiments

in the histogram shown in Figure 4b, treatment with LMB caused full length CDC25B3 to accumulate in the nucleus. The proportion of exclusively nuclear staining cells increasing from 25% in controls to 80% in the LMB treated cells. A low number of cells displayed a uniform cytoplasm and nuclear staining (decreased from 60% in controls to 20% with LMB treatment), but there were no cells with an exclusive cytoplasmic staining. We could not detect any difference in the subcellular localization of the truncated versions of CDC25B3 which had the putative NES deleted, in this assay.

These results indicate that the localization of CDC25B3 is regulated by nuclear export and together with the results obtained with the truncated and point mutants suggest that an essential determinant for such regulation is located in the first 43 residues of the protein and involve both Leu-34 and Ser-36.

Mutation of S323 abolishes cytoplasmic localization of CDC25B3

It has been proposed that the interaction between CDC25 and members of the 14-3-3 family is an essential process in the regulation of the G 2 /M

checkpoint that is activated by DNA damages or unreplicated DNA. We recently demonstrated that mutation of Ser-323 is sufficient to abolish the interaction between CDC25B and the 14-3-3 proteins (Mils *et al.*, 2000). We therefore wished to examine whether that interaction was involved in the cytoplasmic localization of CDC25B. The localization of a Ser-323-Gly mutant was therefore investigated using both full size CDC25B and a truncated version of CDC25B that lacks the 242 first residues. As shown in Figure 5a, both proteins were located in the nucleus. A statistical analysis of the results (Figure 5b) indicates that with both Δ N242-S323G and S323G-CDC25B mutants more than 92% of the cells displayed an exclusive nuclear localization and none of them displayed an exclusive cytoplasmic staining. Similarly, mutation of S323 to either Ala, or Glu did not alter the exclusive nuclear localization of CDC25B (data not shown). Thus, interaction of CDC25B with 14-3-3 proteins appears to be essential for its cytoplasmic localization.

CDC25B3 does not interact with cyclin B

Since it has recently been suggested that cyclin B could also participate to CDC25B export (Karlsson *et al.*,

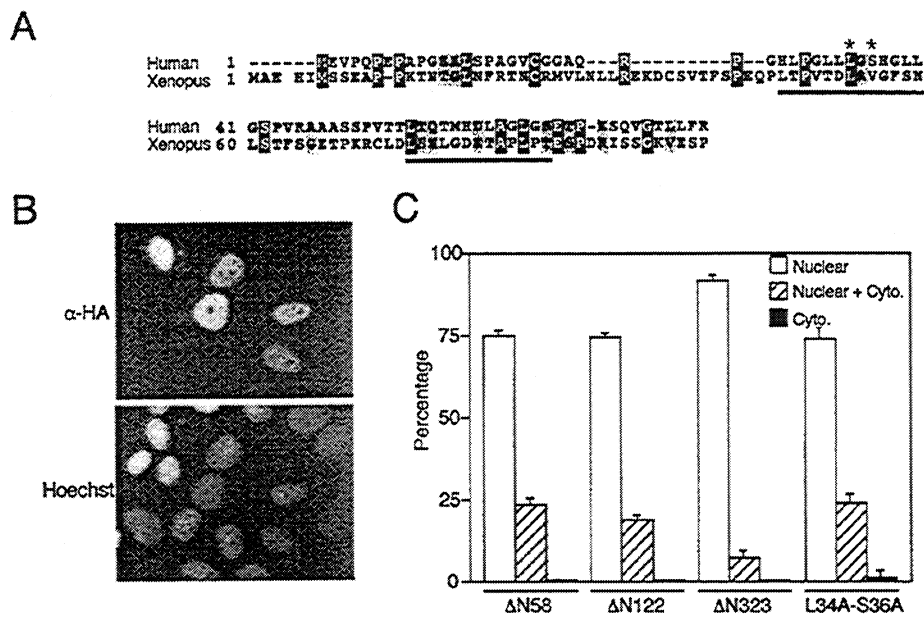


Figure 3 The amino-terminus of CDC25B contains a putative NES. (a) Alignment of the amino-terminus end of the *Xenopus* CDC25 and the human CDC25B sequences. Identical and conserved residues are indicated in black and grey background respectively. Two leucine rich domains that at least partially match the nuclear export signal consensus sequence are underlined twice. The first domain aligns with the one identified in *Xenopus* CDC25 and the two residues whose mutation abolished nuclear export are indicated with a star (Yang *et al.*, 1999). (b) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA₃ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of the ΔN58-CDC25B3 protein. Cells were fixed 24 h after transfection and stained with anti-HA antibodies. (c) Quantification of CDC25B3 amino-terminus truncation and Leu34A-Ser36A point mutants intracellular localization. The percentage of cells displaying an exclusive nuclear staining (white bars) or cytoplasmic and nuclear staining (hatched bars) were derived from three independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The standard error to the mean is indicated. None of the cells transfected with amino-terminus truncated CDC25B mutants displayed an exclusive cytoplasmic staining

1999), we investigated the physical interaction of these two proteins *in vivo*. In that aim, ³⁵S-metabolic labelling was performed on HeLa cells transiently transfected with CDC25B3 and the association with cyclin B was examined. ³⁵S-labelled epitope-tagged CDC25B3 was immunoprecipitated from pcDNA₃-HA-CDC25B3 transfected cells using anti-HA antibodies but not from mock cells transfected with the pcDNA₃-HA vector. In contrast, endogenous cyclin B was immunoprecipitated from both CDC25B3 and control transfected cells (Figure 6). However, no co-immunoprecipitation of cyclin B and CDC25B3 was detected in the transfected cells.

Discussion

In this work we have investigated the molecular basis of the regulation of CDC25B3 subcellular localization. Our results indicate that CDC25B3 is located either in the cytoplasm or in the nucleus and that this localization is dependent on (i) a nuclear localization sequence; (ii) a nuclear export signal; and (iii) the interaction with 14-3-3 proteins.

CDC25B contains a nuclear localization signal

We have shown here that the nuclear localization of CDC25B3 is dependent on the presence of a putative NLS that is located in the region between residues 311 and 356. This domain encompasses a canonical bipartite nuclear localization sequence and is identical

to the *Xenopus* CDC25 NLS (Yang *et al.*, 1999). To support that conclusion, we have shown that a deletion of residues 138 to 356 is sufficient to abrogate CDC25B3 nuclear localization and that the amino-terminal domain (residues 1–251 and 1–311) do not contain the molecular determinant for nuclear targeting. Furthermore, point mutagenesis of the KRR motif was sufficient to fully abolish nuclear import thus indicating that the NLS is functional.

CDC25B does have a functional NES

Here we report that CDC25B3 localization is dependent on a nuclear export mechanism that is inhibited by Leptomycin B, a specific inhibitor of exportin/CRM1 (Kudo *et al.*, 1998, 1999). We also show that an amino-terminus deletion of CDC25B3 is sufficient to abrogate CDC25B3 export. Although, it is not a canonical motif (Bogerd *et al.*, 1996), we have found that a putative NES is located in that region of the protein and that point mutations of Leu34 and Ser36 had a similar inhibitory effect on nuclear export of CDC25B3. This effect was only partial with about 75% of cells displaying an exclusively nuclear localization as compared to 25% with the wild type protein, suggesting that additional residues might also participate to the export process. In support to our hypothesis, that region is conserved with *Xenopus* CDC25 where its mutation also abolishes nuclear export (Yang *et al.*, 1999). Thus in contrast to what was argued by Karisson *et al.* (1999), we propose that CDC25B possess its own nuclear export signal and is exported independently of cyclin B.

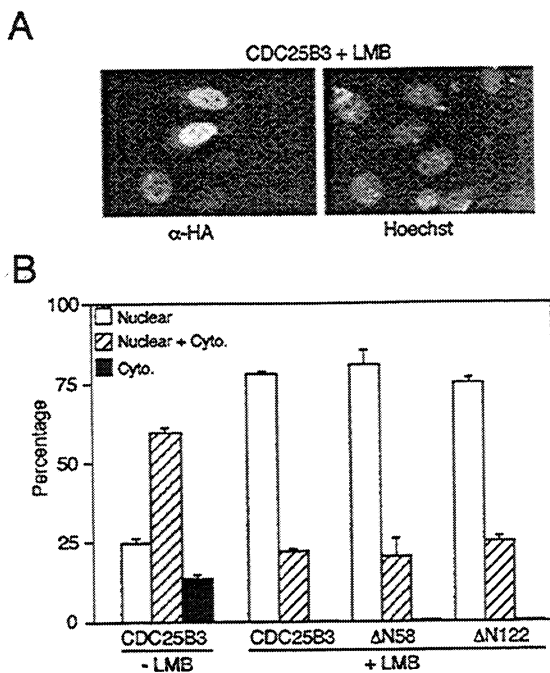


Figure 4 Effects of Leptomycin B treatment on the localization of CDC25B. (a) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA₃ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of wild type CDC25B3 (a and b) and ΔN58 and ΔN122 truncation mutants (b). Cells were treated with 20 ng/ml of LMB for 2 h. They were fixed 24 h after transfection and stained with anti-HA antibodies and Hoechst 33342. (b) Quantification of CDC25B3 and mutants intracellular localization. Percentage of cells displaying an exclusive nuclear staining (white bars) or cytoplasmic and nuclear staining (hatched bars) were derived from five independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The standard error to the mean is indicated. None of the LMB-treated cells displayed an exclusive cytoplasmic staining

Several evidences are in favour of our hypothesis. In our work CDC25B3 was expressed to a level that is at least one order of magnitude in excess to the cyclin B level (data not shown). It is therefore unlikely that every CDC25B3 molecule could interact with a cyclin B partner to be efficiently exported from the nucleus. Accordingly, in our experimental conditions, CDC25B3 and cyclin B pull down experiments from CDC25B3 transfected cells did not reveal any association with cyclin B (Figure 6). Although we are not excluding an interaction between these proteins, the amount of complex between CDC25B and cyclin B is probably very minor in regard to the total amount of CDC25B3 in transfected cells. Thus our results suggest that different mechanisms may be involved in the nuclear export of CDC25B3 and cyclin B.

Interaction with 14-3-3 proteins is required for cytoplasmic localization of CDC25B3

Several recent reports have demonstrated that S216 in human CDC25C is a major determinant of the interaction with 14-3-3 proteins. We have recently shown that S323 (the homologue of S216 in CDC25C) is a major 14-3-3 binding site in CDC25B, and that the S323G-CDC25B3 mutant is unable to interact with 14-3-3 proteins (Mils et al., 2000). As reported here, that

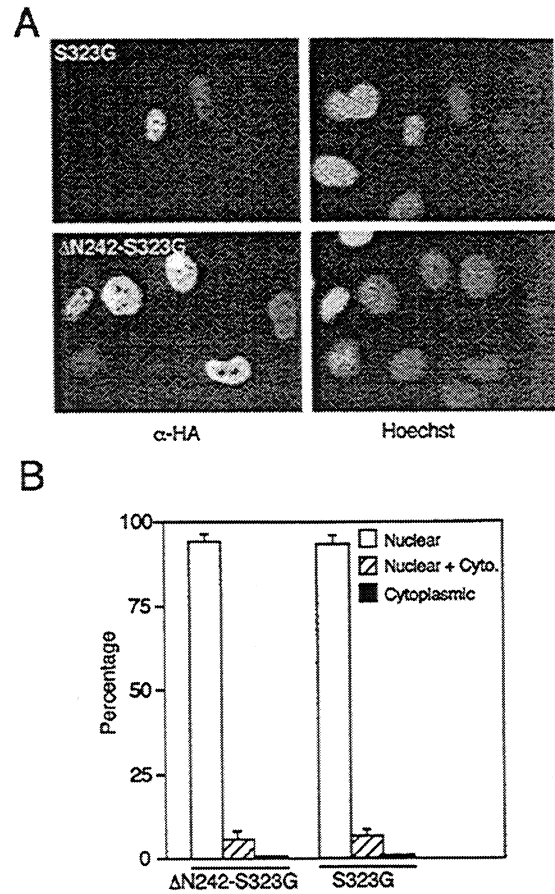


Figure 5 Effects of mutation of Ser-323 on CDC25B cytoplasmic localization. (a) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA₃ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of full size or ΔN242-CDC25B3 protein carrying a Ser to Gly substitution at residue 323. Cells were fixed 24 h after transfection and stained with anti-HA antibodies (left panels) and Hoechst 33342 (right panels). (b) Quantification of the intracellular localization. Percentage of cells displaying an exclusive nuclear staining (white bars) or diffuse staining (hatched bars) were derived from five independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The standard error to the mean is indicated. None of the cells displayed an exclusive cytoplasmic staining

mutation abolished cytoplasmic localization of CDC25B3. In the case of the deletion of the NES containing domain, 75% of cells displayed a nuclear CDC25B3 localization and the additional mutation of S323 was sufficient to fully retain CDC25B3 in the nucleus. Thus, the interaction of CDC25B3 with 14-3-3 appears to be an essential parameter regulating its subcellular localization.

These results are in agreement with the data of Dalal et al. (1999) who demonstrate that the cytoplasmic localization of human CDC25C requires an intact 14-3-3 binding site. In *Xenopus*, Kumagai and Dunphy (1999) also demonstrated that the interaction of CDC25 with 14-3-3 epsilon provokes the cytoplasmic retention of CDC25. Similarly, in fission yeast, cdc25 is exported from the nucleus by binding to the rad24 14-3-3 protein (Lopez-Girona et al., 1999).

An alternative possibility is, as suggested from the work performed on *Xenopus* CDC25 (Kumagai and

Dunphy, 1999; Yang *et al.*, 1999), that 14-3-3 binding inhibits nuclear import of CDC25B3 by masking the NLS or preventing the interaction with importins. The mutation of Ser-323 may then unmask the strong NLS, leading to a shift of the balance towards nuclear import.

Thus, it appears that interaction between CDC25 phosphatases and members of the 14-3-3 family is probably a common feature in the regulation of the subcellular localization of these enzymes.

In conclusion, we propose a working model to summarize our results (Figure 7). The NLS and the NES of CDC25B3 that we have identified are responsible of the nucleo-cytoplasmic shuttling of the protein. Mutation of either of these two domains affects the localization of CDC25B, which is then fully cytoplasmic or fully nuclear respectively. In this model,

interaction with 14-3-3 protein is dependent on a modification of CDC25B3 occurring in the nucleus or immediately upon nuclear export. This modification could for instance be a phosphorylation event by a kinase such as the c-TAK1 kinase (Peng *et al.*, 1998), a checkpoint kinase (Matsuoka *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 1997), or the interaction with another regulatory partner.

Materials and methods

Cell culture and transfection

HeLa cells, obtained from the American Type Culture Collection, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (Eurobio), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Transfections were achieved using linear ethylenimine polymers (PEI) (EXGEN 500, Euromedex) according to the instruction of the manufacturer using 2 µg of purified plasmid. The transfection efficiency was usually in the range of 10–15%. For the experiment reported in Figure 2b, HeLa cells were transfected by electroporation.

For the indicated experiments, transfected cells were treated with Leptomycin B (20 ng/ml) during 2 h before fixation.

Immunofluorescence

Twenty-four hours after transfection, cells grown on glass coverslips were recovered, washed once with PBS, fixed in 3.7% formaldehyde in PBS at 4°C for 20 min then washed three times with PBS. Cells were then permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature and with a further incubation in 100% cold methanol for 10 min at -20°C. Fixed and permeabilized cells were then saturated with 1% BSA in PBS for 15 min at room temperature then washed three times in PBS/BSA. The cells were then incubated for 1 h at 37°C with monoclonal anti-HA antibody (kindly provided by P Léopold) diluted 1/800 in PBS/BSA 1%. After three washes with PBS/BSA 1%, the cells were incubated with Alexa 594-conjugated goat anti-mouse antibodies (Molecular Probes) diluted in PBS/BSA 1% for 45 min at room temperature, washed in PBS/BSA 1% and finally incubated with Hoechst 1 µg/ml for 10 min at room temperature. Coverslips were washed with PBS and mounted in Mowiol. For the experiments reported in Figure 2, staining was performed using an affinity purified antibody raised against CDC25B3 1–311 (Gabrielli *et al.*, 1996). Cells were counter stained for DNA using propidium iodide.

Microscopic examination were performed under a Leica photomicroscope. Pictures were taken on Kodak Tmax 400 films. All the experiments were repeated at least three times and a minimum of 200 transfected cells were examined for each independent experiments. The statistical analysis were performed as following: $SD = \sqrt{(\sum(x-m)^2)/(n-1)}$ and $s.e.m. = s.d./\sqrt{n}$ where m is the percentage mean value and n the number of experiments.

Plasmids construction

To produce CDC25B 1-251, pUCSRα CDC25B3 (Gabrielli *et al.*, 1996) was digested with *AvrII* and the 1.2 kb *AvrII/AvrII* fragment was ligated into *AvrII/XbaI* digested pUCSRα in the original orientation. CDC25B 1-311 was produced by removing the *BsrGI/XhoI* fragment from pUCSRα CDC25B3 containing the 3' end of CDC25B3 coding region and 3'UTR. The remaining fragment was end filled and religated. The

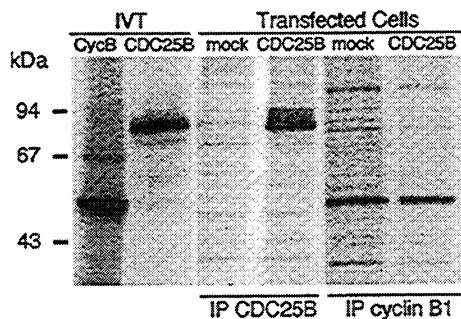


Figure 6 CDC25B3 does not interact with cyclin B. Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA₃-HA vector (mock cells) or pcDNA₃ vector allowing the expression of HA epitope-tagged version of CDC25B3. Metabolic labelling with ³⁵S-methionine/cysteine was carried out for 2 h. Immunoprecipitations were performed using anti-HA (for CDC25B3) or anti-cyclin B polyclonal antibodies and the samples were run on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis prior to autoradiography. *In vitro* translated ³⁵S-methionine-labelled CDC25B3 and cyclin B are shown in the two first lines as control

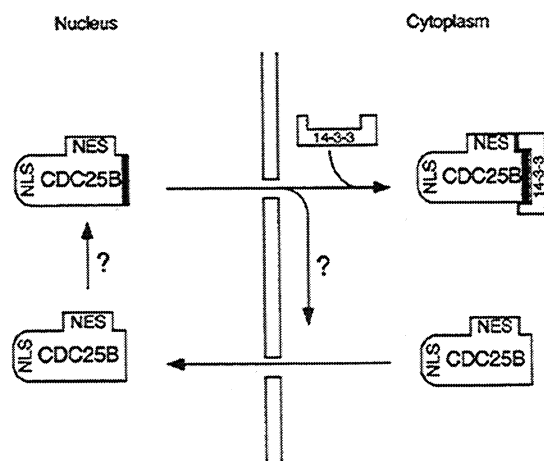


Figure 7 Current working model for the nucleo-cytoplasmic shuttling of CDC25B. CDC25B is first targeted to the nucleus in a NLS-dependent manner. Export to the cytoplasm is dependent on the amino-terminal nuclear export signal (NES). We propose that post-translational modifications occurring in the nucleus or after nuclear export allow the interaction with 14-3-3 proteins that is essential to trap CDC25B in the cytoplasm (see text for more details)

internal truncation of residues 138–356 from CDC25B3 (CDC25B D138–356) was produced by sequential digestion of pSVK3 CDC25B3 (Gabrielli *et al.*, 1996) with BstB1 then Bsu361 to remove a 0.66 kb fragment of the coding region, the 5' overhangs filled and religated. The CDC25B D138–356 was subcloned into pUCSR α by excising the *XhoI/XbaI* fragment from pSVK3 into the corresponding sites in pUCSR α .

Other plasmids were constructed using the pcDNA₃-HA vector and DNA inserts from wild type and mutants CDC25B3 cDNA that have been described elsewhere (Mils *et al.*, 2000). The triple HA-tag was placed in frame with the coding sequences at their amino-terminal end. The residues numbering that are given in this study do not take into account these additional 20 amino-acids and only refer to the sequence from the natural CDC25B initiating codon.

Mutation (L34A-S36A) in the putative NES sequence was generated by PCR on the pcDNA₃-HA CDC25B3 plasmid using the primer 5' - GGC CTC CTG GCG GGG GCC CAT GGC CTC CTG - 3' (sense) and 5' - CAG GAG GCC ATG GGC CCC CGC CAG GAG GCC - 3' (antisense), and the Pfu DNA polymerase (Promega).

Metabolic labelling and immunoprecipitation

For metabolic labelling, transiently pcDNA₃-HA CDC25B3 transfected cells were preincubated 30 min in methionine and

cysteine-free DMEM, followed by the addition of [³⁵S]methionine/cysteine (1000 Ci/mmol; Amersham) to a final concentration of 187.5 μ Ci/ml for 2 h before recovering the cells. Cells were lysed for 30 min at 4°C, in lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT and protease and phosphatase inhibitors (Baldin *et al.*, 1997a). Immunoprecipitations were performed using either polyclonal antibodies raised against human cyclin B1 (Baldin, unpublished data) or monoclonal anti-HA antibodies. *In vitro* transcription and translation of CDC25B3 and cyclin B1 were performed using the TNT quick system (Promega) in the presence of [³⁵S]methionine. Proteins were analysed by electrophoresis on SDS-12.5% polyacrylamide gels and autoradiography.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge G Cassar for his kind help with FACS analysis. We acknowledge J-M Darbon for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, l'Université Paul Sabatier, l'Association pour la Recherche sur le Cancer, l'Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie and la Ligue Nationale Contre le Cancer. N Davezac was a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research.

References

- Baldin V, Cans C, Knibiehler M and Ducommun B. (1997a). *J. Biol. Chem.*, **272**, 32731–32735.
- Baldin V, Cans C, Superti-Furga G and Ducommun B. (1997b). *Oncogene*, **14**, 2485–2495.
- Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J and Cullen BR. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4207–4214.
- Dalal SN, Schweitzer CM and DeCaprio JA. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4465–4479.
- Forrest AR, McCormack AK, DeSouza CP, Sinnamon JM, Tonks ID, Hayward NK, Ellem KA and Gabrielli BG. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 510–515.
- Gabrielli BG, Clark JM, McCormack AK and Ellem KA. (1997). *Oncogene*, **15**, 749–758.
- Gabrielli BG, DeSouza CPC, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK and Ellem KAO. (1996). *J. Cell. Science*, **109**, 1081–1093.
- Galaktionov K and Beach D. (1991). *Cell*, **67**, 1181–1194.
- Garner-Hamrick PA and Fisher C. (1998). *Int. J. Cancer*, **76**, 720–728.
- Jessus C and Ozon R. (1995). *Prog. Cell Cycle Res.*, Vol. 1. Meijer L, Guidet S and Tung HYL (eds). Plenum Press: New York, USA, pp. 215–228.
- Karlsson C, Katich S, Hagting A, Hoffmann I and Pines J. (1999). *J. Cell. Biol.*, **146**, 573–584.
- Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M and Horinouchi S. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 29742–29751.
- Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M and Horinouchi S. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 15151–15158.
- Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S and Yoshida M. (1998). *Exp. Cell. Res.*, **242**, 540–547.
- Kumagai A and Dunphy WG. (1999). *Genes Dev.*, **13**, 1067–1072.
- Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansoerge W and Hoffmann I. (1998). *J. Cell Science*, **111**, 2445–2453.
- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O and Russell P. (1999). *Nature*, **397**, 172–175.
- Matsuoka S, Huang M and Elledge SJ. (1998). *Science*, **282**, 1893–1897.
- Mils V, Baldin V, Pinta I, Goubin F, Papin C, Waye M, Eychenne A and Ducommun B. (2000). *Oncogene*, **19**, 1257–1265.
- Morgan DO. (1995). *Nature*, **374**, 131–134.
- Nagata A, Igarashi M, Jinno S, Suto K and Okayama H. (1991). *The new Biologist*, **3**, 959–968.
- Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S and Beppu T. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 6320–6324.
- Nishijima H, Nishitani H, Seki T and Nishimoto T. (1997). *J. Cell. Biol.*, **138**, 1105–1116.
- Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes III MJ, Wu Z, Stephenson MT and Piwnicka-Worms H. (1998). *Cell Growth Differ*, **9**, 197–208.
- Russell P and Nurse P. (1986). *Cell*, **45**, 145–153.
- Sadhu K, Reed SI, Richardson H and Russell P. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5139–5143.
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H and Elledge SJ. (1997). *Science*, **277**, 1497–1501.
- Woo ES, Rice RL and Lazo JS. (1999). *Oncogene*, **18**, 2770–2775.
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY and Taylor S. (1995). *Cell*, **82**, 463–473.
- Yan C, Lee LH and Davis LI. (1998). *EMBO J.*, **17**, 7416–7429.
- Yang J, Winkler K, Yoshida M and Kornbluth S. (1999). *EMBO J.*, **18**, 2174–2183.

III.3. Conclusions et perspectives.

Les études sur la localisation intra-cellulaire des phosphatases CDC25B dans les cellules somatiques sont rares et controversées. Nous avons montré que lors de la transfection transitoire de cellules HeLa, les trois variants de la phosphatase CDC25B (étiquetés HA) présentent des localisations nucléaire et cytoplasmique strictes ou diffuses dans toute la cellule. Ajoutons à cela que nous avons obtenu les mêmes résultats, dans des clones inductibles stabilisés pour l'expression de CDC25B (U2OS-tTA-HACDC25B) ainsi qu'avec des cellules HeLa transfectées transitoirement par les différents isoformes étiquetés par GFP. Ces trois isoformes ne diffèrent que très peu dans leurs localisations, nous devons cependant noter que la forme CDC25B2 présente une accumulation nucléaire plus importante. Cette localisation pourrait laisser penser que cette phosphatase est plus active. Il est tentant de corréler cette localisation nucléaire de CDC25B2 à son potentiel oncogénique plus marqué dans différentes tumeurs. Toutefois, le pourcentage de cellules HeLa en mitose, transfectées transitoirement par les trois isoformes, montre que CDC25B1 possède un pouvoir d'inducteur mitotique plus important (20% de cellules en mitose) que CDC25B2 ou B3 (10-13% de cellules en mitose)(Baldin, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent donc l'existence de mécanismes autres que la régulation de la localisation intra-cellulaire de CDC25B.

Concernant maintenant la localisation de CDC25B au cours du cycle cellulaire, les données de la littérature sont contradictoires en fonction du variant étudié et de l'approche utilisée. Une première étude, réalisée sur la protéine endogène CDC25B, montrait que CDC25B était nucléaire en G2 et transloquait dans le cytoplasme en prophase (Gabrielli et al., 1997; Gabrielli et al., 1996). Plus récemment, la localisation des trois variants de CDC25B au cours du cycle cellulaire a été rapportée dans deux

publications dont les résultats divergent grandement. En effet, l'une des études (Karlsson et al., 1999) propose une même localisation nucléaire en G1 des trois phosphatases, puis cytoplasmique en phase S et G2 ; alors que l'étude de Woo et collaborateurs conclue à une localisation pan-cellulaire de CDC25B3 au cours de tout le cycle, et que CDC25B2 serait tout d'abord dans le cytoplasme en G1 puis nucléaire en phase S et G2/M. Ces divergences obtenues quant à la localisation des trois variants de CDC25B peuvent être dues aux systèmes expérimentaux utilisés. Dans un cas, il s'agit de transfection transitoire (Karlsson et al., 1999) alors que dans l'autre, les travaux ont été réalisés sur des lignées stables où l'expression de CDC25B est constitutive. Il se pourrait que ces lignées se soient « adaptées » à l'expression constitutive de CDC25B3 et que les localisations observées en soient la résultante. Les expériences que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de faire le lien entre la localisation intra-cellulaire de la phosphatase CDC25B et les phases du cycle cellulaire. En effet, nous avons essayé sur les cellules transfectées CDC25B de réaliser des marquages avec le bromodésoxyuridine (BrdU) afin de détecter les cellules en phase S. Les résultats ont tous été négatifs : pas de détection du BrdU. Différents contrôles ont abouti aux conclusions suivantes : les polymères d'éthylèneimine utilisés pour la transfection empêchaient l'incorporation du BrdU et de synchroniser les cellules. Des doubles marquages CDC25B et cycline D ou cycline B qui nous auraient permis d'identifier les phases du cycle cellulaire n'ont donné aucun résultat exploitable. Aussi, l'utilisation des clones U2OS-tTA-HACDC25B facilement synchronisables par différentes drogues (double bloc thymidine, nocodazole ou aphidicoline) pourraient apporter la réponse à ces questions.

Nous avons également montré que la cycline B n'était en rien responsable de l'export de CDC25B du noyau. En effet, selon les études de Karlson et ses collaborateurs, la translocation cytoplasmique de CDC25B serait le résultat d'une

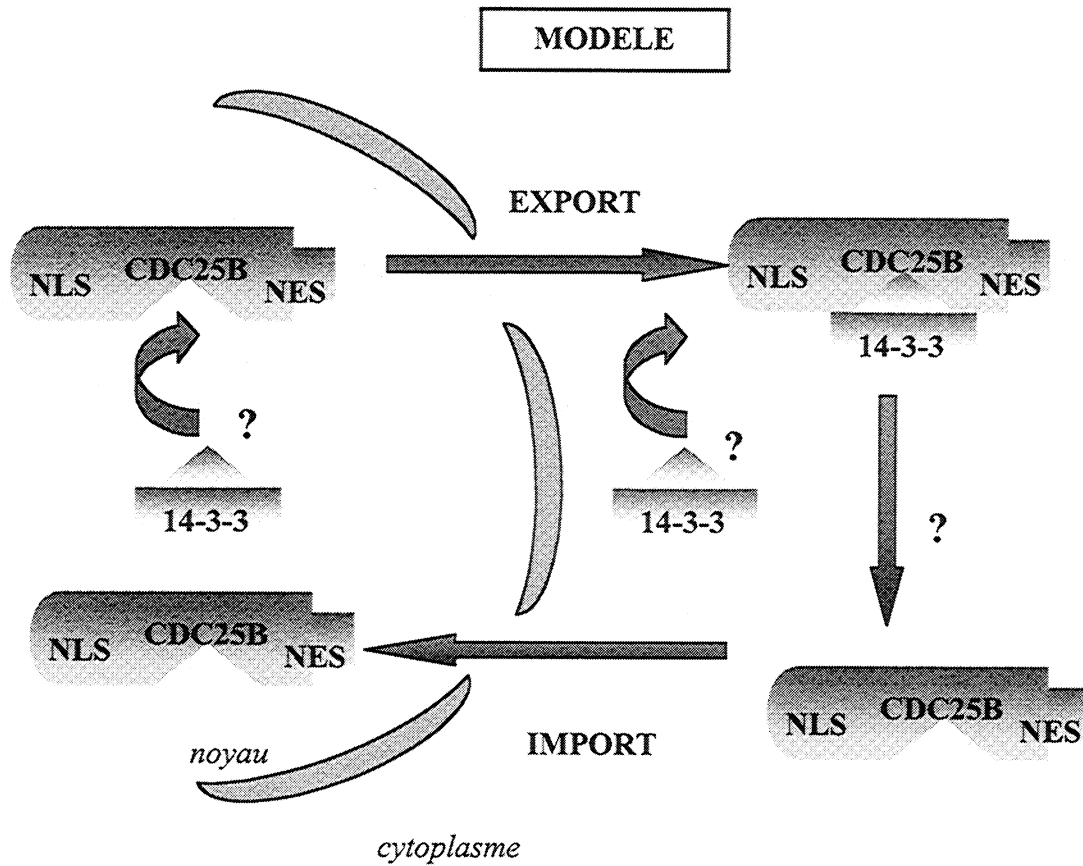


Figure 18: Transport nucléo-cytoplasmique de CDC25B et modèle de fonctionnement des interactions entre les protéines de la famille 14-3-3 et CDC25B.

La phosphatase CDC25B réalise un va et vient entre le cytoplasme et le noyau grâce à ses NES et NLS. La séquestration cytoplasmique est assurée par les protéines de la famille 14-3-3. Cependant, de nombreux mécanismes restent inconnus notamment les signaux d'association/dissociation ainsi que la possibilité d'une interaction dans le noyau entre les deux protéines.

interaction avec la cycline B1 : la cycline B1 possédant une NES prendrait en charge la phosphatase CDC25B afin de la conduire dans le cytoplasme (Karlsson et al., 1999). Toutefois, l'interaction entre CDC25B et la cycline B a été réalisée *in vitro*. Aussi, nous avons cherché à mettre en évidence cette interaction *in vivo*. Après transfection transitoire de CDC25B et un radiomarquage à la méthionine ³⁵S, suivis d'immunoprécipitations anti-cycline B ou CDC25B, nous n'avons jamais mis en évidence d'association entre ces deux protéines.

De plus, nous avons montré la présence d'une NES fonctionnelle (avec l'utilisation de mutants ponctuels et la leptomycine B) dans la partie amino-terminale de la protéine. Ce résultat est en accord avec une étude réalisée sur CDC25 de xénope qui prouvait l'existence d'une NES dans la partie amino-terminale de CDC25. Des expériences réalisées avec la leptomycine B avaient également étayé ce résultat (Yang et al., 1999). Une étude similaire a également mis en évidence une NES fonctionnelle pour CDC25C (Graves et al., 2001).

Notre étude a également porté sur les déterminants moléculaires intervenant dans la localisation nucléaire de la phosphatase et nous avons montré l'existence d'une séquence de localisation nucléaire fonctionnelle. La phosphatase CDC25C possède elle aussi une NLS fonctionnelle (Graves et al., 2001).

L'implication des protéines 14-3-3 dans la rétention cytoplasmique de CDC25B a été prouvée (Figure 18). De plus, l'étude réalisée avec la phosphatase CDC25C confirme le fait que les protéines 14-3-3 jouent un rôle de séquestration cytoplasmique des phosphatases CDC25 (Graves et al., 2001) (pour revue (Muslin and Xing, 2000)). Nous devons rajouter que ces deux études ont été réalisées sans agressions pour la cellule et que ces résultats sont le reflet de situations « normales », hormis la surexpression des phosphatases, ce qui laisse penser que ce mode de régulation n'est pas particulier à une situation de stress. Cependant, nous pouvons nous demander

comment est ciblée l'interaction entre CDC25B et 14-3-3 dans le cytoplasme. En se basant sur les résultats obtenus pour CDC25C, il est possible d'envisager une interaction constante entre CDC25B et 14-3-3 durant toute l'interphase. Une kinase (qu'il reste à identifier) phosphorylerait un ou plusieurs sites de liaison à 14-3-3 dont découlerait une association entre les deux protéines en interphase. De plus, grâce aux résultats récents de Lopez-Girona sur CDC25 de *S. pombe* et à ceux de Gabrielli (CDC25B humaine), il est possible d'envisager une interaction de CDC25B et 14-3-3 dans le cytoplasme ou le noyau et que cette interaction inhibe en parallèle l'activité de CDC25B (Forrest and Gabrielli, 2001).

Une autre question importante est de savoir comment se dissocie le complexe CDC25B/14-3-3 dans le cytoplasme ou dans le noyau (Figure 18). Deux hypothèses peuvent être avancées : soit CDC25B est phosphorylée par une kinase Y soit l'interaction avec un nouveau partenaire aboutissent à un changement conformationnel pouvant induire une diminution de l'affinité pour 14-3-3 et/ou révéler la NLS et permettre ainsi à CDC25B de se relocaliser au niveau du noyau.

Enfin, puisque nous avons évoqué la séquestration cytoplasmique de la phosphatase CDC25B, la rétention nucléaire de CDC25B pose un certain nombre d'interrogations. Pour CDC25B1, la phosphorylation par le complexe CDK1/Cycline B est nécessaire à cette séquestration, qu'en est il pour les autres isoformes ? Nous pouvons également nous demander si des phosphorylations ou des associations avec d'autres partenaires ne changeraient pas l'affinité pour le système d'export. Prenons l'exemple du facteur de transcription Pho4 de la levure *Schizosaccharomyces pombe* nécessite une phosphorylation par le complexe Pho80/Pho85 pour son export nucléaire (Kaffman et al., 1998), nous pourrions donc envisager un mécanisme similaire pour la phosphatase CDC25B. La possibilité d'une interaction entre CDC25B et 14-3-3 dans le noyau peut également être évoquée. En effet, dans des conditions de stress

cellulaire, les kinases CHK1 et 2 sont nucléaires, dans ce cas, elles pourraient phosphoryler CDC25B et favoriser une interaction entre les deux protéines dans ce compartiment. Des études de fractionnement cellulaire sont à envisager et des tests d'activité phosphatase devraient être réalisés afin de vérifier si CDC25B est inactivée par les protéines de la famille 14-3-3.

Dans un domaine plus clinique, une question peut se poser : peut-on faire une corrélation entre la localisation des phosphatases CDC25 et un facteur de pronostic ? Cent tissus de patients atteints d'un carcinome des cellules squameuses de l'œsophage ont été analysés par immunohistochimie. Une forte expression des deux phosphatases a été retrouvée dans le cytoplasme de cellules cancéreuses (CDC25A 46% des cas et CDC25B 48% des cas). CDC25A+ et CDC25B+ ont été retrouvés plus fréquemment chez des patients avec une invasion tumorale plus profonde et des métastases dans les ganglions lymphatiques tandis que la grosseur de la tumeur n'était corrélée qu'à l'expression de CDC25A. La localisation nucléaire de CDC25A a été observée dans 51% des cas (sans se soucier de l'expression cytoplasmique) et n'a été associée à aucun pronostic ou facteur clinico-pathologique (Nishioka et al., 2001). Par conséquent, dans cette étude, il semblerait que la localisation de CDC25A ne soit pas un facteur de pronostic cependant, dans d'autres types de cancers, nous pouvons nous demander si la localisation intra-cellulaire des phosphatases CDC25 ne pourrait être corrélée à un facteur de pronostic.

Chapitre IV : RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES DE CDC25B.

La recherche de nouveaux partenaires peut être abordée par différentes techniques : double hybride, approches fonctionnelles, approches biochimiques par co-purification de complexes *in vivo* ou formation de complexes *in vitro*. J'ai entrepris la recherche de nouveaux partenaires/régulateurs de CDC25B par deux approches :

-Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire avaient mis en évidence que la protéine kinase Eg3 était capable *in vitro* de phosphoryler CDC25B. Ces résultats suggéraient que Eg3 puisse être un nouveau régulateur de CDC25B. J'ai donc cherché à caractériser les relations qui pouvaient exister entre CDC25B et Eg3 par une étude de leur interaction *in vitro* et *in vivo*.

-Par ailleurs, j'ai cherché à identifier de nouveaux partenaires de la phosphatase CDC25B par des approches biochimiques basées sur l'utilisation 1) de clones stabilisés pour l'expression conditionnelle de CDC25B, et 2) de protéines recombinantes CDC25B produites chez *E.coli* servant d'appât pour des protéines provenant d'extraits cellulaires.

IV.1. CDC25B et la protéine kinase Eg3.

IV.1.1. La protéine kinase Eg3.

L'ADNc codant pour la protéine Eg3 a été identifié lors d'un criblage différentiel d'une banque d'ADNc d'œufs de xénope avec huit autres clones (notés de Eg1 à Eg9) qui correspondent aux ARNms déadénylés rapidement après la fertilisation.

Certaines des protéines issues de ces ADNc ont été caractérisées. Ainsi, la séquence du clone Eg1 a montré une forte homologie avec p34 cdc2 (Paris et al., 1991) tandis que la kinase Eg2 appartient à la famille AURORA/AIRK dont les

membres régulent les évènements mitotiques basés sur les microtubules (Bischoff and Plowman, 1999; Giet and Prigent, 1999). Eg5 est une kinésine impliquée dans la formation du fuseau bipolaire et dans son mouvement avant et pendant l'anaphase (Heald, 2000) tandis que Eg7 est retrouvée associée aux chromosomes condensés pendant la mitose (Cubizolles et al., 1998).

L'ADNc de Eg3 code pour une protéine kinase et présente une certaine homologie avec la kinase C-TAK1 humaine, impliquée dans la phosphorylation de CDC25C sur la sérine 216. Ces deux kinases appartiennent à la famille de kinases KIN1/PAR1/MARK respectivement impliquées dans le contrôle de la morphologie cellulaire (Levin and Bishop, 1990), la polarité cellulaire (Guo and Kemphues, 1995) et la dynamique des microtubules (Drewes et al., 1997). De récents travaux réalisés sur la protéine Eg3 de Xénope apportent quelques indications sur la régulation de cette kinase (Blot et al., 2001). Ainsi, dans des cellules somatiques de Xénope, la kinase Eg3 est phosphorylée au cours de la phase G2 et sa mobilité électrophorétique (reflet de son état de phosphorylation) est minimale lorsque les cellules sont bloquées en mitose. Ajoutons à cela que pendant l'embryogénèse précoce du xénope, la phosphorylation de la kinase Eg3 est dépendante du cycle cellulaire et que son activité est maximale pendant la mitose. Pour résumer, la kinase serait inactive dans un état déphosphorylé et active dans un état phosphorylé.

IV.1.2. Mise en évidence du complexe Eg3/CDC25 *in vivo*.

Cette étude a été menée sur des clones stables inductibles (dont l'établissement et la caractérisation sont détaillés dans la partie IV.2) où l'expression de CDC25B est inhibée en présence de tétracycline et induite en absence de tétracycline.

- interaction avec CDC25B dans des cellules en croissance exponentielle.

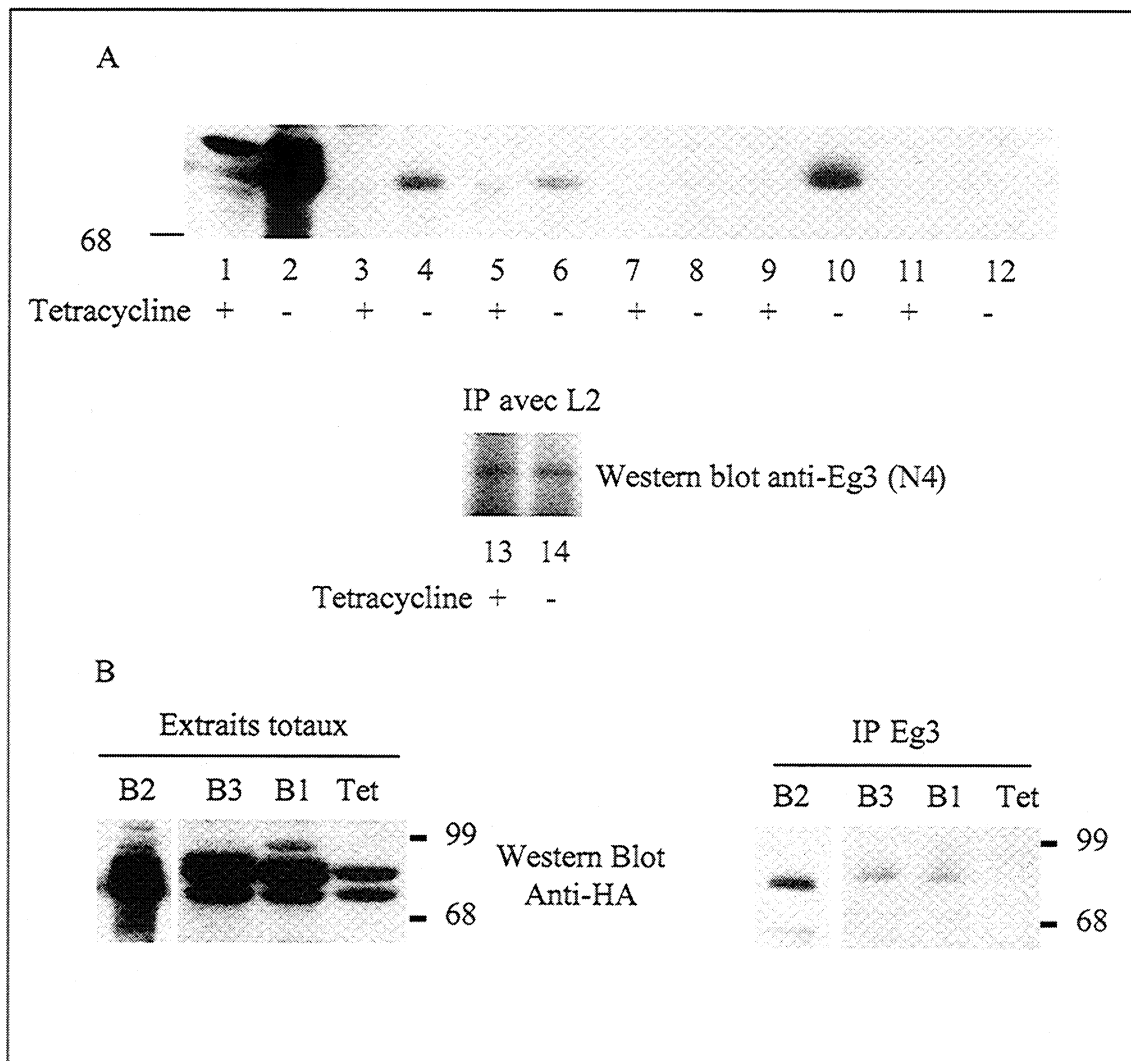


Figure 19: Interaction *in vivo* entre Eg3 et CDC25B.

A) 3 mg d 'extrait protéique du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.4 induits (-) ou non (+) ont été immunoprécipités par différents anticorps anti-Eg3 et les sérums préimmuns. (3,4) AM107, (5,6) anticorps N4, (7,8) sérum préimmun correspondant à l 'anticorps N4, (9,10) anticorps L2, (11,12) sérum préimmun correspondant à l 'anticorps L2, (1-2) 100 µg d'extrait total ont été analysés par SDS-PAGE suivi d 'un western blot anti-HA ou anti-Eg3 (N4) (13,14) (B) 5 mg d 'extrait cellulaire provenant des clones U2OS-tTA, U2OS-tTA-HACDC25B1 (B1), U2OS-tTA-HACDC25B2 (B2) et U2OS-tTA-HACDC25B3 (B3) cultivées en absence de tétracycline ont été immunoprécipités avec l'anticorps L2 anti-Eg3 de xénope et analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot anti-HA. 100 µg d 'extrait protéique total ont été analysés parallèlement.

Nous disposons de trois anticorps différents dirigés contre la protéine Eg3 (humaine ou de xénope) et de leurs sérums préimmuns respectifs. Le premier est un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine Eg3 de Xénope (L2), le second est polyclonal et est dirigé contre la protéine Eg3 humaine (N4) et le troisième est un anticorps monoclonal dirigé également contre la protéine Eg3 humaine (AM107). Nous avons donc testé leur capacité à immunoprécipiter la protéine Eg3 humaine dans des cellules U2OS surexprimant ou non CDC25B, et déterminé l'association ou non avec CDC25B. Les trois anticorps immunoprécipitent la protéine Eg3 mais avec des efficacités différentes. L'anticorps L2 dirigé contre la protéine Eg3 de xénope immunoprécipite de manière plus efficace la protéine que les anticorps mono et polyclonaux dirigés contre la protéine humaine.

Comme le montre la figure 19A, lors des immunoprécipitations de Eg3, un signal est détecté avec l'anticorps anti-HA à la taille attendue de CDC25B2 étiquetée HA dans les cellules induites. Nous pouvons également remarquer que les intensités de ces signaux varient en fonction de l'anticorps utilisé avec une intensité maximale pour l'anticorps anti-Eg3 de xénope (L2). Ce dernier sera donc utilisé pour les expériences qui suivent. Les différences observées sont dues aux variations de capacité d'immunoprécipitations de la protéine Eg3 humaine des différents anticorps. Aucun signal n'a été détecté avec les sérums préimmuns ou bien dans les cellules n'exprimant pas CDC25B2 (Figure 19A). Les immunoprécipitations inverses ont également été réalisées (immunoprécipitation anti-HA) mais ne permettent pas de visualiser la kinase Eg3 (cf IV.2).

La phosphatase CDC25B2 co-immunoprécipite in vivo avec la kinase Eg3.

L'interaction *in vivo* de Eg3 avec les autres isoformes de CDC25B (B1 et B3) a également été étudiée en utilisant l'anticorps anti-Eg3 L2 et les clones U2OS-tTA-HACDC25B1 et U2OS-tTA-HACDC25B3 induits (Figure 19B). Là encore, un signal

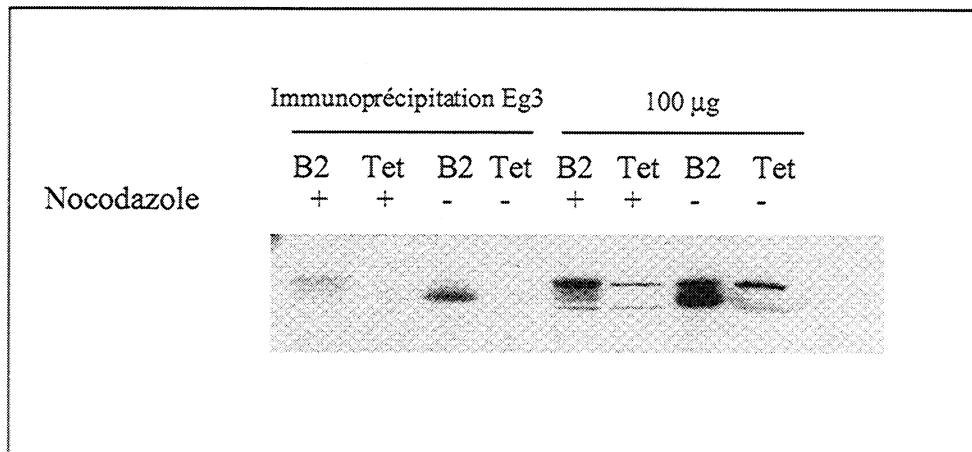


Figure 20: Interaction Eg3/CDC25B en mitose.

Des extraits protéiques (5mg) de cellules U2OS-tTA ou de cellules U2OS-tTA-HACDC25B2.4 traitées 18H par 150ng/ml de nocodazole ont été immunoprécipités par l'anticorps anti-Eg3 L2 et analysés par SDS-PAGE suivi d'un Western Blot anti-HA. 100 µg d'extrait total ont été analysés en parallèle. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux afin de valider le traitement au Nocodazole.

est détecté à la taille attendue de CDC25B1 et B3 étiquetées avec l'épitope HA. Une différence d'intensité est observée entre les trois variants de CDC25 et est imputable à des variations de l'expression de CDC25B des différents clones. En effet, le clone U2OS-tTA-HACDC25B2 surexprime la protéine CDC25B2 à un niveau plus important que U2OS-tTA-HACDC25B1 et U2OS-tTA-HACDC25B3 (Figure 19B, gauche).

In vivo, les trois formes de CDC25B interagissent de façon identique avec la protéine kinase Eg3.

-Interaction au cours du cycle cellulaire.

L'interaction entre Eg3 et CDC25B2 au cours du cycle cellulaire a été étudiée sur les cellules U2OS-tTA-HACDC25B2 induites et synchronisées en différents points du cycle par traitement avec différentes drogues.

Afin d'obtenir des cellules en mitose, le clone U2OS-tTA-HACDC25B2 induit ou pas pour l'expression de la phosphatase a été traité par du nocodazole. Les extraits cellulaires ont été soumis à une immunoprécipitation par l'anticorps L2 suivis d'une analyse par western blot avec un anticorps anti-HA. L'association de CDC25B2 avec Eg3 est détectée comme le montre la figure 20. Nous pouvons noter que l'expression de CDC25B2 dans les cellules traitées au nocodazole est moins importante que dans les cellules non traitées et qu'elle apparaît sous la forme de deux bandes de mobilité électrophorétique retardée, aussi bien sur l'extrait brut que dans la co-immunoprécipitation avec Eg3 (Figure 20). Ce retard de mobilité électrophorétique correspond à un état phosphorylé de CDC25. La différence d'expression de la protéine CDC25B2 pourrait s'expliquer par une dégradation de la protéine. En effet, la production de CDC25B est régie par le système inductible TetOff et donc n'est pas soumise à une autre régulation à ce niveau-là. Par contre, il est fort probable que la

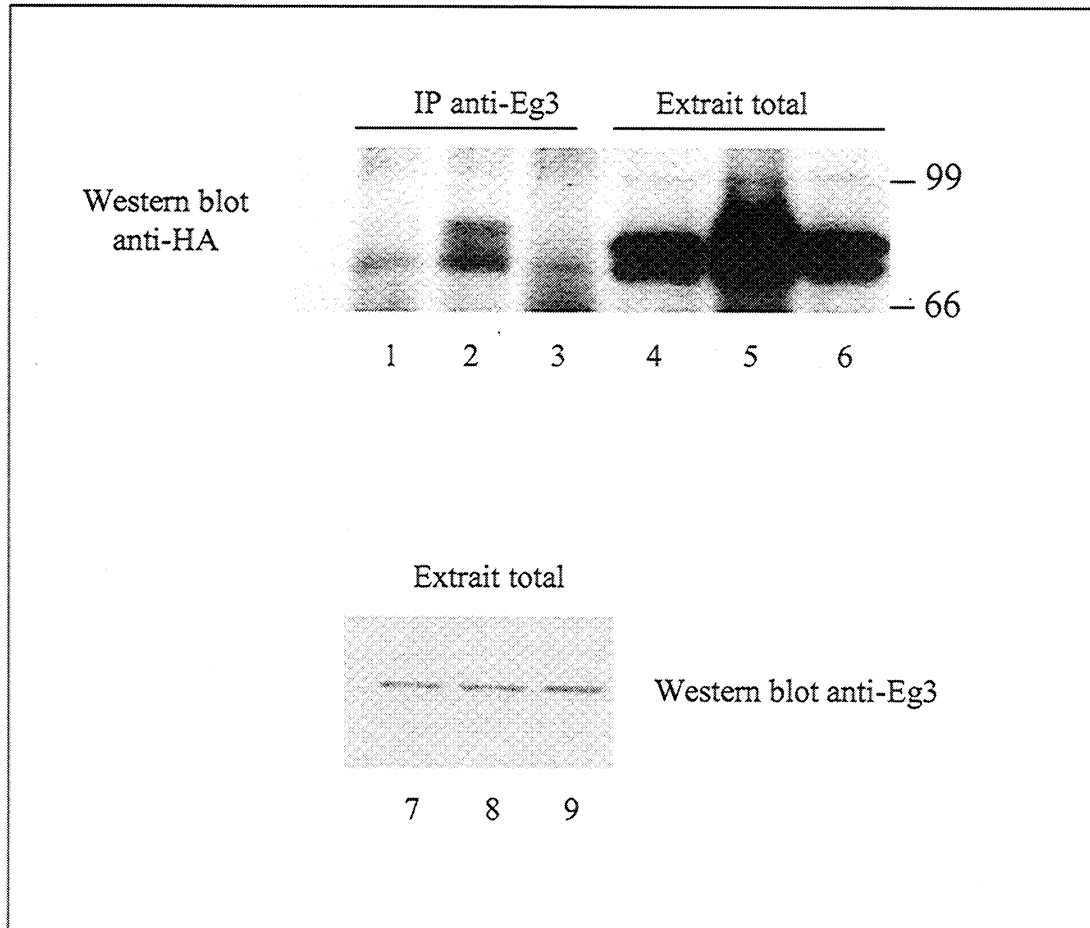


Figure 21: Interaction *in vivo* pour des cellules en phase S ou en phase G2.

Des extraits protéiques (5mg) du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.4 traité ou non par 1µg/ml d'aphidicholine pendant 24H (cellules en S) et relâchées ou non pendant 4H (cellules en G2) ont été immunoprécipitées par l'anticorps L2. Des extraits bruts (100 µg) ou les immunoprécipités anti-Eg3 ont été analysés par SDS-PAGE suivi de western blot anti-HA ou anti-Eg3 avec l'anticorps N4. (1-4-7) cellules traitées par aphidicholine, (3-6-9) cellules non traitées (2-5-8) cellules traitées par aphidicholine et relâchées 4H. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux afin de valider le traitement par l'aphidicholine.

dégradation de la phosphatase CDC25B soit plus importante en mitose où son rôle n'est plus requis.

L'interaction a également été étudiée dans des cellules bloquées en phase S (traitement à l'aphidicoline) ou synchronisées en G2 (traitement à l'aphidicoline et cellules relâchées 4H). Les mêmes expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées. Des variations de l'expression de CDC25B2 peuvent être observées (Figure 21) : dans les cellules en G2, l'expression de CDC25B2 est plus importante (Figure 21 ligne 5) et sa mobilité électrophorétique est différente par rapport aux cellules non traitées (Figure 21 ligne 6). Il est probable que cette augmentation de l'expression de CDC25B soit due à une stabilisation de la protéine au moment où son activité est requise (phase G2). Les changements de mobilité électrophorétique peuvent être la résultante de phosphorylations par différentes kinases comme CKII (Theis-Febvre et al, en préparation) ou CDK1/Cycline B comme cela a été montré dans des travaux antérieurs (Baldin et al., 1997a). Dans les cellules en phase S, l'expression de CDC25B (Figure 21 ligne 4) est identique à celle observée dans les cellules asynchrones (Figure 21 ligne 6). Ces différences d'expression sont retrouvées au niveau des co-immunoprécipitations anti-Eg3 et nous retrouvons encore l'association de CDC25B avec Eg3.

Quelle que soit la phase du cycle cellulaire et que CDC25B soit phosphorylée ou non, les deux protéines interagissent sans variations notables.

IV.1.3. Interaction *in vitro*.

L'interaction *in vitro* entre Eg3 et les trois phosphatases CDC25B a été testée en utilisant des protéines CDC25B traduites en lysat de réticulocytes en présence de méthionine ³⁵S (IVT) et de la protéine Eg3 recombinante étiquetée avec une étiquette poly histidine. La protéine Eg3 recombinante est immunoprécipitée avec l'anticorps anti-Eg3 L2 et incubée dans un tampon d'interaction avec 5,5 µl d'IVT (Figure 22A).

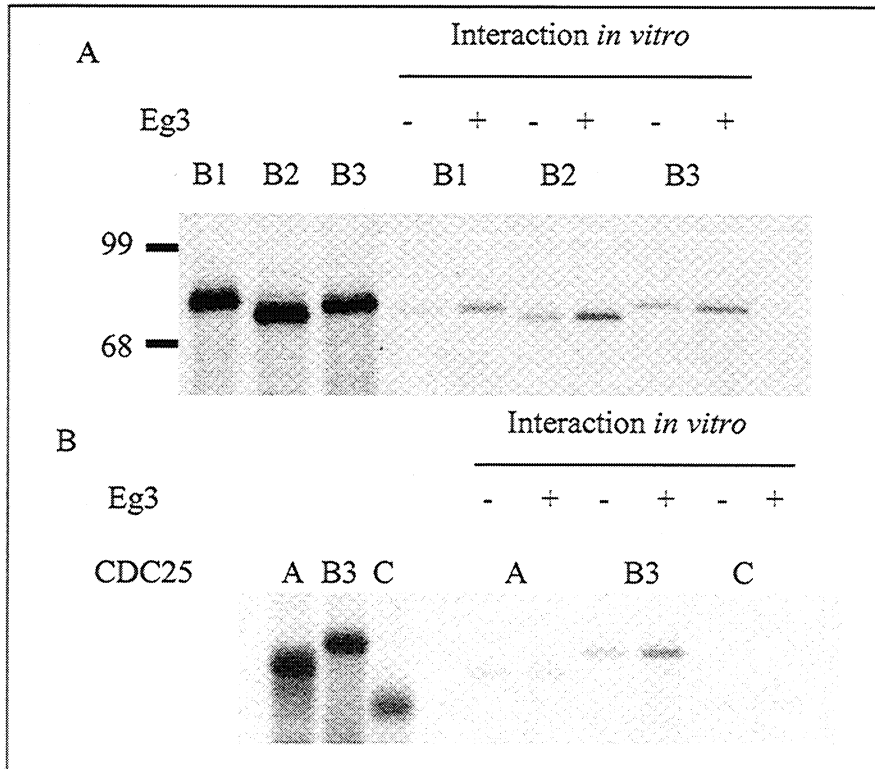


Figure 22: Interaction *in vitro* entre différentes formes de CDC25 et la protéine Eg3.

A) 750 ng de protéine recombinante purifiée HisEg3 (ou pas) ont été immunoprécipités par l'anticorps L2 (ou son sérum préimmun) puis incubés pendant 1 heure à 4°C avec 5,5 µl de CDC25B1, B2 ou B3 produites en lysat de réticulocytes en présence de Met ³⁵S. Les échantillons ainsi que 0,5 µl de chaque traduction *in vitro* ont été analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés. B) Même expérience qu'en A) mais avec les formes CDC25A, B3 et C.

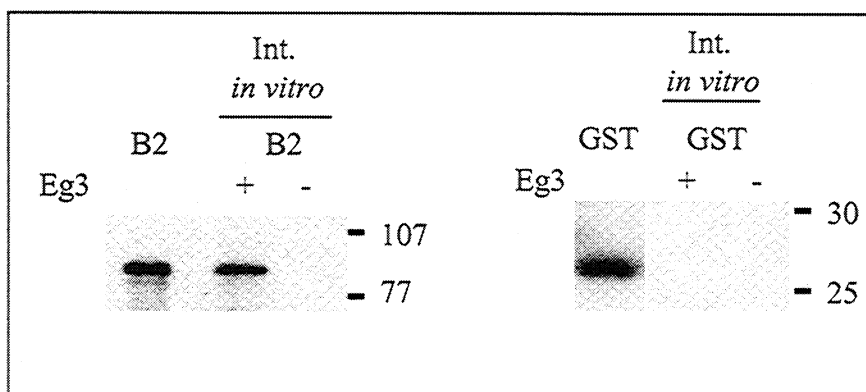


Figure 23: Interaction directe entre CDC25B et la kinase Eg3.

1,25 µg de protéine recombinante HisEg3 (ou pas) ont été immunoprécipités par l'anticorps L2 (ou son sérum préimmun) et incubés avec 5 µg de protéine recombinante GST ou GST-CDC25B2 pendant une heure à 4°C. Les échantillons ainsi qu'1 µg de protéines GST ou GST CDC25B2 ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot anti-GST. Int= interaction.

Dans les échantillons contrôles, la protéine Eg3 a été ommise et l'anticorps L2 remplacé par son sérum préimmun. Malgré une légère fixation non spécifique de CDC25B sur les billes de protéine A sépharose (Figure 22A (-)), l'association Eg3/CDC25 est retrouvée.

Par ailleurs, afin de définir si l'interaction de CDC25B était spécifique, nous avons réalisé l'expérience avec CDC25A et C produites *in vitro* dans un lysat de réticulocytes en présence de méthionine ³⁵S (Figure 22B). Aucune interaction entre CDC25A et CDC25C n'est mise en évidence.

Tout comme in vivo, les trois isoformes de CDC25B interagissent avec la kinase Eg3. L'interaction entre CDC25B et Eg3 est spécifique de la forme B.

Enfin, pour s'affranchir d'éventuels facteurs provenant du lysat de réticulocytes, l'interaction entre les protéines recombinantes GST-CDC25B1 et B2 produites chez *E. coli* et Eg3 purifiée a été réalisée. La protéine recombinante humaine Eg3 immunoprécipitée par l'anticorps anti-Eg3 L2 est incubée avec les protéines recombinantes GST, GST-CDC25B1 ou B2 dans un tampon d'interaction. L'interaction est révélée par western blot anti-GST. GST-CDC25B1 et B2 sont détectées dans l'immunoprécipitation anti-Eg3 alors que la GST ne l'est pas (seules GST-CDC25B2 et GST seule sont montrées sur la Figure 23, le résultat est identique avec GST-CDC25B1).

Ainsi, CDC25B interagit directement avec la protéine kinase Eg3.

IV.1.4. Détermination du site d'interaction sur CDC25B.

Afin de déterminer le site d'interaction, différentes formes tronquées dans la partie amino-terminale de CDC25B3 ont été utilisées (Figure 24A). La protéine recombinante humaine Eg3 immunoprécipitée par l'anticorps anti-Eg3 L2 a été incubée avec 5,5 µl des lysats de réticulocytes programmés avec les différents mutants de délétion amino-terminale (IVT). Le contrôle négatif étant réalisé sans protéine Eg3

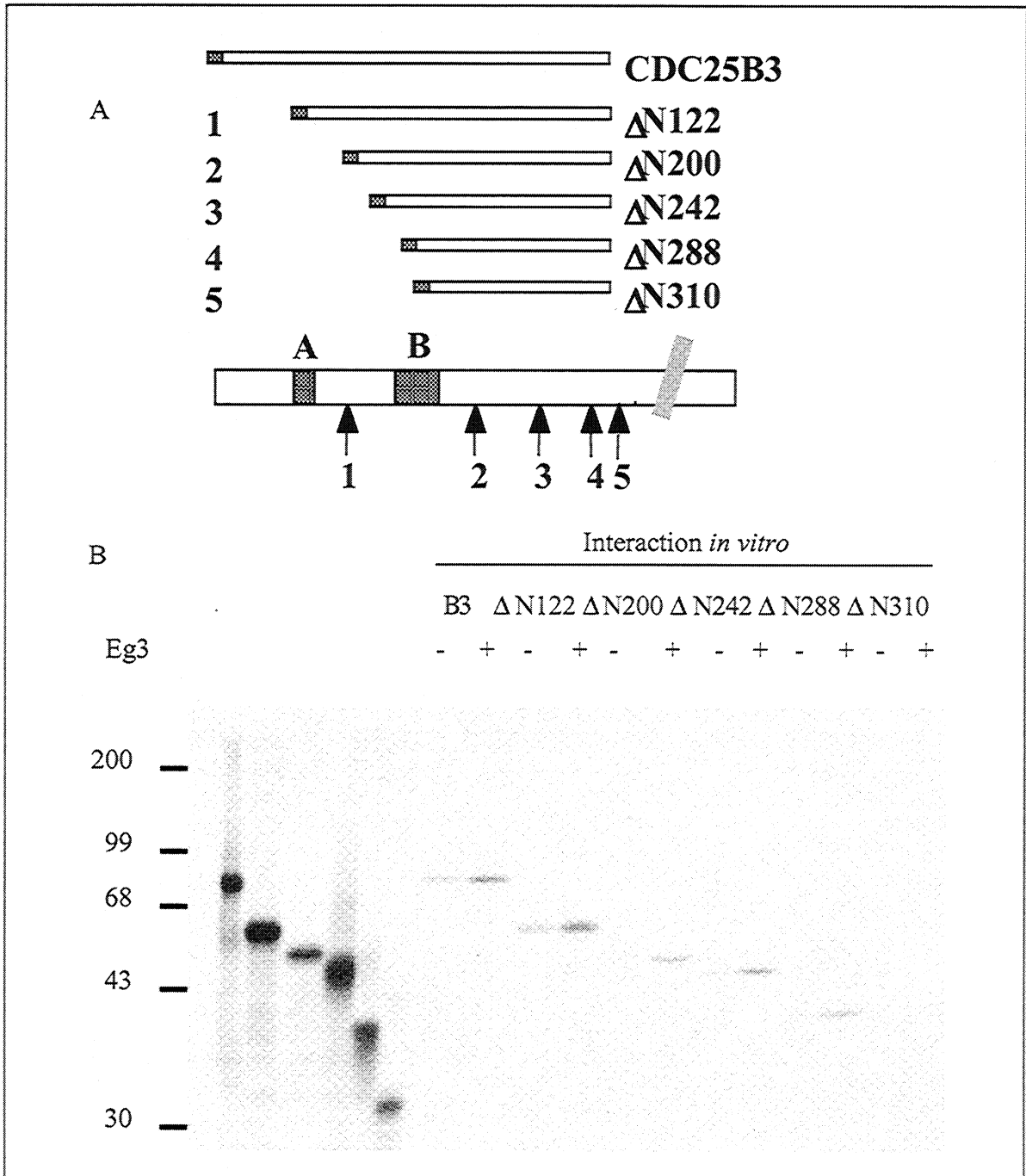


Figure 24: Détermination du site d'interaction sur CDC25B.

A) Schématisation des différents mutants de délétion amino-terminale de CDC25B3 utilisés pour cartographier le site d'interaction sur CDC25B3. B) 750 ng de protéine recombinante Eg3 (ou pas) ont été immunoprécipités par L2 (ou son sérum préimmun) et incubés 1 heure à 4°C avec 5,5 µl des différents mutants produits en lysat de réticulocytes en présence de Méthionine ³⁵S. Les échantillons ainsi que 0,5 µl des différentes IVT ont été analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés.

recombinante et avec le sérum pré-immun de l'anticorps L2. L'interaction entre CDC25B et Eg3 est conservée jusqu'au mutant $\Delta N288$ (délétion des 288 premiers acides aminés) et disparaît à partir du mutant $\Delta N310$ (les 310 premiers acides aminés de la protéine sont absents)(Figure 24B).

Le site d'interaction de Eg3 sur CDC25B3 se situe donc entre les acides aminés 288 et 310 .

IV.1.5. Phosphorylation de CDC25B par Eg3.

Comme je l'ai dit dans l'introduction, nous avons supposé une interaction entre CDC25B et la protéine kinase Eg3 car cette dernière phosphoryle CDC25B *in vitro*. Je présenterai maintenant les résultats de ces expériences préliminaires qui nous ont permis de nous intéresser à la spécificité de phosphorylation, à la recherche des sites de phosphorylation et à l'implication de la phosphorylation sur l'interaction.

- Eg3 phosphoryle spécifiquement CDC25B.

Les différentes formes de CDC25B (CDC25B1, B2 et B3) ont été produites *in vitro* dans des lysats de réticulocytes en présence de méthionine non marquée puis immunoprécipitées par un anticorps spécifique de CDC25B et incubées dans un tampon kinase en présence de protéine Eg3 recombinante tronquée et d'ATP γ ^{32}P . Afin de contrôler les quantités produites de CDC25B1, B2 et B3, les trois formes ont été produites en lysat de réticulocytes en présence de méthionine ^{35}S et immunoprécipitées par un anticorps dirigé contre un peptide C-terminal de CDC25B. Des niveaux identiques d'incorporation de ^{32}P ont été obtenus pour les trois formes indiquant qu'*in vitro*, les trois formes de CDC25B sont substrat de la kinase Eg3 (quantification par une analyse au phosphorimager) (Figure 25A). L'autophosphorylation de la kinase Eg3 tronquée est notée avec un astérisque.

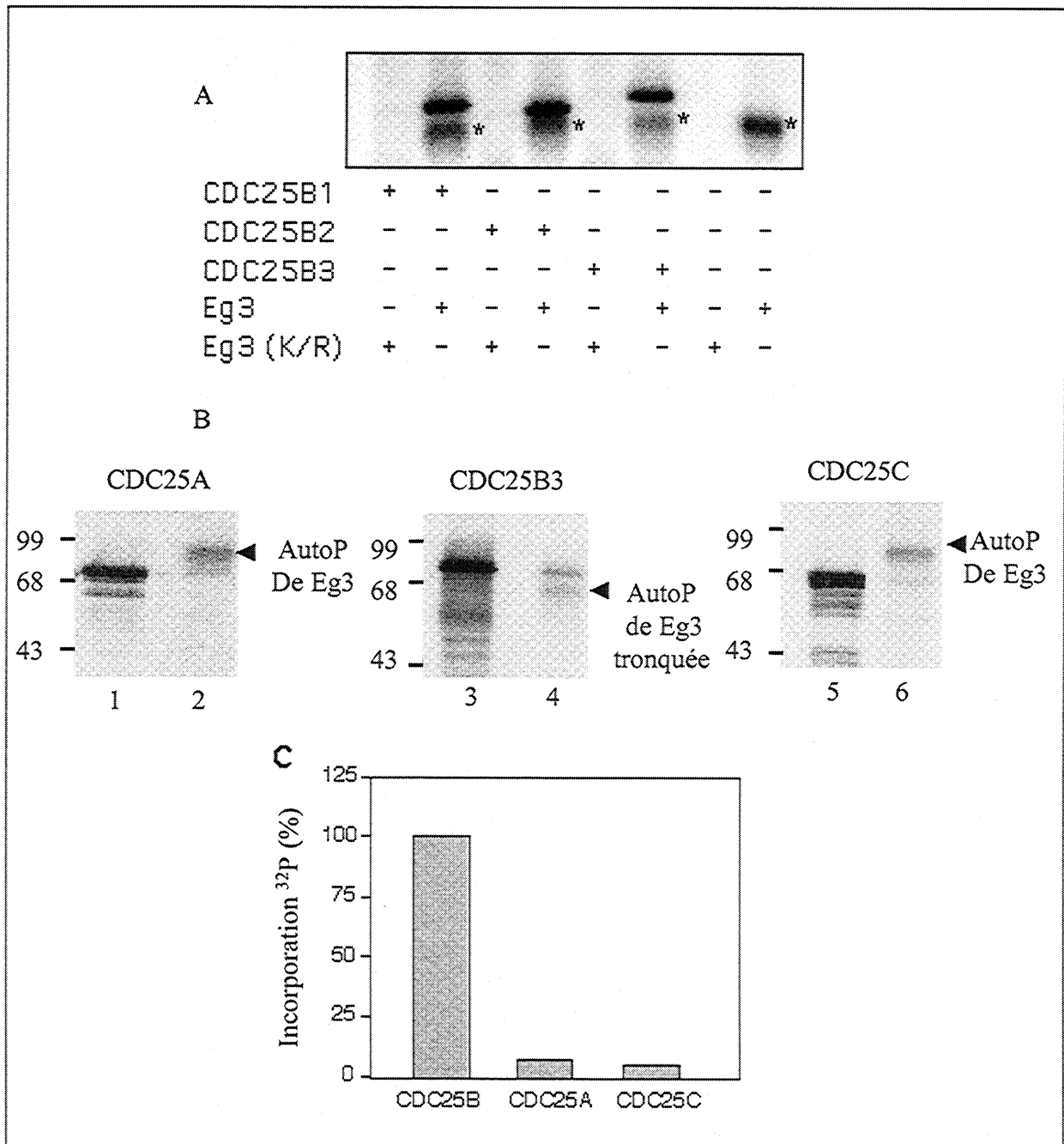


Figure 25: La kinase Eg3 phosphoryle spécifiquement CDC25B.

A) Les trois formes de CDC25 sont produites en lysat de réticulocytes en présence de méthionine non radiomarquée puis immunoprécipitées (20 μ l) et incubées dans un tampon kinase en présence d'ATP γ ³²P et de 250 ng de protéine recombinante Eg3 tronquée ou Eg3KR (kinase morte) tronquée pendant 30 min à 30°C. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés. B) même expérience qu'en A mais avec CDC25A, B3 et C. (1-3-5) immunoprécipités des formes CDC25 produites en lysat de réticulocytes en présence de méthionine ³⁵S (2-4-6) phosphorylation. C) Quantification de l'incorporation de ³²P ramenée à une quantité identique de protéines (par Phosphorimager et le logiciel Imagequant).

Afin de déterminer si seule CDC25B est un substrat de la protéine kinase Eg3, nous avons testé la capacité d'Eg3 à phosphoryler CDC25A et C. Les différentes formes de CDC25 (CDC25A, B3 et C) ont été produites *in vitro* dans des lysats de réticulocytes en présence de méthionine non marquée puis immunoprécipitées par des anticorps spécifiques des trois formes et incubées en présence d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ et de protéine Eg3 recombinante tronquée pour CDC25B3 et pleine taille pour CDC25A et C. Les quantités de CDC25A, B3 et C immunoprécipitées ont été déterminées comme précédemment. Comme le montre la figure 25B, la phosphorylation de CDC25B est très nettement supérieure à celle obtenue pour CDC25A et C, pour lesquelles l'autophosphorylation de Eg3 prédomine. Après quantification réalisée par phosphorimager, il apparaît que l'incorporation de ^{32}P est environ 15 fois supérieure pour CDC25B3 que pour CDC25A et C (Figure 25C).

L'ensemble des résultats obtenus nous permettent de conclure que Eg3 phosphoryle spécifiquement CDC25B.

Nous nous sommes alors intéressés au site de phosphorylation de la kinase Eg3. Etant donné l'homologie entre la kinase C-TAK1 et Eg3, le premier site que nous avons testé est la S323 homologue de la sérine 216 de CDC25C et phosphorylée par la kinase C-TAK1. La sérine 323 a été remplacée par un acide aminé non phosphorylable, la glycine. Ce mutant produit *in vitro* dans des lysats de réticulocytes en présence de méthionine non marquée puis immunoprécipité par un anticorps spécifique de CDC25B a été incubé en présence de protéine Eg3 recombinante tronquée et d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$. Les quantités produites et immunoprécipitées de chacune des protéines ont été testées sur les protéines radiomarquées. Ce mutant présente une diminution de 50% de l'incorporation d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ par rapport à CDC25B3 sauvage

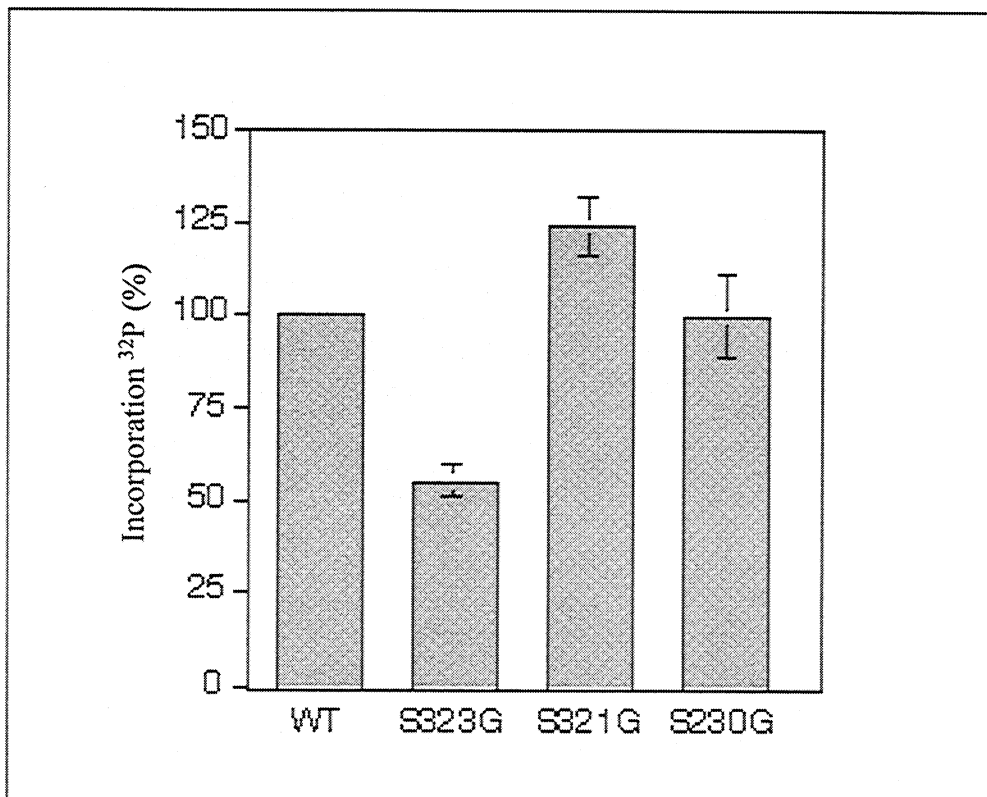


Figure 26: Identification d'un site de phosphorylation.

Les différentes formes de CDC25B ont été produites en lysat de réticulocytes en présence de méthionine non radiomarquée puis immunoprécipitées (20 µl) et incubées dans un tampon kinase en présence d'ATP γ ³²P et de 250 ng de protéine recombinante Eg3 tronquée pendant 30 min à 30°C. Les échantillons immunoprécipités ont été analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés. La quantification de l'incorporation de ³²P a été analysée par Phosphorimager et ramenée à une quantité constante de protéines.

WT: forme sauvage de CDC25B3

S323G: mutant ponctuel de la sérine 323 de CDC25B3 remplacé par une glycine

S321G: mutant ponctuel de la sérine 321 de CDC25B3 remplacé par une glycine

S230G: mutant ponctuel de la sérine 230 de CDC25B3 remplacé par une glycine

(Figure 26). La sérine 323 est donc un des sites de phosphorylation par la kinase Eg3. Etant donné que cette sérine est impliquée dans le site d'interaction avec les protéines 14-3-3, nous avons voulu tester d'autres sérines localisées dans d'autres sites potentiels d'interaction avec les protéines 14-3-3 : la sérine 230 et la sérine 321. Les mutants non phosphorylables de ces sérines ont été testés de la même façon que précédemment. Ces deux mutants présentent une incorporation de ^{32}P semblable à celle obtenue pour la forme sauvage de CDC25B3 (Figure 26). Par conséquent ces deux sérines ne sont pas des cibles de Eg3 *in vitro*. L'identification du ou des autres résidus phosphorylés par Eg3 *in vitro* devra donc être réalisée par une cartographie des phosphopeptides de CDC25B.

La sérine 323 de la phosphatase CDC25B3 est phosphorylée in vitro par la kinase Eg3.

A) La phosphorylation de CDC25B par Eg3 a-t-elle une répercussion sur l'interaction ?

Afin de répondre à cette question, nous avons testé l'interaction entre CDC25B3 et la protéine recombinante kinase morte. La protéine kinase Eg3 active et la kinase morte (K/R) ont été immunoprécipitées et mises en présence de CDC25B3 traduit en lysat de réticulocyte en présence de méthionine ^{35}S . Le contrôle était effectué avec la protéine Eg3 sauvage. Aucune variation d'interaction de CDC25B n'est observée que l'on ait utilisé la kinase morte ou sauvage (Figure 27A).

Le mutant non phosphorylable de la sérine 323 a également été testé pour l'interaction avec la kinase Eg3 sauvage selon le même protocole. Il apparaît que l'interaction avec Eg3 est strictement identique que pour la forme sauvage (Figure 27B).

La phosphorylation de CDC25B par Eg3 n'intervient donc pas sur l'interaction entre les deux protéines in vitro.

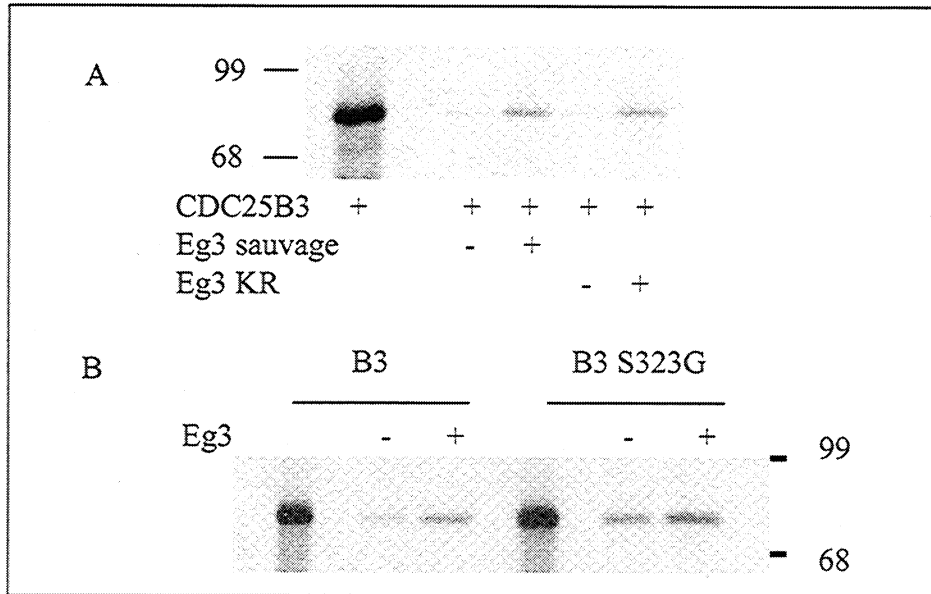


Figure 27: La phosphorylation de CDC25B par Eg3 n'intervient pas sur leur association *in vitro*.

A) 750 ng de protéine recombinante purifiée Eg3 ou Eg3KR (kinase morte) ont été immunoprécipités par l'anticorps L2 puis incubés pendant 1 heure à 4°C avec 5,5 µl de CDC25B3 produite en lysat de réticulocytes en présence de Met ³⁵S. Les échantillons ainsi que 0,5 µl de la traduction *in vitro*, ont été analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés. B) même expérience qu'en A) mais avec la forme CDC25B3 mutée sur la sérine 323 (remplacée par une glycine) et la forme sauvage de la protéine recombinante Eg3.

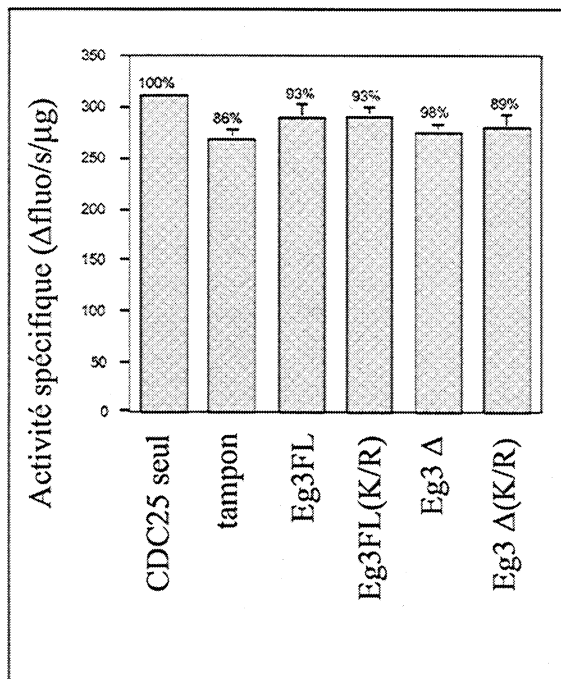


Figure 28: Effet de la kinase Eg3 sur l'activité phosphatase de CDC25B.

CDC25B3 produite en lysat de réticulocytes en présence de méthionine ³⁵S a été immunoprécipitée et incubée dans un tampon kinase en présence ou pas des différentes formes de kinase Eg3 puis les 4/5 ème de l'immunoprécipité ont été incubés dans un tampon phosphatase en présence de FDP (20 µM). L'émission de fluorescence du mélange réactionnel est mesurée à 530 nm après excitation à 485 nm. L'activité phosphatase a été normalisée en fonction des quantités de protéines radiomarquées immunoprécipitées (1/5) et analysées par autoradiographie.

Eg3FL: Eg3 pleine taille. Eg3FL(K/R): Eg3 pleine taille kinase morte. Eg3 Δ: Eg3 tronquée.

Eg3 Δ(K/R): Eg3 tronquée kinase morte.

B) Eg3 ne module pas l'activité phosphatase de CDC25 *in vitro*.

Eg3 et CDC25B interagissent *in vitro* et *in vivo*, de plus Eg3 phosphoryle CDC25, aussi nous avons voulu savoir si ces deux modifications modulent l'activité phosphatase de CDC25B. L'activité phosphatase a été mesurée *in vitro* en utilisant un substrat exogène : la fluorescéine di-phosphate (FDP). CDC25B3 produite en lysat de réticulocyte a été immunoprécipitée, incubée avec la kinase Eg3 sauvage ou catalytiquement morte dans les mêmes conditions que lors des tests de phosphorylation durant 30 minutes à 30°C, puis la mesure d'activité a été déterminée sur le substrat exogène FDP par spectrofluorimétrie. L'émission de fluorescence est le reflet de l'hydrolyse de la FDP en fluorescéine monophosphate ou fluorescéine. Les valeurs présentées sur l'histogramme de la figure 28 ont été ramenées à une quantité constante de CDC25B. Ainsi, que CDC25B soit phosphorylée (Eg3 FL ou Eg3 Δ) ou non (Eg3 FL (K/R) ou Eg3 Δ (K/R)) par la protéine kinase Eg3, aucune variation notable de son activité n'est détectée. De plus, la seule association (Eg3 FL (K/R) ou Eg3 Δ (K/R)) n'influe pas l'activité de CDC25B.

Ni la phosphorylation ni l'interaction avec Eg3 ne module l'activité phosphatase intrinsèque de CDC25B.

IV.1.6. CDC25B/Eg 3 : quel lien *in vivo* ?

Afin de comprendre le lien qui pouvait exister entre CDC25B/Eg3 et la prolifération cellulaire, des études du cycle cellulaire ont été entreprises. Des cellules U2OS-tTA ont été transfectées de manière transitoire par des vecteurs permettant l'expression de la kinase Eg3 ou Eg3 morte étiquetée avec une étiquette GFP. 24H après la transfection les cellules sont fixées puis marquées à l'iodure de propidium afin de réaliser une analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du

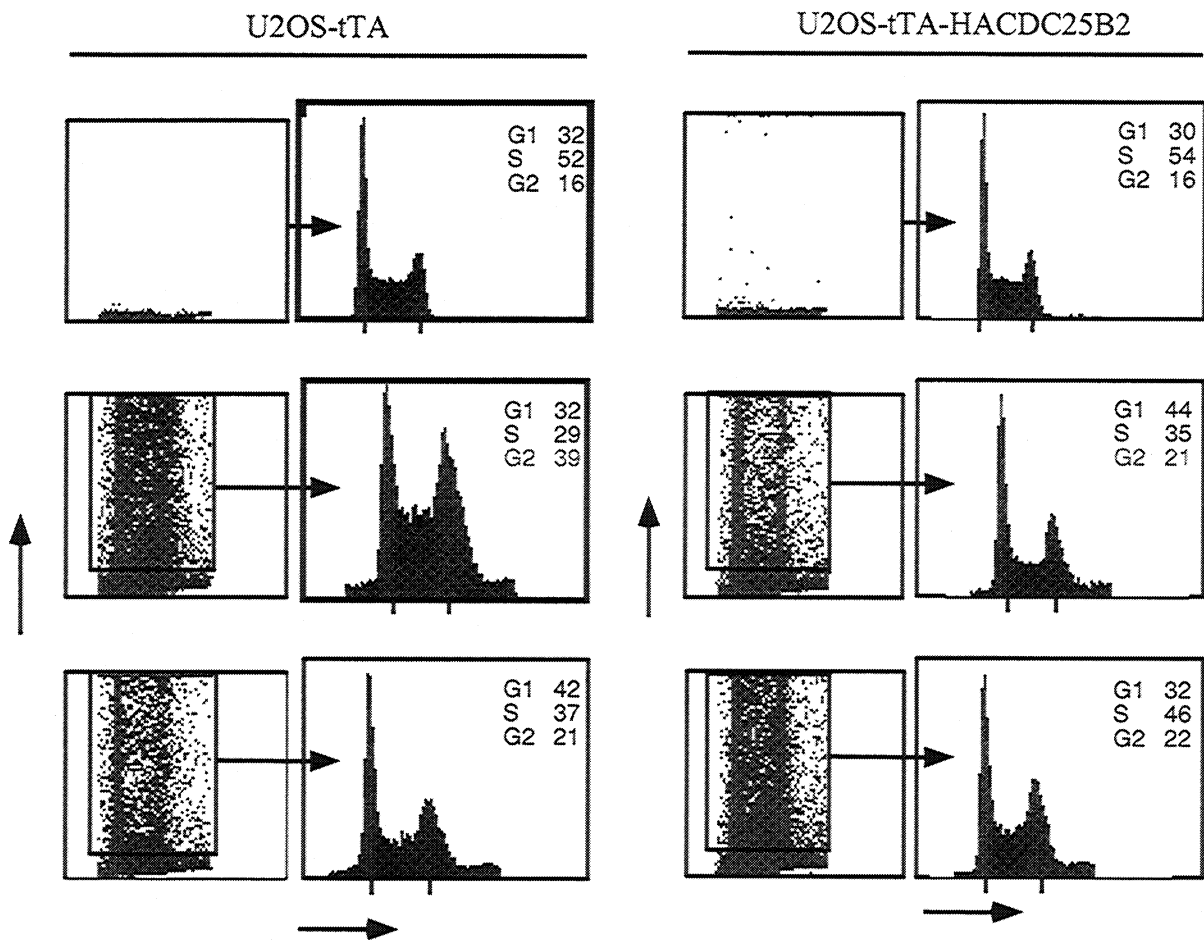


Figure 29: CDC25B reverse l'effet inhibiteur de Eg3 sur le cycle cellulaire.

Les cellules U2OS-tTA ou U2OS-tTA-HACDC25B2 (induites) en phase exponentielle de croissance ont été transfectées par 15 µg de vecteurs pEGFP Eg3 ou pEGFP Eg3KR. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle a été analysée par cytométrie de flux sur les cellules GFP positives 24 heures après la transfection.

cycle par cytométrie de flux. La surexpression de la kinase Eg3 induit une augmentation du nombre de cellules en G2/M tandis que la surexpression de la kinase morte n'induit pas de changement dans le profil de cycle cellulaire (Figure 29 gauche). Une analyse des cellules Eg3 positives fixées sur des lamelles nous a permis de montrer qu'il s'agissait plus probablement d'une accumulation des cellules en G2 et non en mitose. En effet, le nombre de cellules en mitose est identique que les cellules surexpriment la kinase Eg3 ou pas.

La protéine kinase Eg3 est donc un régulateur négatif de la transition G2/M.

Dans un deuxième temps, des cellules U2OS-tTA-HACDC25B2 ont été transfectées de manière transitoire par des vecteurs permettant l'expression de la kinase Eg3 ou Eg3 morte étiquetée avec la GFP et induites pour l'expression de CDC25B2. 24H après la transfection et l'induction, les cellules ont été analysées comme précédemment. Les profils cellulaires obtenus sont identiques au contrôle que l'on surexprime Eg3 sauvage ou mutant (Figure 29 droite). Il semblerait qu'il y ait donc une réversion de l'accumulation de cellules en G2 causée par la surexpression de la kinase Eg3 lorsque l'on surexprime CDC25B.

CDC25B et Eg3 ont donc des fonctions antagonistes pour la transition G2/M.

Une des questions que nous nous sommes posées fut de savoir si des conditions de stress cellulaire provoquant un arrêt des cellules en phase G2 s'accompagnaient d'une augmentation de l'expression de la kinase Eg3. Aussi, nous avons soumis les cellules U2OS-tTA à un agent génotoxique, l'étoposide, et analysé l'expression de Eg3 par western blot. Comme le montre la figure 30A, la quantité de protéine Eg3 ne varie pas suite à un traitement des cellules par l'étoposide.

Cependant, comme des stress différents peuvent impliquer différentes voies de régulation, le profil d'expression de la kinase Eg3 en réponse à des irradiations UVc

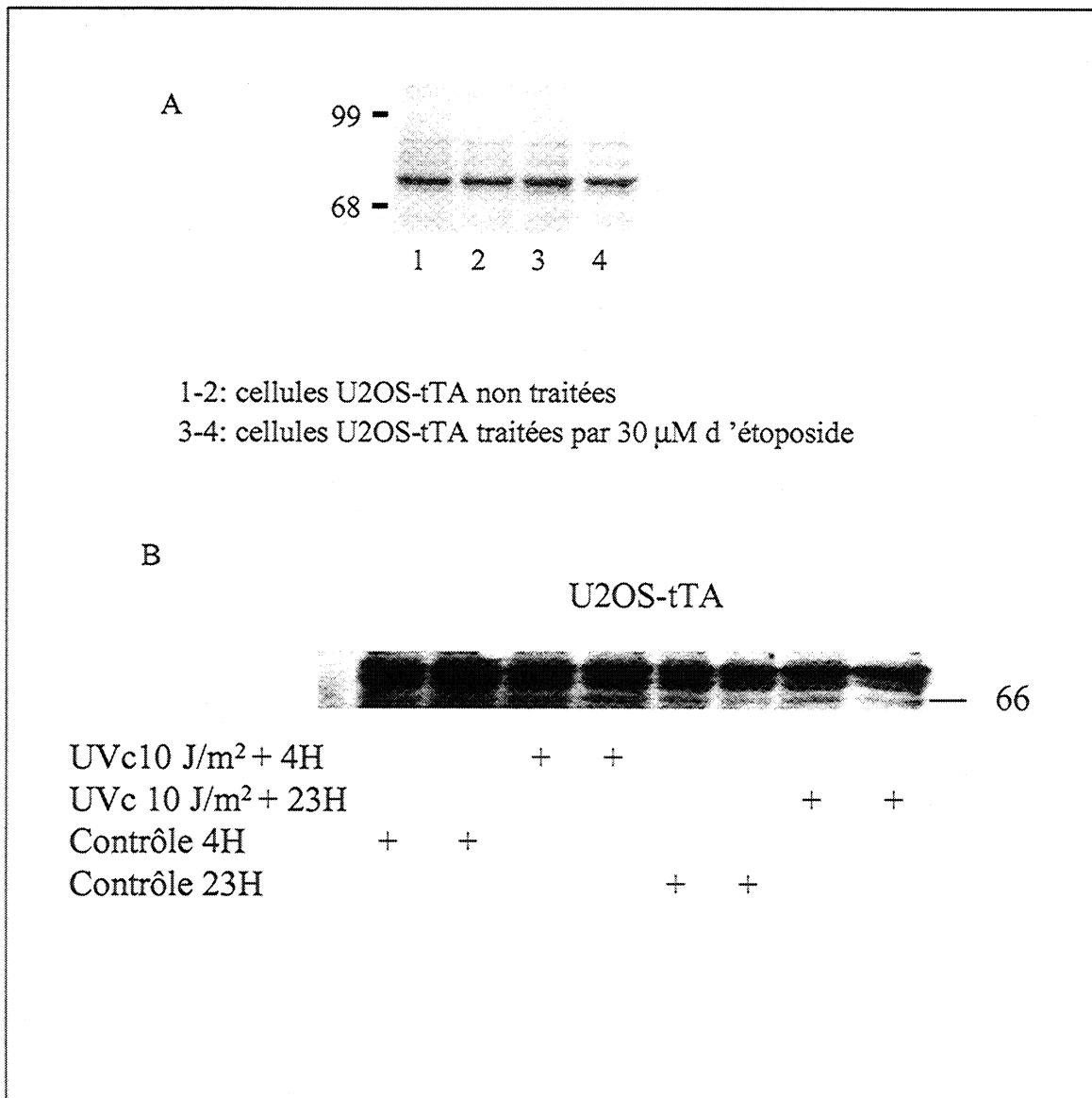


Figure 30: Etude de l'expression de la kinase Eg3 en réponse à des agressions cellulaires.

A) 100 μ g d'extrait protéique de cellules U2OS-tTA traitées ou non par 30 μ M d'étoposide ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot anti-Eg3 (anticorps N4). B) 100 μ g d'extrait protéique de cellules U2OS-tTA irradiées ou non par des UVc (10 J/m²) et recueillies 4H (réponse précoce) ou 23H (réponse tardive) ont été analysés par SDS-PAGE suivi de western blot anti-Eg3 (anticorps N4).

(10J/m²) a été analysé. Les cellules U2OS-tTA ont été recueillies soit 4H après irradiation (réponse précoce) soit 23H après irradiation (réponse tardive). La quantité de la kinase Eg3 détectée par western blot reste identique que les cellules soient irradiées ou non.

De plus, aucune variation de la mobilité de la protéine n'a été observée (ni pour les traitements étoposide ni pour les irradiations UVs) suggérant que la kinase Eg3 n'est pas activée par phosphorylation (Blot et al., 2001).

La quantité de protéine kinase Eg3 ne varie pas lors d'un blocage en phase G2 induit soit par l'étoposide soit par les irradiations UVcs.

IV.1.7. Conclusions et perspectives.

Nous avons donc montré que la kinase humaine Eg3 interagit *in vitro* et *in vivo* avec la phosphatase CDC25B et que le domaine situé entre les acides aminés 288 et 310 de CDC25B3 semble être le domaine d'interaction pour Eg3. De plus, Eg3 phosphoryle CDC25B3 sur le résidu sérine 323, impliqué rappelons-le dans l'interaction avec 14-3-3, tout en ne changeant pas son activité phosphatase *in vitro*. Enfin, nous avons mis en évidence que Eg3 agit comme un régulateur négatif de la transition G2/M, effet contrebalancé par CDC25B.

En ce qui concerne le rôle de cette interaction au sein du cycle cellulaire, plusieurs modèles peuvent être envisagés.

Le premier est que Eg3 régulerait négativement CDC25B. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

1) *In vivo*, la phosphorylation de CDC25B par Eg3 pourrait inhiber son activité phosphatase vis à vis d'un substrat spécifique et physiologique. En effet, les mesures d'activité que nous avons réalisées ont été effectuées avec un substrat exogène la FDP. Nous ne pouvons exclure que l'affinité ou l'interaction de CDC25B avec un complexe CDK/Cycline soit affectée par la phosphorylation ou l'association avec Eg3.

2) La phosphorylation de CDC25B par Eg3 pourrait également modifier l'association de CDC25B avec les protéines 14-3-3 et ainsi affecter son activité phosphatase. Nous avons testé *in vitro* l'interaction de CDC25B avec l'isoforme η de 14-3-3 en présence de protéine Eg3 recombinante. Aucune variation n'a été détectée. Cependant, nous ne pouvons là encore exclure qu'*in vivo* une autre isoforme de 14-3-3 soit impliquée. Notons que lors de la surexpression de Eg3 dans les cellules U2OS-tTA-HACDC25B2 induites pour l'expression de CDC25B2, aucune variation de la localisation de la phosphatase n'a été observée. Il serait nécessaire de déterminer dans ces expériences, d'une part l'activité de CDC25B2 et d'autre part son association aux protéines 14-3-3.

Le second modèle est une régulation temporelle de la fonction de la kinase Eg3 par CDC25B. Dans des cellules somatiques de Xénope, la kinase Eg3 est phosphorylée au cours de la phase G2 et maximale en mitose. Cette phosphorylation s'accompagne d'un changement de mobilité électrophorétique qui est minimale lorsque les cellules sont bloquées en mitose. Rappelons que la kinase Eg3 humaine se comporte de la même façon lorsque des cellules sont traitées par du nocodazole (les bloquant en mitose). Ajoutons à cela que pendant l'embryogénèse précoce du xénope, la phosphorylation de la kinase Eg3 est dépendante du cycle cellulaire et que l'activité de Eg3 est maximale pendant la mitose. Nos travaux ont montré que la phosphorylation de CDC25B par la kinase Eg3 humaine n'aboutit à aucun changement d'activité de la phosphatase CDC25B ce qui laisse supposer que la kinase Eg3 n'est pas un régulateur de CDC25B. De plus, la surexpression de la kinase Eg3 entraîne une accumulation des cellules en phase G2 tandis que la surexpression de CDC25B restitue un cycle normal. Nous pouvons alors nous demander si CDC25B ne serait pas un régulateur de la kinase Eg3. En effet, en déphosphorylant Eg3, CDC25B maintiendrait la kinase inactive. Afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, les questions suivantes doivent être posées :

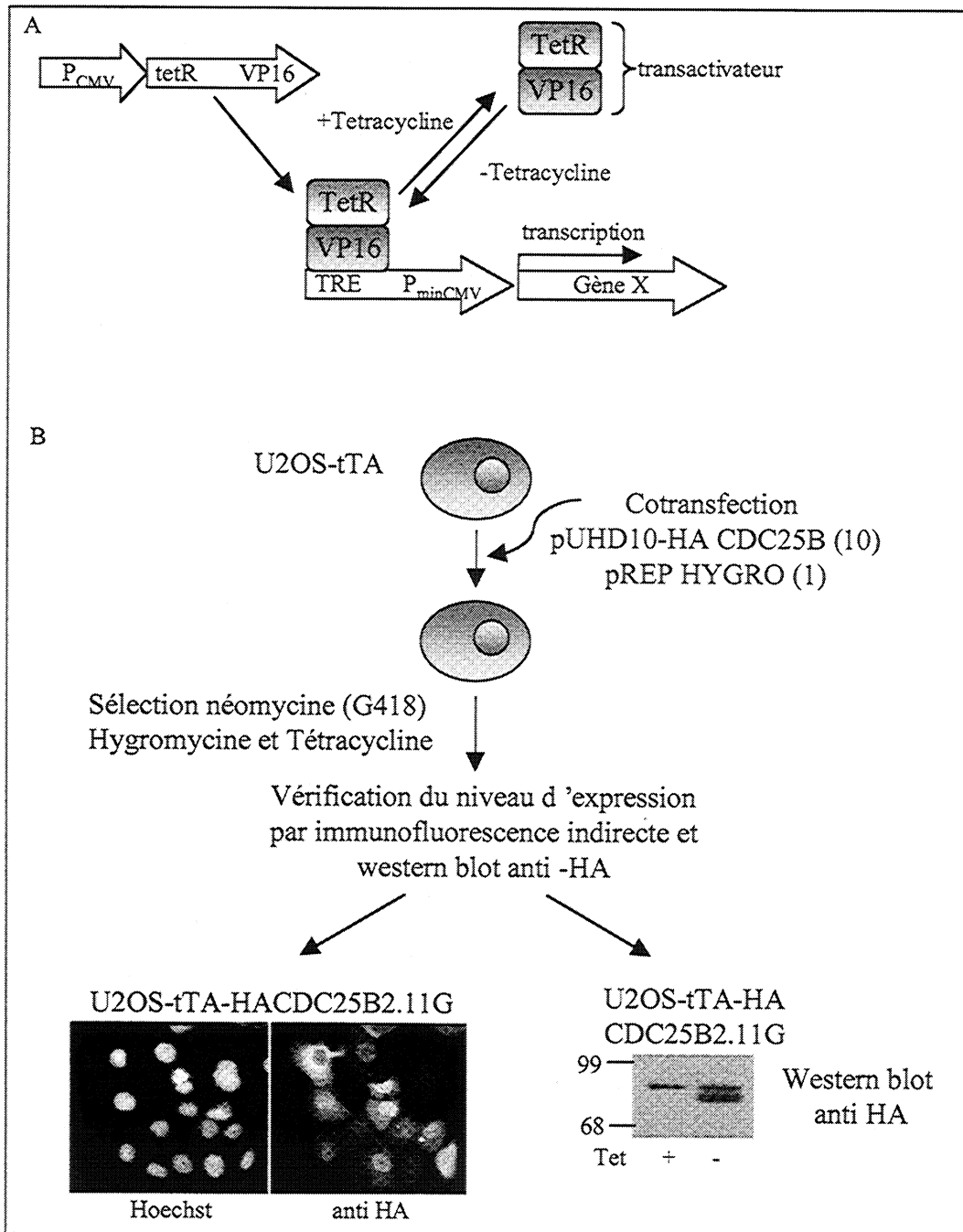


Figure 31: Etablissement de clones exprimant CDC25B de façon conditionnelle.

A) Principe du système Tet Off: en présence de tétracycline le transactivateur est piégé par l'antibiotique, en absence il se fixe sur le promoteur et permet la transcription du gène d'intérêt. B) Stratégie de clonage des souches U2OS-tTA-HACDC25B. Vérification du niveau d'expression du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.11G par immunofluorescence indirecte ou par western blot (100 µg d'extrait protéique) avec un anticorps anti-HA

1) CDC25B est-elle capable de déphosphoryler Eg3, 2) si oui cette déphosphorylation inhibe-t-elle l'activité de Eg3, 3) la simple association de CDC25B avec Eg3 suffit-elle à inhiber Eg3? De plus, il serait nécessaire de définir si lors de la réversion par CDC25B du blocage en G2 (induit par Eg3), nous avons effectivement un arrêt en G2 levé par l'expression de CDC25B2 ou une inhibition de l'arrêt par expression de CDC25B.

D'autres questions subsistent, l'effet de la surexpression de la kinase Eg3 sur le cycle cellulaire est-il direct ou bien cette kinase agit-elle sur d'autres effecteurs en aval. Dans ce cas, l'interaction avec CDC25B pourrait changer les cibles d'Eg3 ce qui pourrait également expliquer la réversion de l'effet de la surexpression de la kinase Eg3.

IV.2. Recherche de nouveaux partenaires *in vivo*.

Le principe de cette recherche est basé sur l'expression des phosphatases CDC25B étiquetées avec un épitope HA pour faciliter leur purification, l'immunoprécipitation des complexes formés *in vivo* et l'analyse des protéines associées par électrophorèse bi-dimensionnelle suivie de leur identification par spectrométrie de masse. Le choix s'est porté sur l'isoforme CDC25B2 du fait de son implication dans certains cancers.

IV.2.1. Etablissement et caractérisation du clone U2OS-tTA-HACDC25B211G.

Le système inductible choisi a été le système TetOff (Figure 31A). Des cellules d'ostéosarcome U2OS ayant intégré le vecteur pUHD15Neo codant pour le répresseur à la tétracycline ont été utilisées. Cette lignée a été co-transfectée par le vecteur pUHD10-HACDC25B et pREP Hygro selon un rapport 10/1. La sélection a été réalisée en présence de Néomycine (G418), d'hygromycine et de tétracycline dans le milieu. La vérification des niveaux d'expression a été réalisée en analysant les clones

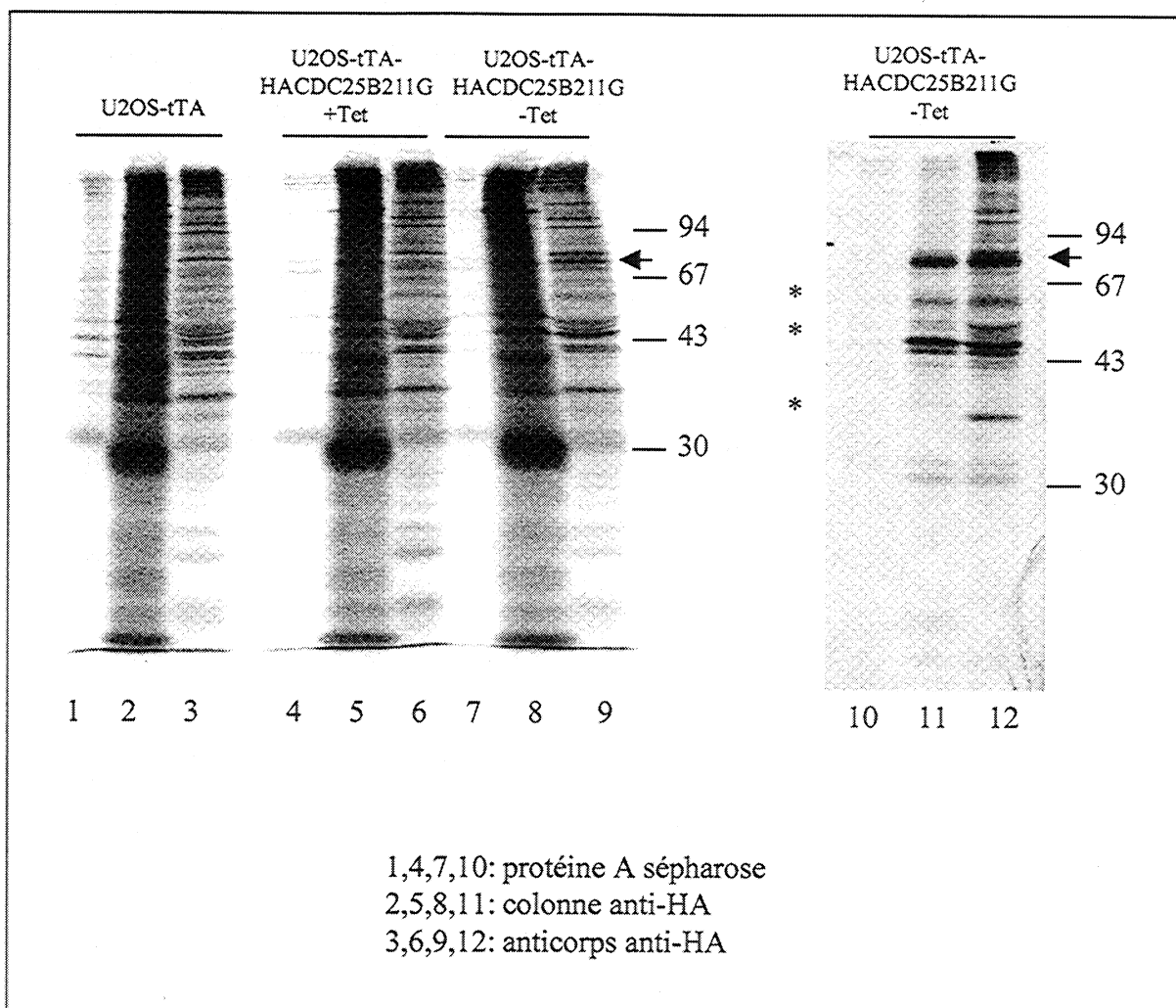


Figure 32: Existence de protéines « co »immunoprécipitant avec la phosphatase CDC25B2 dans des cellules U2OS-tTA-HACDC25B211G. Des extraits de cellules U2OS-tTA et U2OS-tTA-HACDC25B211G cultivées avec (+Tet) ou sans (-Tet) tétracycline et incubées deux heures avec un mélange de Méthionine et de Cystéine ^{35}S ont été immunoprécipitées par de la protéine A sépharose seule (1,4,7,10), une colonne composée d'anticorps anti-HA covalamment fixés à des billes d'agarose (2,5,8,11) ou d'anticorps anti-HA avec protéine A sépharose (3,6,9,12). Les immunoprécipités ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une autoradiographie.

→ : HA-CDC25B2

*: protéines co-immunoprécipitées

par immunofluorescence indirecte avec un anticorps anti-HA. Afin d'enrichir la population de cellules surexprimant CDC25B, des sous-clonages ont été effectués selon la même sélection. Le clone U2OS-tTA-HACDC25B211G a ainsi été sélectionné et une expression de la forme ectopique de CDC25B2 a été révélée dans 50% des cellules (Figure 31B). Une expression ectopique dans toutes les cellules n'a jamais été atteinte.

IV.2.2. Validation de notre approche.

Afin de montrer l'existence de partenaires co-purifiant avec la phosphatase CDC25B les premières expériences ont été réalisées à partir de cultures de cellules asynchrones radiomarquées par un mélange de Meth/Cys ³⁵S. L'expression de CDC25B2 est induite pendant 24H. Les extraits réalisés sont immunoprécipités soit grâce à un anticorps anti-HA, soit grâce à une colonne d'affinité anti-HA sur laquelle, sont covalamment fixés des anticorps anti-HA puis analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés (Figure 32). Sur cette autoradiographie, une bande de masse moléculaire correspondant à la phosphatase CDC25B2 étiquetée HA apparaît très faiblement entre les marqueurs de taille 67 et 94 kDa. Une mauvaise induction est à l'origine de cette faible intensité. L'expérience a été répétée dans les trois conditions énoncées précédemment. Dans le clone U2OS-tTA-HACDC25B211G induit, deux autres bandes apparaissent au-dessus du marqueur de taille de 43 kDa ainsi qu'une autre entre les marqueurs de taille de 30 et 43 kDa. Ces différents signaux n'apparaissent ni avec les cellules U2OS-tTA-HACDC25B211G non induites ni avec les cellules U2OS-tTA traitées dans les mêmes conditions (Figure 32).

Trois bandes d'environ 36, 45 et 57 kDa sont « co »immunoprécipitées avec la phosphatase CDC25B2.

Par ailleurs, nous avons testé, dans ces conditions, l'interaction de CDC25B avec des protéines connues. Les protéines de la famille 14-3-3 ont été les premières.

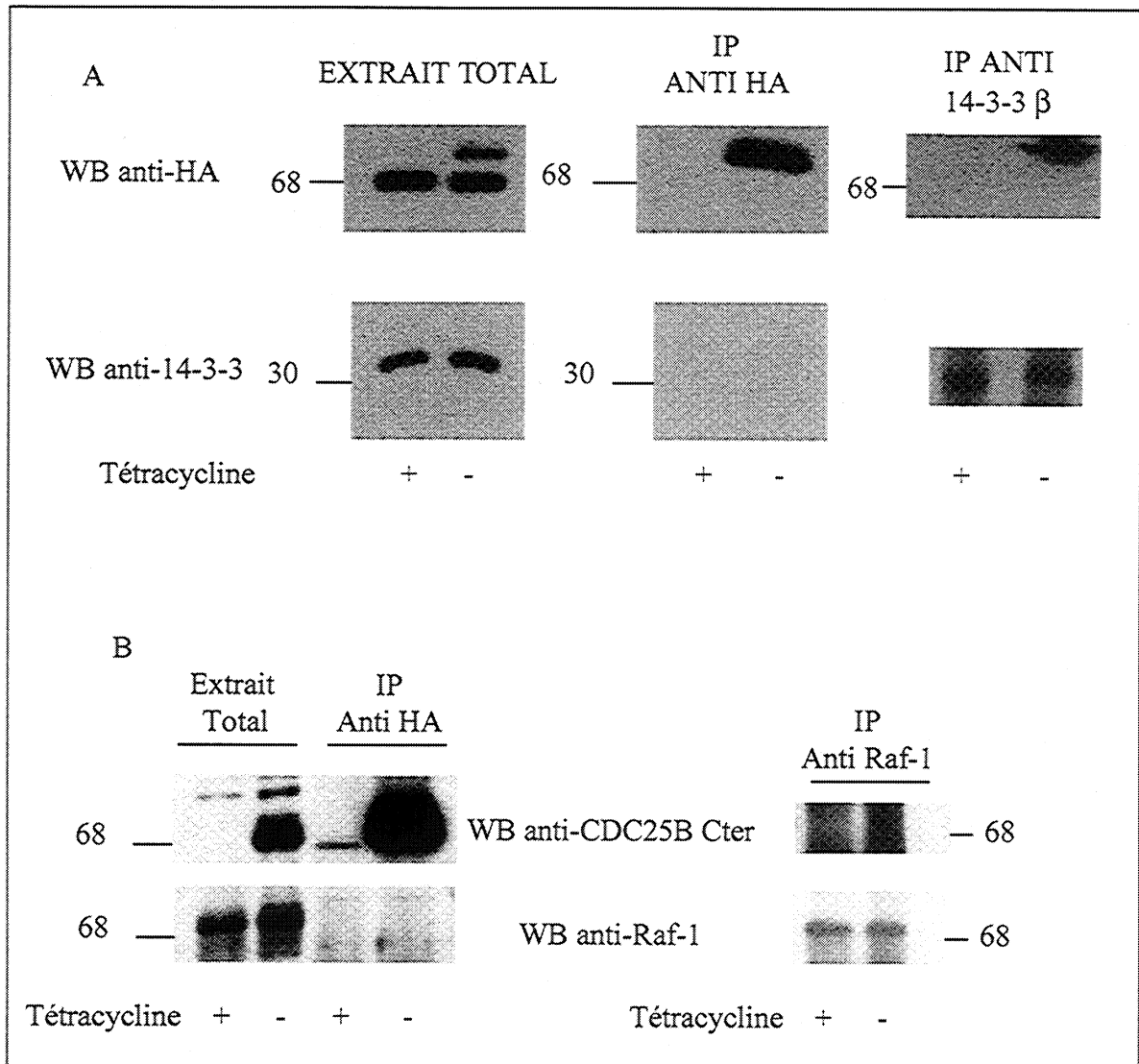


Figure 33 : Co-immunoprécipitation de CDC25B2 avec la protéine 14-3-3 β mais pas avec Raf-1.

A) 3 mg d'extrait protéique du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.11G cultivé en présence (+) ou non (-) de tétracycline ont été immunoprécipités par un anticorps anti-HA ou un anticorps anti-14-3-3 β et analysés par SDS-PAGE suivi de western blot anti-HA ou anti-14-3-3. 100 μ g d'extrait cellulaire brut ont également été analysés. B) 3 mg d'extrait protéique du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.11G en présence (+) ou non (-) de tétracycline ont été immunoprécipités par un anticorps anti-HA ou un anticorps anti-Raf-1 et analysés par SDS-PAGE suivi de western blot anti-CDC25B (anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminale) ou anti-Raf-1. 100 μ g d'extrait cellulaire brut ont été analysés par western blot anti-HA ou anti-Raf-1.

Des lysats de cellules U2OS-tTA-HACDC25B211G induites ou non ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-HA (colonnes d'anticorps covalamment fixés), séparés par SDS-PAGE et analysés par western blot avec un anticorps reconnaissant toutes les formes de 14-3-3 (Figure 33A). Les protéines 14-3-3 n'ont pu être détectées bien que leur présence soit confirmée par western blot sur extrait total (Figure 33A). Nous avons alors réalisé la co-immunoprécipitation inverse en utilisant un anticorps dirigé contre la forme β des protéines 14-3-3 et analysé la co-immunoprécipitation par western blot anti-HA. Dans ce sens la phosphatase CDC25B co-immunoprécipite avec la forme β des protéines 14-3-3. D'autres anticorps réalisés dans le laboratoire et dirigés contre la partie amino-terminale ou carboxy-terminale de CDC25B ont été utilisés en immunoprécipitation. Les résultats de l'analyse par western blot anti-14-3-3 ne montrent pas de co-immunoprécipitation des protéines 14-3-3 avec CDC25B.

Les anticorps anti-HA ou CDC25B testés ne permettent pas de révéler les complexes CDC25B/14.3.3.

Nous avons alors testé d'autres protéines susceptibles d'interagir avec CDC25B en réalisant les immunoprécipitations dans les deux sens, comme la protéine p53, la kinase Raf-1, la kinase Src et CHK2 lors de traitement par un agent génotoxique l'étoposide (Figure 33B).

Aucune co-immunoprécipitation n'a pu être mise en évidence entre CDC25B et la protéine p53, la kinase Raf-1, la kinase Src ou CHK2.

Il semblerait donc qu'il y ait un problème de conformation ou d'accessibilité de CDC25B lorsqu'elle est associée à d'autres protéines avec les différents anticorps que nous avons testés (anticorps anti-HA et dirigés contre les parties amino et carboxy terminales de CDC25B). Le système mis en place ne semble donc pas exploitable pour la recherche de nouveaux partenaires de CDC25B.

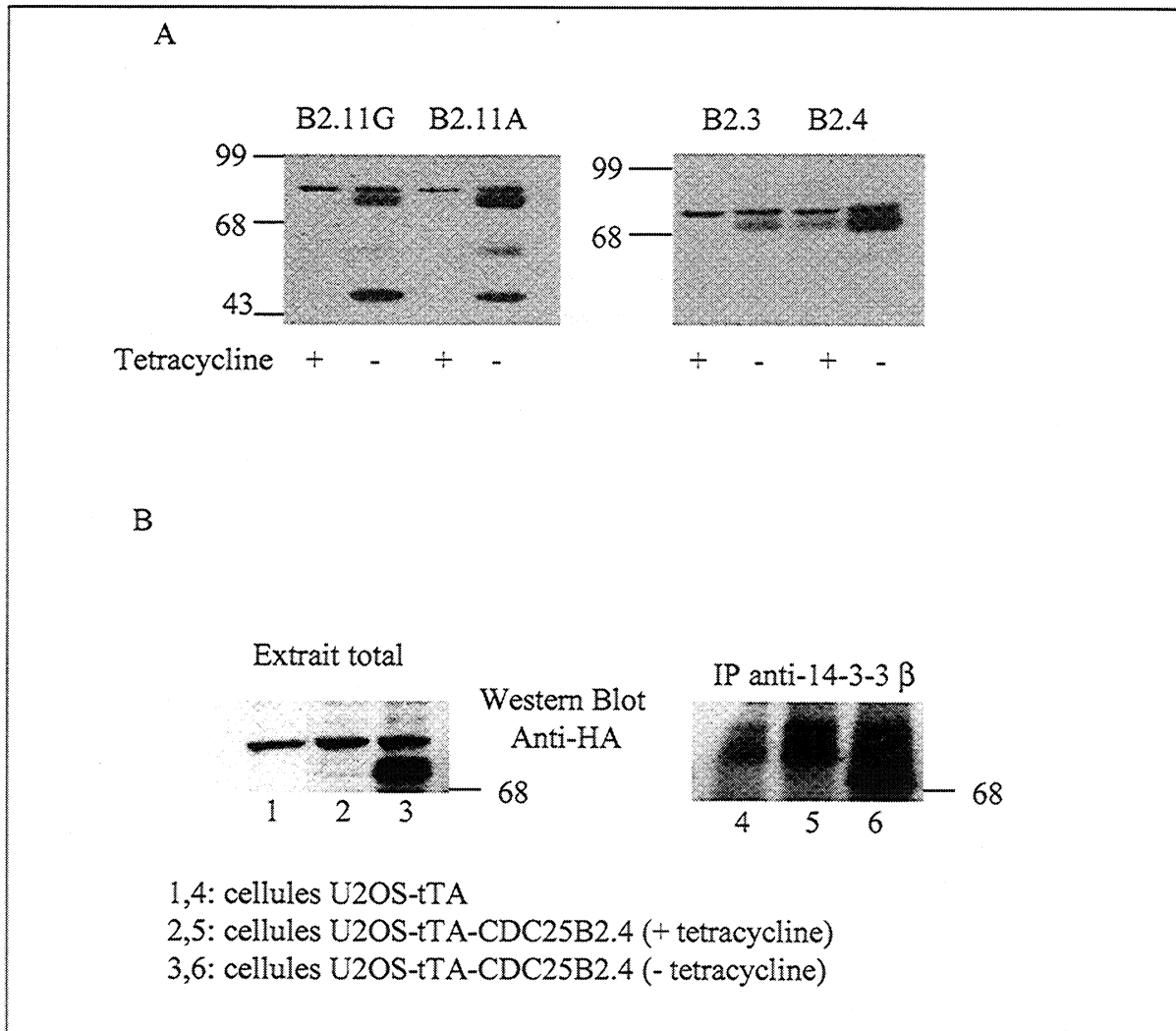


Figure 34: Analyse de différents clones U2OS-tTA-HACDC25B2.

A) 100 μ g d'extrait direct des clones U2OS-tTA-HACDC25B211G, B211A, B2.3 et B2.4 cultivés en présence (+) ou non (-) de tetracycline ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot anti-HA. B) 3 mg d'extrait protéique du clone U2OS-tTA-HACDC25B2.4 induits ou non et du clone U2OS-tTA ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-14-3-3 β et analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot anti-HA.

Par ailleurs, une analyse plus approfondie du clone U2OS-tTA-HACDC25B211G a permis de découvrir qu'il existait probablement plusieurs insertions du vecteur pUHD10HACDC25B2 dans le génome et qu'une ou plusieurs de ces insertions étaient tronquées. En effet, des extraits de cellules U2OS-tTA-HACDC25B211G induites ou pas ont été analysés par SDS-PAGE suivi de western blot anti-HA (Figure 34A). CDC25B2 est détectée à sa taille de 77 kDa mais des bandes supplémentaires apparaissent à des masses moléculaires de 57 kDa, 45 kDa et 36 kDa (le dernier n'est pas visible sur la figure car il n'apparaît qu'avec des temps d'exposition plus longs). Or, ces trois formes correspondent aux trois protéines « co »immunoprécipitant avec CDC25B2 de la figure 32. Ces trois dernières bandes ne sont pas détectées lors d'un western blot réalisé avec l'anticorps anti-CDC25B dirigé contre la partie C-terminale de CDC25B. Ce résultat suggère l'expression d'une ou plusieurs formes tronquées et/ou des produits de dégradation dans la partie carboxy-terminale de CDC25B.

Nous avons testé de nouveaux clones CDC25B2 et sélectionné ceux ne présentant pas de formes tronquées de CDC25B et ayant un bon niveau d'expression de la protéine. Les extraits cellulaires totaux des sous-clones U2OS-tTA-HACDC25B211A, des clones U2OS-tTA-HACDC25B2.3 et U2OS-tTA-HACDC25B2.4 (induits ou pas) ont été analysés par western blot anti-HA (Figure 34A). Le sous-clone U2OS-tTA-HACDC25B211A présente le même profil que le sous-clone U2OS-tTA-HACDC25B211G et possède donc les insertions tronquées décrites précédemment. Le clone U2OS-tTA-HACDC25B2.3 ne présente pas d'insertion tronquée mais l'expression de la phosphatase est modérée. Enfin, le clone U2OS-tTA-HACDC25B2.4 ne possède pas les insertions tronquées et présente une bonne expression de la phosphatase. Une légère fuite a toutefois été observée figure 34A mais n'a jamais été reproduite ultérieurement. Comme précédemment, des

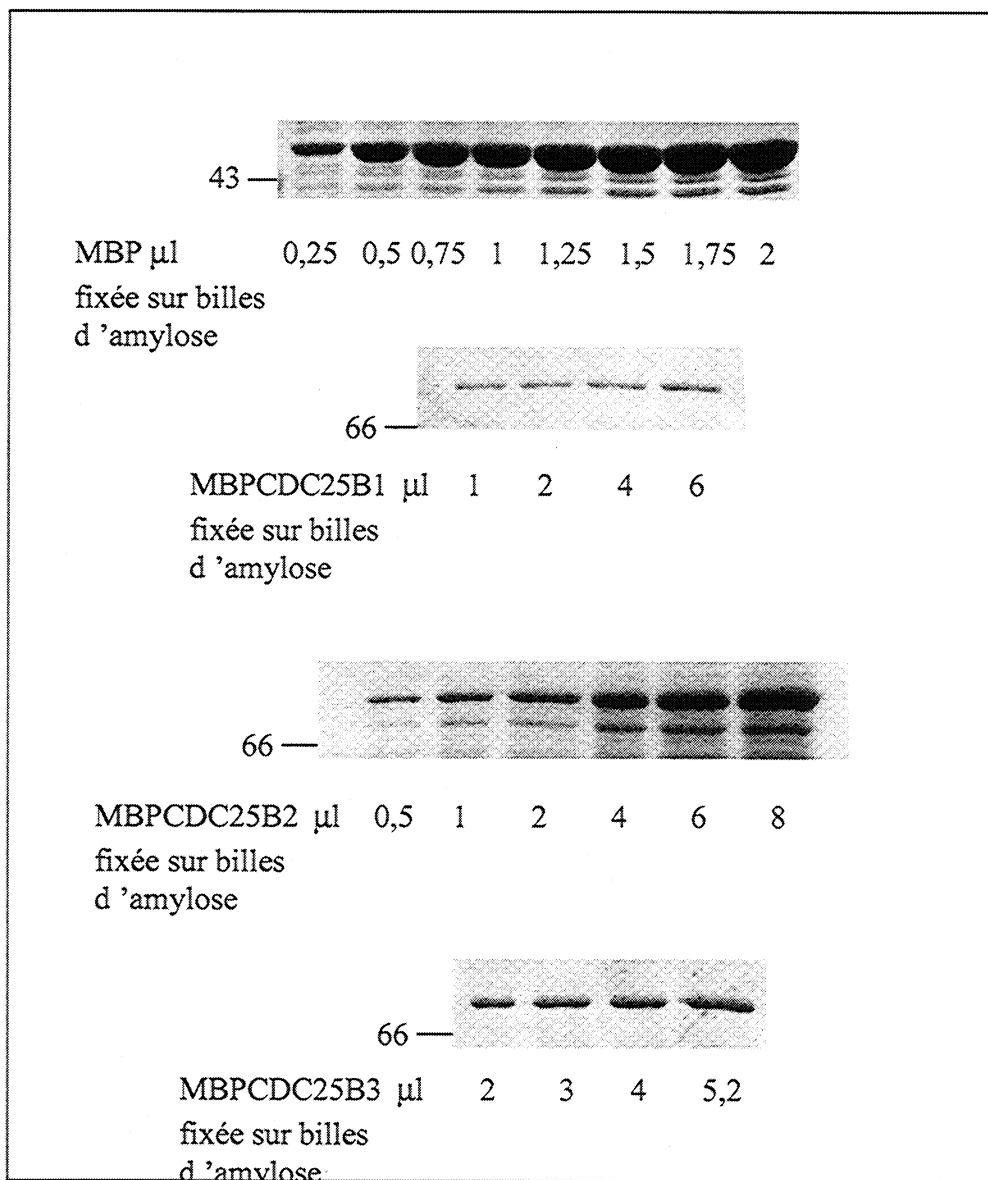


Figure 35: Production et purification de protéines recombinantes MBP, MBPCDC25B1, MBPCDC25B2 et MBPCDC25B3.

Les protéines MBP, MBPCDC25B1, MBPCDC25B2 et MBPCDC25B3 ont été produites chez *E. Coli*, extraites dans un tampon de lyse par sonication puis purifiées par incubation de l'extrait ultracentrifugé avec des billes d'amylose pendant 4H à 4°C. Après 4 lavages, les protéines purifiées accrochées sur les billes d'amylose sont analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de coomassie. La quantification est réalisée grâce à des dépôts de sérum albumine bovine avec le logiciel NIH 3.3.

expériences de co-immunoprécipitation avec les protéines 14-3-3 ont été réalisées en immunoprécipitant la protéine 14-3-3 β sur des extraits de cellules U2OS-tTA-HACDC25B2.4 et l'analyse par western blot avec l'anticorps anti-HA révèle la présence de CDC25B2 dans l'immunoprécipitation anti-14-3-3 (Figure 34B). Ce dernier clone pourra donc être utilisé pour des études ultérieures.

IV.3. Recherche de partenaires de CDC25B *in vitro*.

IV.3.1. Production et purification de protéines recombinantes.

Les protéines recombinantes CDC25B étiquetées avec des étiquettes poly-histidine ou GST (glutathione S transférase) s'avèrent très peu solubles et par conséquent la purification ne présente pas des rendements suffisants (thèse C.Cans) pour permettre la recherche de protéines interagissant avec CDC25B. Notre choix s'est donc porté sur l'étiquette MBP (Maltose Binding Protein) qui s'était révélée efficace dans le cas de la phosphatase CDC25C (Goubin-Gramatica et al., 2000).

La production et la purification de MBP-CDC25B ont été basées sur les protocoles établis pour la production et la purification de MBP-CDC25C. Brièvement, les bactéries transformées par les plasmides pMal CDC25B1, B2 ou B3 ont été induites pour la production des phosphatases par IPTG (0,1 mM) pendant 3 heures à 30°C. Les lysats bactériens ont ensuite été incubés 4 heures avec des billes d'amylose (affinité pour la MBP). Afin d'éliminer les protéines bactériennes contaminantes qui se fixaient sur les billes d'amylose, des lavages extensifs avec des tampons de concentration saline croissante et/ou de concentrations croissantes de détergents ont été entrepris mais n'ont permis d'éliminer que partiellement ces contaminants bactériens. Les protéines purifiées sont conservées fixées sur les billes d'amylose afin de servir de matrice d'affinité pour des protéines provenant d'extraits cellulaires.

Les trois formes de MBP-CDC25B ainsi produites sont analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de coomassie (Figure 35). Les quantités

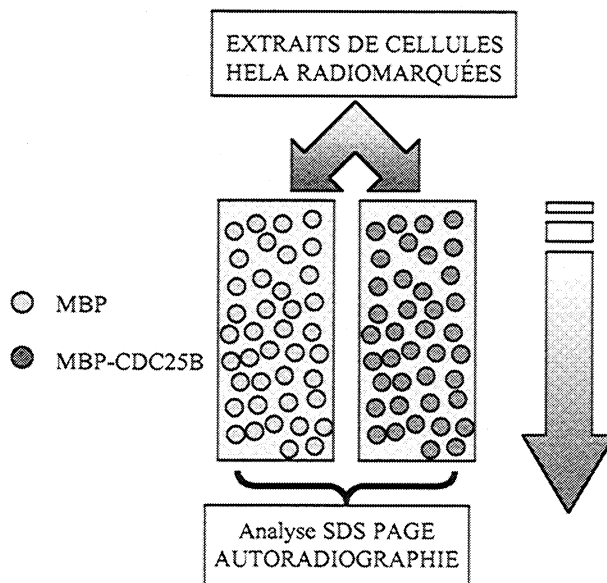


Figure 36: Méthodologie pour la recherche de partenaires *in vitro*.

Les protéines MBP et MBP-CDC25B fixées sur des billes d'amylose sont incubées (4H à 4°C sous agitation) avec des extraits de cellules HeLa radiomarquées *in vivo* avec un mélange de méthionine et cystéine ^{35}S . Après quatre lavages, les billes sont chauffées dans un tampon laemmli et analysées par SDS-PAGE, puis autoradiographiées.

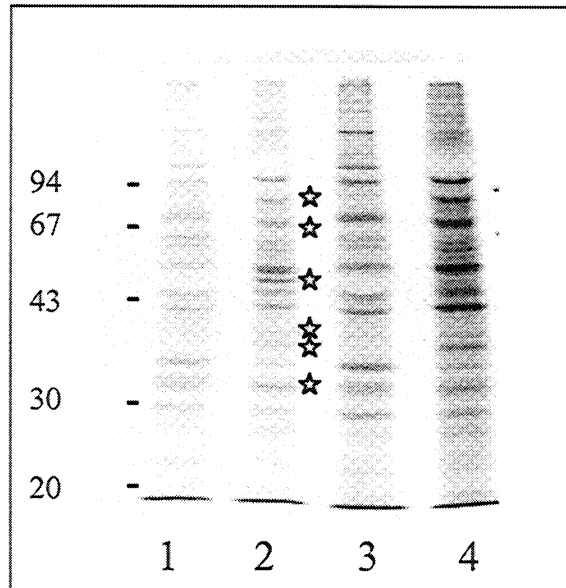


Figure 37: Interaction *in vitro* entre des protéines cellulaires et CDC25B.

50µg de protéines MBP (1,3) ou MBPCDC25B2 (2,4) fixées sur des billes d'amylose sont incubées avec 500 µg (1,2) ou 3 mg (3,4) d'extraits cellulaires HeLa radiomarquées avec un mélange Met/Cys ^{35}S puis analysées par SDS-PAGE suivi d'une autoradiographie. Les étoiles signalent les protéines trouvées uniquement sur les colonnes avec MBP-CDC25B2.

protéiques des différentes formes de MBP-CDC25B ont été quantifiées à l'aide de gammes de sérum albumine bovine (BSA) ou d'immunoglobulinesG (IgG). Des rendements très différents ont été obtenus selon les trois formes de CDC25B. La protéine MBP-CDC25B1 a été obtenue avec un rendement de 73,5 µg de protéine purifiée pour un litre de culture bactérienne, MBPCDC25B2 avec un rendement de 1,2 mg/litre de culture et MBP-CDC25B3 avec un rendement de 133,5 µg/litre de culture. La purification de la MBP seule a également été réalisée afin de servir de contrôle négatif pour les expériences de recherche de partenaires *in vitro*.

La forme MBP-CDC25B2 a un meilleur rendement de purification que les formes MBP-CDC25B1 ou B3 et permet une recherche de partenaires in vitro.

IV.3.2. Résultats préliminaires.

Disposant de protéines MBP-CDC25B2 recombinantes immobilisées sur les billes d'amylose, nous avons incubé cette matrice avec des extraits de cellules HeLa radiomarquées avec un mélange de Methionine et de Cystéine radiomarquées ³⁵S analysé par SDS-PAGE et autoradiographie les protéines fixées (Figure 36). Deux quantités différentes d'extrait protéique radiomarqué (Figure 37 lignes 1,2 : 0,5 mg et lignes 3,4 : 3 mg) ont été incubés avec les deux matrices (MBP (lignes 1,3) ou MBP CDC25B2 (lignes 2,4)) afin de visualiser des protéines dont le radiomarquage serait faible. Plusieurs bandes (6) apparaissent avec la matrice MBP-CDC25B2 qui ne sont pas retrouvées sur la matrice MBP. La première a une masse approximative de 32kDa, la seconde et la troisième autour de 35kDa, la quatrième de 45kDa, la cinquième comigre avec le marqueur de masse moléculaire 67 kDa et la sixième de 82kDa (Figure 37).

Six protéines provenant d'extraits de cellules HeLa radiomarquées interagissent spécifiquement in vitro avec la protéine MBP-CDC25B2.

IV.4. Conclusions et perspectives.

-Lignées U2OS-tTA-HACDC25B.

Nous avons montré que la recherche de partenaires protéiques de CDC25B en immunoprécipitant CDC25B avec un anticorps anti-HA ou dirigé contre les parties amino ou carboxy terminale de la phosphatase n'était pas possible. En effet, des partenaires connus de CDC25B (comme les protéines 14-3-3) n'étaient pas co-immunoprécipités dans ces conditions. Il est probable que la conformation de la protéine lorsqu'elle est complexée à d'autres protéines soit en cause. Une possibilité serait alors d'obtenir de nouveaux anticorps anti-CDC25B et de tester leur capacité à immunoprécipiter CDC25 complexée à d'autres protéines. Des anticorps monoclonaux pourraient grâce à leur spécificité de reconnaissance permettre de contourner ce problème.

Une autre possibilité serait de pouvoir s'affranchir de l'utilisation d'anticorps. Dans ce cas, il faudrait faire des lignées inductibles pour l'expression de CDC25B étiqueté avec une immunoglobuline G dépourvue de son signal d'excrétion. Les protéines produites s'accumuleraient dans la cellule et la purification serait réalisée sur des extraits protéiques grâce à des billes de protéine G sépharose (la chaîne lourde des immunoglobulines se fixant à la protéine G). Le risque majeur de cet étiquetage est la taille de l'étiquette qui peut engendrer des changements conformationnels incompatibles avec une recherche de partenaires.

-Protéine recombinante : MBP-CDC25B2.

Les premiers résultats obtenus en incubant des extraits cellulaires sur des protéines recombinantes MBP et MBP-CDC25B2 sont prometteurs quant à l'isolement et l'identification de nouveaux partenaires de CDC25. Toutefois, l'élimination de certains problèmes techniques que nous avons rencontrés devront être résolus. Les étapes suivantes seront donc :

1) Fixer de manière covalente MBP-CDC25 à une matrice. Comme nous l'avons dit des protéines d'origine bactérienne se fixent sur les billes d'amylose et aucun des traitements utilisés (concentrations croissantes de sels et/ou de détergents) n'a été suffisamment efficace pour permettre leur élimination. Or, leur présence peut gêner une analyse bi-dimensionnelle des protéines associées spécifiquement à CDC25B. C'est pourquoi, nous envisageons soit la fixation covalente de MBP-CDC25B2 aux billes d'amylose, soit de fixer la protéine MBP-CDC25B2 purifiée sur des billes de sépharose activées au bromure de cyanogène. Cette dernière solution a l'avantage de permettre l'élimination de certains contaminants qui ne sont pas élués par le maltose et resteraient donc fixés sur les billes d'amylose.

2) Diminuer considérablement la fixation non spécifique de nombreuses protéines en réalisant par exemple une préincubation des extraits cellulaires avec les billes de MBP-amylose.

3) Enrichir les protéines spécifiques afin de pouvoir les visualiser par coloration au nitrate d'argent. En effet, la sensibilité de détection du nitrate d'argent est celle requise pour une analyse en spectrométrie de masse des protéines. Cet enrichissement pourra également être effectué lors de l'étape de préincubation précédente puisque les protéines non spécifiques seront diminuées et par conséquent la concentration en protéines spécifiques sera augmentée. Les quantités d'extrait cellulaire devront par conséquent être augmentées.

Perspectives

Les phosphatases CDC25B interviennent dans la prolifération cellulaire en agissant après la réplication de l'ADN. Leur activité est finement régulée par des phosphorylations impliquant les complexes CDK/Cycline, la protéine kinase CKII et d'autres kinases restant à identifier, mais également par interaction avec certains partenaires protéiques (protéines de la famille 14-3-3).

La dérégulation des phosphatases CDC25B a été associée à des processus oncogéniques. Dans plusieurs types de cancers, ces phosphatases sont surexprimées. La plupart des études réalisées se sont intéressées au niveau d'expression des phosphatases (le plus souvent en analysant les taux d'ARN messagers) mais certaines études se penchent sur la localisation intra-cellulaire des phosphatases CDC25B dans des cellules cancéreuses. A l'heure actuelle, aucune corrélation n'a pu être faite entre la localisation intra-cellulaire de CDC25B et un facteur de pronostic. Cependant, ces études sont pour l'instant orphelines et des études épidémiologiques doivent être réalisées sur différents types de cancers afin de savoir si la répartition cellulaire de ces phosphatases peut devenir un facteur de pronostic.

Depuis plusieurs années, les phosphatases CDC25 sont l'objet d'une recherche intense d'inhibiteurs utilisables en thérapie anti-cancéreuse et/ou dans le cadre de maladies infectieuses. La recherche de nouveaux partenaires de ces phosphatases pourrait apporter une ouverture à ces recherches. Premièrement, si des protéines à caractère inhibiteur sont mises en évidence, il sera alors intéressant de cristalliser ces complexes (CDC25B/X) afin de connaître les régions de la phosphatase qui sont impliquées et les types de structures mimétiques qu'il faudrait créer. De plus,

l'ouverture vers des protéines nouvelles élargit le champs des cibles potentielles pharmacologiques dans ces deux domaines et pourrait aboutir à terme à l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques.

CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES.

V.1. Techniques relatives à la culture cellulaire.

V.1.1. Culture Cellulaire.

Les cellules U2OS-tTA (un généreux don de F. Goubin) et les lignées cellulaires qui en dérivent sont cultivées en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio) inactivé par la chaleur, 2 mM glutamine, pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 µg/ml). Les cellules U2OS-tTA-HACDC25B2 sont cultivées dans le même milieu additionné d'hygromycine (200 µg/ml) et de G418 (100 µg/ml) (Sigma). L'établissement et la caractérisation des lignées cellulaires U2OS-tTA et des lignées exprimant les protéines CDC25B de manière conditionnelle sont décrites dans un autre travail (Theis-Febvre et al., en préparation). Afin d'éteindre l'expression de CDC25B les cellules sont maintenues en présence de tétracycline (2 µg/ml). Les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio) inactivé par la chaleur, 2 mM glutamine, pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 µg/ml). Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO₂.

V.1.2. Transfections.

Les transfections transitoires sont réalisées en utilisant des polymères d'éthylèneimine linéaires (PEI, Exgen 500, Euromedex). Un million de cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de 100 mm et transfectées le jour suivant en utilisant 30 µl d'Exgen 500 et 15 µg de plasmides purifiés. Le milieu est enlevé deux heures après et les cellules sont récoltées 24H après la transfection pour une analyse du cycle cellulaire. Environ 50% des cellules sont transfectées.

V.1.3. Marquages métaboliques *in vivo*.

Les cellules U2OS-tTA, U2OS-tTA-HACDC25B2.11.G (sans tétracycline au moment de l'ensemencement) ou HeLa sont ensemencées dans un milieu DMEM complet. 22H après l'ensemencement, le milieu est remplacé par un milieu DMEM dépourvu de cystéine et de méthionine auquel sont ajoutés 200 μ Ci/ml d'un mélange de méthionine et de cystéine radiomarquées au 35 S pendant 2H à 37°C. Après ces deux heures d'incubation, les cellules sont recueillies dans le milieu et centrifugées 10 min à 200g à 4°C puis lysées dans un tampon de lyse (cf. immunoprécipitations).

V.1.4. Analyse par cytométrie de flux.

Les cellules sont recueillies puis centrifugées à 200 g pendant 5 min. à 4°C et fixées dans de l'éthanol 70% toute la nuit à -20°C. Les cellules sont réhydratées en ajoutant un volume de PBS, incubées sur glace 15 minutes, centrifugées à 200g à 4°C pendant 5 minutes, deux fois. Après une autre centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du PBS en présence de RNaseA (1mg/ml), d'iodure de propidium (1 mg/ml) et incubé pendant 25 minutes à 37°C. Les cellules exprimant les protéines X en fusion avec la GFP sont détectées sur la base de la fluorescence GFP. Les données ont été obtenues en utilisant un cytomètre de flux FACS-Calibur (Becton Dickinson) et la quantification a été réalisée en utilisant le logiciel ModFitLT.

V.2. Expression et purification de protéines recombinantes.

V.2.1. Production et purification de protéines recombinantes étiquetées MBP.

A) Expression chez *E. coli*.

Réaliser une préculture dans un milieu LB (milieu de culture classique , 1% tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 1% de NaCl, pH=7,0) additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de glucose 0,2% final équivalente à 1/50 ème de la culture finale à 37°C. Le lendemain, la préculture est diluée 50 fois et incubée à 37°C jusqu'à ce que

la DO à 600 nm soit entre 0,5 et 0,6, induire avec l'IPTG (100 μ M final) pendant 3H à 25°C. Centrifuger la culture à 2500g pendant 10 min à 4°C. Le culot ainsi obtenu est congelé à -80°C.

B) Purification des protéines.

Le culot est décongelé dans la glace, resuspendu dans un tampon de lyse (Tris-HCl pH=7,4 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, aprotinine 2 μ g/ml, leupeptine 10 μ g/ml, TPCK 20 μ g/ml, TLCK 20 μ g/ml, IT 10 μ g/ml, lysosyme 10 μ g/ml) et incubé 30 min sur glace. L'échantillon est ensuite soniqué et l'extrait cellulaire ultracentrifugé à 45000 rpm pendant 35 min à 4°C. Les surnageants sont incubés sur une résine d'amylose (100 μ l de résine par ml de lysat) pendant 4H à 4°C sous rotation permanente. Les échantillons sont centrifugés à 800g et lavés avec un tampon de lavage (Tris-HCl pH=7,4 20 mM, NaCl 1M, EDTA 1mM, DTT 1mM, aprotinine 2 μ g/ml, leupeptine 10 μ g/ml, TPCK 20 μ g/ml, TLCK 20 μ g/ml, IT 10 μ g/ml) pour les deux premiers lavages puis (Tris-HCl pH=7,4 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, aprotinine 2 μ g/ml, leupeptine 10 μ g/ml, TPCK 20 μ g/ml, TLCK 20 μ g/ml, IT 10 μ g/ml) pour les deux derniers. La protéine ainsi fixée est conservée à 4°C en présence de 0,2% d'azide de sodium.

V.2.2. Production et purification de protéines étiquetées GST.

A) Expression chez *E. coli*.

La veille de l'induction, une pré-culture de 4 ml dans du milieu LB additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline est réalisée pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, la pré-culture est diluée dans 1 litre de milieu LB+ampicilline. Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique soit entre 0,5 et 0,6. Ajouter 0,4 mM final d'IPTG et incubé 3 heures à 25°C sous agitation pour induire l'expression

de la protéine. Centrifuger la culture à 2500g, pendant 10 min à 4°C. Le culot bactérien peut être congelé à -80°C.

B) Purification des protéines.

Le culot bactérien est remis en suspension dans un tampon PBS (PBS (8g/l de NaCl, 0,2 g/l de KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH ajusté à 7,4), 1 mM EDTA, 1mM DTT, aprotinine 2 µg/ml, leupeptine 10 µg/ml, TPCK 20 µg/ml, TLCK 20 µg/ml, IT 10 µg/ml, 0,1 mg/ml final de lysosyme) et incubé dans la glace pendant 30 min. Soniquer le lysat bactérien, ajouter du triton X100 à 1% final et incubé 15 min dans la glace. Centrifuger 10 min à 12000g et récupérer le surnageant contenant la protéine.

Les surnageants sont incubés avec des billes de glutathion-sépharose (2ml) 30 min à 4°C sous rotation. Le mélange est centrifugé 3 min à 4°C à 1000g. Les billes sont lavées 2 fois avec 20 ml de tampon PBS + inhibiteurs de protéases+ Triton X100 1% puis 2 fois avec 20 ml de tampon PBS+ inhibiteurs de protéases. Les billes sont remises en suspension dans 10 ml de tampon PBS + inhibiteurs de protéases et le tout déposé sur une colonne. Les étapes suivantes se font à 4°C.

Après écoulement du tampon ajouter 2,5 ml de tampon d'éluion (50 mM de Tris pH=8, 50 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM glutathion réduit) puis récupérer immédiatement les protéines éluées par fractions de 0,5 ml. Doser les quantités de protéines (cf méthodes relatives à l'analyse des protéines). Regrouper les fractions riches en protéines.

V.2.3. Expression de protéines dans le lysat de réticulocytes.

Les ADNc des isoformes de CDC25B et les différents mutants utilisés sont clonés dans le vecteur pET14b ou pour CDC25A et C dans le vecteur pcDNA3 sous la dépendance d'un promoteur du phage T7 pour leur transcription. Le lysat de réticulocytes, contenant l'ARN polymérase T7 permet la transcription et la traduction

des protéines *in vitro* (kit TNT T7 Quick coupled Transcription/translation system, Promega). Ce kit est utilisé selon les indications du fabricant.

Mélanger 0,5 µg d'ADN + 1 µl de méthionine marquée au ³⁵S (1.000 Ci/mmmole à 10 mCi/ml, NEN) ou 1 µl de méthionine à 1 mM (kit TNT T7) + 20 µl de lysat de réticulocyte + eau stérile traitée pour éliminer les RNAses (kit TNT T7) dans un volume de 25 µl final et incubé 75 min à 30°C.

V.3. Interactions *In vitro*.

V.3.1. interaction *in vitro* entre la kinase Eg3 et les phosphatases CDC25.

Les formes sauvage et mutante de CDC25 sont traduites *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin (TNT7 Quick, Promega) en présence de méthionine ³⁵S. Les protéines de fusion recombinantes GST-CDC25B ou GST seule sont produites chez *E. coli* comme une protéine de fusion Glutathione-S-Transferase et purifiée comme il a été décrit précédemment (Baldin et al., 1997b). La protéine recombinante pEg3FL (750ng) est immunoprécipitée avec l'anticorps L2 dirigé contre la protéine Eg3 de xénope dans un tampon de lyse (50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton-X100, 100 µM Na₃VO₄, 1 mM DTT) additionné d'inhibiteurs de protéases (1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml inhibiteur de trypsine, 10 µg/ml tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK), 10 µg/ml tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 0.17 mg/ml phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and 10 µg/ml calpaine I), pendant 3 heures à 4°C. 50 µl de Protéine A Sepharose (Sigma) diluée au 1/5^{ème} est ajoutée et l'incubation est continuée pendant 45 minutes. Les complexes immunoprécipités sont lavés trois fois avec 1 ml de tampon de lyse et resuspendus dans 100 µl du même tampon additionné des protéines CDC25B traduites *in vitro* (5,5 µl de lysat programmé) ou des protéines de fusion recombinantes GST-

CDC25B (5 µg). Après une heure d'incubation à 4°C, les échantillons sont centrifugés pendant 3 minutes à 734 g puis lavés deux fois avec le même tampon et deux fois avec un tampon de lyse contenant 250 mM NaCl. Les précipités sont analysés par SDS-PAGE et autoradiographiés. Quand la protéine de fusion GST-CDC25 B est utilisée l'analyse se fait par western blot en utilisant un anticorps anti-GST (Pharmacia Biotech, 1/1000) et un anticorps secondaire anti-chèvre HRP (DAKO, 1/2500).

V.3.2. interaction *in vitro* entre des protéines MBP ou MBPCDC25B et des extraits de cellules HeLa.

Les purifications de protéines MBP ou MBPCDC25B2 (50 µg) sont incubées avec des extraits (cf V.4.) de cellules HeLa radiomarquées pendant 4H à 4°C sous rotation permanente. Les échantillons sont lavés 4 fois avec un tampon de lyse sans NP40 (cf V.4.).

V.4. Immunoprécipitations.

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 3-5 volumes de tampon de lyse (50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton-X100, 100µM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml IT, 10 µg/ml tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK), 10 µg/ml tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 0.17 mg/ml phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) et 10 µg/ml calpaine I). Les immunoprécipitations sont réalisées en utilisant 10 µl d'anticorps polyclonal dirigé contre pEg3 de xénope (L2) et son sérum préimmun correspondant, ou l'anticorps HA (5 µl) (12CA5, Roche Molecular Biomedicals) ou la matrice d'affinité anti-HA (15 µl)(anti-HA affinity matrix Roche) pendant 4h à 4°C. La Protéine A Sépharose (50 µl de la dilution au 1:5, Sigma) est ajoutée et l'incubation est rallongée d'une heure (sauf pour la matrice anti HA). Les échantillons sont lavés deux fois avec le tampon de lyse (sans NP40) puis deux fois avec un tampon de lyse contenant

250mM de NaCl. Les immunoprécipités sont analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot comme cela a été précédemment décrit (Baldin et al., 1997b) en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA (12CA5, Roche Molecular Biomedicals) (1/2500) ou anti-CDC25B dirigé contre la partie COOH-terminale (Santa Cruz)(1/1000) ou anti-14-3-3 (Santa Cruz 1/1000).

V.5. Phosphorylation des phosphatases CDC25 par la kinase Eg3 *in vitro*.

CDC25B traduite *in vitro* dans des lysats de réticulocyte de lapin est immunoprécipitée avec un anticorps polyclonal anti-CDC25B humain (dirigé contre un peptide C-terminal) comme précédemment (Baldin et al., 1997a). Les immunoprécipités sont incubés avec 250 ng de protéine recombinante Eg3FL humaine ou de la kinase tronquée Eg3ΔC dans un tampon kinase (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 1 mM DTT), 50 μM ATP et 5μCi γ³²P-ATP. La réaction est réalisée pendant 30 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 0,5 ml de tampon de lyse, les échantillons sont centrifugés et les billes sont resuspendues dans un tampon échantillon Laemmli. Les échantillons sont séparés par SDS-PAGE et analysés par autoradiographie.

V.6. Mesure directe de l'activité phosphatase.

Les phosphatases CDC25B sont produites en lysat de réticulocyte en présence de méthionine ³⁵S et immunoprécipitées et incubées avec 250 ng de protéine recombinante humaine tronquée pEg3ΔC dans un tampon kinase (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 1 mM DTT 50 μM ATP) pendant 30 minutes à 30°C. Les 4/5 des immunoprécipités sont incubés avec le substrat exogène, la fluorescéine di-phosphate ou FDP (Rice et al., 1997). La cinétique d'apparition de fluorescence à 530 nm, après excitation à 485 nm, lors de l'hydrolyse du substrat en FMP (fluorescéine mono phosphate) au cours de la réaction enzymatique, est suivie à l'aide

d'un spectrofluorimètre (Fluorescam, LabSysteme). L'augmentation de la fluorescence est représentée par une droite dont la pente est le reflet de l'activité phosphatase.

Les immunoprécipités sont lavés avec 1 ml de tampon FDP (30 mM Tris-HCl pH=8,2, 75 mM NaCl, 0,67 mM EDTA, 0,033% BSA, 1 mM DTT). Remettre en suspension les immunoprécipités dans 0,2 ml du tampon FDP + 20 μ M FDP (Molecular Probes) puis placer ce mélange dans une plaque de 96 puits (pour la mesure au spectrofluorimètre). Mesurer l'émission de fluorescence du mélange réactionnel à 530 nm, après excitation à 485 nm, au cours du temps. Déterminer la pente de la droite obtenue lors de la mesure et normaliser la valeur en fonction de la quantité de protéines radiomarquées immunoprécipitées.

V.7. Méthodes relatives à l'analyse des protéines.

V.7.1. Electrophorèse SDS-PAGE :

Les protéines sont analysées par électrophorèse en présence de SDS sur des gels de polyacrylamide de concentration uniforme dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1%). La séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire est réalisée dans un système à cuve verticale. La quantité des protéines est déterminée par un test colorimétrique en utilisant le kit de dosage Biorad, selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les échantillons protéiques sont repris dans un tampon Laemmli 1X final (Tris-HCl 50 mM pH=6,8, SDS 2%, β -mercapto-éthanol 5M, glycérol 10%, traces de bleu de bromophénol) puis dénaturés 10 minutes à 70°C.

Le gel est constitué d'une zone de séparation dont la concentration en polyacrylamide est choisie en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer de 8% à 12,5% (Tris-HCl pH=8,8 0,375 mM, 8 à 12,5% final d'une solution Acrylamide/bisacrylamide à 40% (Eurobio), SDS 0,1%, APS 0,1% Temed 1%) précédée par une zone de concentration de l'échantillon (Tris-HCl pH=6,8 0,125 mM,

4% final d'une solution Acrylamide/bisacrylamide à 40% (Eurobio) SDS 0,1%, APS 0,1% Temed 1%).

L'électrophorèse est réalisée à 80 volts pour l'entrée des échantillons dans les gel de concentration et à 150 volts lorsqu'ils arrivent dans le gel de séparation.

V.7.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en milieu liquide.

Le gel est rincé dans le tampon de transfert (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%, SDS 0,1%). Le gel est alors pris en sandwich entre 4 feuilles de papier (3MM, Whatman) et une membrane de nitrocellulose (Hybond C, Amersham) imbibées dans le même tampon. Le transfert est réalisé pendant une heure dans le tampon de transfert à 60 volts. La membrane est ensuite rincée dans un tampon TBST (Tris-base 20mM, NaCl 137 mM, Tween20 (polyoxyéthylène sorbitan monolaurate, SIGMA) 0,2%, pH=7,6).

V.7.3. Immunodétection.

La membrane ainsi obtenue est saturée pendant 15 minutes dans une solution TBST lait écrémé 5%. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C sous agitation douce ou à température ambiante selon les conditions optimales de l'anticorps utilisé dans une solution de TBST lait écrémé 5% additionnée de l'anticorps primaire. Puis, la membrane est rincée 5X 5 minutes dans le TBST puis incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de radis noir (HRP). La membrane est ensuite lavée 5X 10 minutes dans des bains de TBST. Puis la membrane est incubée avec le substrat de la peroxydase (kit ECL, Amersham) et révélée avec des films Kodak.

V.7.4. Coloration des protéines au bleu de coomassie.

Le gel est déposé dans la solution de coloration (0,3% de bleu de coomassie 50% méthanol, 10% acide acétique) pendant 15 minutes, puis plongé dans un bain de solution de décoloration (30% éthanol, 10% acide acétique). Le bain est renouvelé plusieurs fois jusqu'à ce qu'il devienne translucide et que l'on visualise les protéines colorées. Le gel est soit séché 1H à 70°C sous vide soit hydraté avec une solution de glycérol 3% et séché entre deux feuilles de cellophane sur un support.

V.7.5. Détection et quantification des protéines radioactives.

Les protéines radioactives (radiomarquées à la méthionine ^{35}S ou phosphorylées en présence d'ATP γ ^{32}P) sont séparées par SDS-PAGE. Le gel séché sous vide, après coloration des protéines au bleu de coomassie est placé dans une cassette face à un écran pour être révélé au phospho-imageur ou contre un film photographique (X-O-mat, KODAK). Les protéines radioactives dont le rayonnement active l'écran sont visualisées sur le phosphor-imageur et quantifiées à l'aide du logiciel Image Quant (Molecular Dynamics).

BIBLIOGRAPHIE

- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs, *J Cell Sci* *111*, 1751-7.
- Adam, E. D. H., and Adam, S. A. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence -mediated binding to the nuclear envelope., *J Cell Biol* *125*, 547-555.
- Agutter, P. S., and Prochnow, D. (1994). Nucleocytoplasmic transport, *Biochem J* *300*, 609-618.
- Akey, C. W. (1990). Visualization of transported-related configurations of the nuclear pore transporter., *Biophys J* *58*, 341-355.
- Akey, C. W., and Goldfarb, D. S. (1989). Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process, *J Cell Biol* *109*, 971-982.
- Arvai, A. S., Bourne, Y., Williams, D., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (1995). Crystallisation and preliminary crystallographic study of human CKSHS1: A cell cycle regulatory protein, *Proteins* *21*, 70-73.
- Baldin, V. (2000). 14-3-3 proteins and growth control. In *Progress in Cell Cycle Research*, L. Meijer, Jézéquel, A. and Ducommun, B., ed. (New York, USA, Plenum Press).
- Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1997a). Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1/cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation, *J Biol Chem* *272*, 32731-32735.
- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G., and Ducommun, B. (1997b). Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control?, *Oncogene* *14*, 2485-2495.
- Baratte, B., Meijer, L., Galaktionov, K., and Beach, D. (1992). Screening for antimetabolic compounds using the cdc25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34^{cdc2}/cyclin B^{cdc13} protein kinase, *Anticancer Research* *12*, 873-880.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage, *FEBS Lett* *490*, 117-22.
- Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast, *Nature* *300*, 706-709.
- Bernardi, R., Liebermann, D. A., and Hoffman, B. (2000). Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation, *Oncogene* *19*, 2447-54.

Bischoff, J. R., and Plowman, G. D. (1999). the Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis, *Trends cell Biol* 9, 454-9.

Blasina, A., de Weyer, I. V., Laus, M. C., Luyten, W. H., Parker, A. E., and McGowan, C. H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase, *Curr Biol* 9, 1-10.

Blomberg, I., and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases, *Mol Cell Biol* 19, 6183-94.

Blot, J., Chartrain, I., Roghi, C., Philippe, M., and Tassan, J.-P. (2001). Cell cycle regulation of pEg3 a new xenopus protein kinase of the KIN1/PAR1/MARK family, *Developmental Biology in press*.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay, *Mol Cell Biol* 16, 4207-14.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brizuela, L., Draetta, G., and Beach, D. (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase, *EMBO J* 6, 3507-3514.

Broggini M., B. G., Brenna A., Riva L., Codegioni AM., Torri V., Lissoni AA., Mangioni C., D'Incalci M. (2000). Cell-Cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients., *Anticancer Research* 20, 4835-40.

Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., and Fornace, A. J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase, *Nature* 411, 102-107.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage, *Science* 282, 1497-501.

Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., and Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling, *Oncogene* 17, 1395-413.

Cans, C., Baldin, V., Mils, V., and Ducommun, B. (1998). Les phosphatases cdc25: régulateurs du cycle cellulaire et oncogènes potentiels, *médecine/sciences* 3, 269-274.

Cans, C., Ducommun, B., and Baldin, V. (1999). Proteasome-dependent degradation of human CDC25B phosphatase, *Mol Biol Reports* 26, 53-57.

Carr, A. M. (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle, *Science* 287, 1765-6.

- Cayrol, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2/M cell cycle arrest in p53-deficient human colon cancer cells, *Oncogene* *16*, 311-320.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage [In Process Citation], *Nature* *401*, 616-20.
- Chen, M. S., Hurov, J., White, L. S., Woodward-Thomas, T., and Piwnica-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking CDC25C protein phosphatase, *Molecular and Cellular Biology* *21*, 3853-61.
- Chen, X., and Prywes, R. (1999). Serum-induced expression of the cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression, *Mol Cell Biol* *19*, 4695-702.
- Chiou, C. C., Chan, C. C., Sheu, D. L., Chen, K. T., Li, Y. S., and Chan, E. C. (2001). Helicobacter Piloni infection induced alteration of gene expression in human gastric cells., *Gut* *48*, 598-604.
- Chook, Y. M., and Blobel, G. (1999). structure of the nuclear transport complex karyopherin- β 2-RanGppNHp, *Nature* *399*, 230-237.
- Clarke, P. R., Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by Type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts, *Mol Biol Cell* *4*, 397-411.
- Clute, P., and Pines, J. (1999). temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase, *Nature Cell Biology* *1*, 82-87.
- Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1994). cdc2 regulatory factors, *Cur Op Cell Biol* *6*, 877-882.
- Conklin, D. S., Galaktionov, K., and Beach, D. (1995). 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases, *Proc Natl Acad Sci USA* *92*, 7892-7896.
- Coqueret, O., Berube, G., and Nepveu, A. (1998). The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle- dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase, *Embo J* *17*, 4680-94.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C. Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D., and Gautier, J. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage, *Mol Cell* *6*, 649-59.
- Crenshaw, D. G., Yang, J., Means, A. R., and Kornbluth, S. (1998). The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1, *Embo J* *17*, 1315-27.
- Cross, F. R., Yuste-Rojas, M., Gray, S., and Jacobson, M. D. (1999). Specialization and targeting of B-type cyclins, *Mol Cell* *4*, 11-9.

- Cubizolles, F., Legagneux, V., Le Guellec, R., Chartrain, I., Uzbekov, R., Ford, C., and Le Guellec, K. (1998). pEg7, a new *Xenopus* protein required for mitotic chromosome condensation in egg extracts, *J Cell Biol* *143*, 1437-46.
- Daga, R. D., and Jimenez, J. (1999). Translational control of the CDC25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth, *Journal of Cell Science* *112*, 3137-46.
- Dalal, S. N., Schweitzer, C. M., and DeCaprio, J. A. (1999). Cytoplasmic localization of Human CDC25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site, *Mol Cell Biol* *19*, 4465-4479.
- Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M., and Ducommun, B. (2000a). Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene* *19*, 2179-85.
- Davezac, N., Ducommun, B., and Baldin, V. (2000b). Rôle des phosphatases CDC25 dans le contrôle de la prolifération, *Pathol Biol* *48*, 182-189.
- De Bondt, H., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H., Morgan, D., and Kim, S. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2, *Nature* *363*, 595-602.
- de Falco, G., and Giordano, A. (1998). CDK9 (PITALRE): a multifunctional cdc2-related kinase, *J Cell Physiol* *177*, 501-6.
- Desai, D., Wessling, H. C., Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2., *Mol Cell Biol* *15*, 345-350.
- Descombes, P., and Nigg, E. A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts, *Embo J* *17*, 1328-1335.
- Devault, A., Martinez, A.-M., Fesquet, D., Labbé, J.-C., Morin, N., Tassan, J.-P., Nigg, E. A., Cavadore, J.-C., and Dorée, M. (1995). MAT1 ("*ménage à trois*") a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-CDK7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK., *EMBO J* *14*, 5027-5036.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and a long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts, *8*, 2540-2551.
- Ding, X. L., Husseman, J., Tomashevski, A., Nochlin, D., Jin, L. M., and Vincent, I. (2000). the cell cycle CDC25A tyrosine phosphatase is activated in degenerating postmitotic neurons in Alzheimer's disease, *American Journal of Pathology* *157*, 1983-1990.
- Dingwal, C., and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus?, *Trends Biochem Sci* *16*, 478-481.

Draetta, G., Damagnez, V., and Cottarel, G. (1995). Methods for identifying inhibitors of cdc25 phosphatases (USA, Issued U.S. patent #5,443,962).

Draviam, V. M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R., and Pines, J. (2001). The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus, *J Cell Biol* 152, 945-58.

Drewes, G., Ebneith, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption, *Cell* 89, 297-308.

Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.-A., Franza, B. R. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1991). cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin, *EMBO J* 10, 3311-3319.

Ducruet, A. P., Rice, R. L., Tamura, K., Yokokawa, F., Yokokawa, S., Wipf, P., and Lazo, J. S. (2000). Identification of new CDC25 dual specificity phosphatase inhibitors in a targeted small molecule array., *Bioorg Med Chem* 8, 1451-66.

Dulic, V., Kaufmann, W., Wilson, S., Tlsty, T., Lees, E., Wade harper, J., Elledge, S., and Reed, S. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell* 76, 1013-1023.

Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase, *Science* 257, 1958-1960.

Dunphy, W., and Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity, *Cell* 67, 189-196.

Duverger, E., Carpentier, V., Roche, A. C., and Monsigny, M. (1993). Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway., *Exp Cell Res* 207, 197-201.

Duverger, E., Pellerin-mendes, C., Mayer, R., Roche, A. C., and Monsigny, M. (1995). Nuclear import of glycoconjugates from the cytosol, *J Cell Sci* 108, 1325-32.

Eckstein, J. W., Beer-Romero, P., and Berdo, I. (1996). Identification of an essential acidic residue in Cdc25 protein phosphatase and a general three-dimensional model for a core region in protein phosphatases, *Protein Sci* 5, 5-12.

Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo, *Cell* 57, 177-187.

El-Deiry, W., Tokino, T., Velculescu, V., Levy, D., Parsons, R., Trent, J., Lin, D., Mercer, W., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 75, 817-825.

Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* 274, 1664-72.

Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1994). cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development, *Curr Opin Cell Biol* 6, 847-852.

Elledge, S. J., and Spottswood, M. R. (1991). A new human protein kinase, cdk2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1, *EMBO J* 10, 2653-2659.

Escargueil, A. E., Plisov, S. Y., Filhol, O., Cochet, C., and Larsen, A. K. (2000). Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469, *J Biol Chem* 275, 34710-8.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division, *Cell* 33, 389-396.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis, *Nature* 410, 842-7.

Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M., and Forbes, D. J. (1987). Inhibition of invitro nuclear import by a lectin that binds to nuclear pores, *J Cell Biol* 104, 189-200.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., and Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs, *Cell* 82, 475-83.

Fisher, R. P. (1997). CDKs and cyclins in transition(s)., *Curr Opin Genet Dev* 7, 32-38.

Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, FCW Vogel Leipzig.

Fontoura, B., Blobel, G., and Matunis, M. J. (1999). A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186kDa precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nuo96, *J Cell Biol* 144, 1097-1112.

Ford, H. L., Landesman-Bollag, E., Dacwag, C. S., Stukenberg, P. T., Pardee, A. B., and Seldin, D. C. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of the human SIX1 homeodomain protein, *J Biol Chem* 275, 22245-54.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals, *Cell* 90, 1051-60.

Forrest, A., and Gabrielli, B. (2001). CDC25B activity is regulated by 14-3-3., *Oncogene* 20, 4393-401.

Forrest, A. R., McCormack, A. K., DeSouza, C. P., Sinnamon, J. M., Tonks, I. D., Hayward, N. K., Ellem, K. A., and Gabrielli, B. G. (1999). Multiple splicing variants of *cdc25B* regulate G2/M progression, *Biochem Biophys Res Commun* 260, 510-5.

Fritzen, E. L., Brightwell, A. S., Erickson, L. A., and Romero, D. L. (2000). The solid phase synthesis of tetrahydroisoquinolines having CDC25B inhibitory activity, *Bioorg Med Chem Lett* 10, 649-52.

- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H., and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1, *Mol Biol Cell* *10*, 833-45.
- Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase, *Science* *277*, 1495-1497.
- Gabrielli, B. G., Clark, J. M., McCormack, A. K., and Ellem, K. A. (1997). Ultraviolet light-induced G2 phase cell cycle checkpoint blocks cdc25- dependent progression into mitosis, *Oncogene* *15*, 749-58.
- Gabrielli, B. G., De Souza, C. P. C., Tonks, I. D., Clarck, J. M., Hatward, N. K., and Ellem, K. A. O. (1996). Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells, *J Cell Science* *109*, 1081-1093.
- Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: Evidence for multiple roles of mitotic cyclins, *Cell* *67*, 1181-1194.
- Galaktionov, K., Chen, X. C., and Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc, *Nature* *382*, 511-517.
- Galaktionov, K., Jesus, C., and Beach, D. (1995a). Raf1 interaction with cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation, *Genes & Dev* *9*, 1046-1058.
- Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., and Beach, D. (1995b). Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes, *Science* *269*, 1575-1577.
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J., and Hall, M. N. (1991). Nuclear Protein Localization, *Biochim Biophys Acta* *1071*, 83-101.
- Garner-Hamrick, P. A., and Fisher, C. (1998). Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects, *Int J Cancer* *76*, 720-8.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*, *Cell* *54*, 433-439.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., and Kirschner, M. W. (1991). *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2, *Cell* *67*, 197-211.
- Giannakakou, P., Sackett, D. L., Ward, Y., Webster, K. R., Blagosklonny, M. V., and Fojo, T. (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein, *Nat Cell Biol* *2*, 709-17.

Giet, R., and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases, *J Cell Sci* 112, 3591-601.

Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J.-C., Russell, P., Fernandez, A., and Lamb, N. (1992). cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells, *J Cell Biol* 118, 785-794.

Glover, D. M., Ohkura, H., and Tavares, A. (1996). Polo kinase: The choreographer of the mitotic stage?, *J Cell Biol* 135, 1681-1684.

Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., and Laskey, R. A. (1995). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import, *Nature* 377.

Gothel, S. F., and Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts, *Cell Mol Life Sci* 55, 423-36.

Goubin-Gramatica, F., Ducommun, B., and Prevost, G. (2000). Méthode d'obtention de la phosphatase Cdc25C humaine et méthode d'identification de modulateurs de la phosphatase Cdc25C humaine.

Gould, K. L., and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitosis, *Nature* 342, 39-45.

Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L., and Piwnica-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding, *Oncogene* 20, 1839-51.

Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15, *EMBO J* 11, 3995-4005.

Guan, K. L., Broyles, S. S., and Dixon, J. E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus, *Nature* 350, 359-62.

Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed, *Cell* 81, 611-20.

Halevy, O., Novitch, B. G., Spicer, D. B., Skapek, S. X., Rhee, J., Hannon, G. J., Beach, D., and Lassar, A. B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD, *Science* 267, 1018-1021.

Hall, M., Bates, S., and Peters, G. (1995). Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins., *Oncogene* 11, 1581-1588.

Hall, N. M., Hereford, L., and Herskowitz, I. (1984). Targeting of E. Coli beta-galactosidase to the nucleus in yeast, *Cell* 36, 1057-1065.

Hamanaka, R., Maloid, S., Smith, M. R., O'Connell, C. D., Longo, D. L., and Ferris, D. K. (1994). Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila* polo serine-threonine kinase, *Cell Growth Differ* 5, 249-57.

Hanna, D. E., Rethinaswamy, A., and Glover, C. V. C. (1995). Casein Kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 270, 25905-25914.

Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15Ink4B is potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest, *Nature* 371, 257-261.

Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., and Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast, *Science* 183, 46-51.

Heald, R. (2000). Motor function in the mitotic spindle, *Cell* 102, 399-402.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol Cell* 1, 3-11.

Hernandez, S., Hernandez, L., Bea, S., Pinyol, M., Nayach, I., Bellosillo, B., Nadal, A., Ferrer, A., Fernandez, P. L., Montserrat, E., *et al.* (2000). cdc25a and the splicing variant cdc25b2, but not cdc25B1, -B3 or -C, are over-expressed in aggressive human non-Hodgkin's lymphomas, *International Journal of Cancer* 89, 148-52.

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J.-H., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995). Novel Ink4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6., *Mol Cell Biol* 15, 2672-2681.

Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J., and Mak, T. W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2 [see comments], *Science* 287, 1824-7.

Hoffmann, I., Clarke, P., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis, *EMBO J* 12, 53-63.

Hoffmann, I., Draetta, G. F., and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25 A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition., *EMBO J* 13, 4302-4310.

Horiguchi, T., Nishi, K., Hakoda, S., Tanida, S., Nagata, A., and Okayama, H. (1994). Dnacin A1 and dnacin B1 are antitumor antibiotic that inhibit cdc25B phosphatase activity, *Biochem Pharmacol* 48, 2139-2141.

Hu, Y. C., Lam, K. Y., Law, S., Wong, J., and Srivastava, G. (2001). Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra- 1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC, *Clin Cancer Res* 7, 2213-21.

Hunt, T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase, *Curr Opin Cell Biol* 1, 286-274.

Iavarone, A., and Massague, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15, *Nature* 387, 417-22.

Iavarone, A., and Massague, J. (1999). E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest, *Mol Cell Biol* 19, 916-22.

Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. (1995). In vivo evidence for involvement of a 58 kDA component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import., *EMBO J* 14, 3617-26.

Izumi, T., and Maller, J. L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase, *Mol Cell Biol* 4, 1337-1350.

Jacobson, M. D., Gray, S., Yuste-Rojas, M., and Cross, F. R. (2000). Testing cyclin specificity in the exit from mitosis, *Mol Cell Biol* 20, 4483-93.

Jans, D. A., and Hübner, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation, *Physiological reviews* 76, 651-681.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyack, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., and Pavletich, N. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex, *Nature* 376, 313-320.

Jessus, C., and Beach, D. (1992). Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B, *Cell* 68, 323-332.

Jessus, C., and Ozon, R. (1995). Function and regulation of cdc25 protein phosphatase through mitosis and meiosis. In *Prog. Cell Cycle Res.*, L. Meijer, S. Guidet, and H. Y. L. Tung, eds. (New York, USA, Plenum Press), pp. 215-228.

Jin, P., Hardy, S., and Morgan, D. O. (1998). Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage, *J Cell Biol* 141, 875-85.

Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igashari, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle, *EMBO J* 13, 1549-1556.

Johnson, R. T., and Rao, P. N. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei, *Nature* 226, 717-722.

Johnson, R. T., and Rao, P. N. (1971). Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells, *Biological Reviews* 46, 97-155.

Kaffman, A., Rank, N. M., O'Neill, E. M., Huang, L. S., and O'Shea, E. K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus, *Nature* 396, 482-6.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., and Smith, A. E. (1984a). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large T-antigen, *Nature Lond* 311, 109-118.

Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984b). A short amino-acid sequence able to specify nuclear location., *Cell* 39, 499-509.

Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jesus, C., and Ozon, R. (1998). MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase, *Exp Cell Res* 244, 491-500.

Karaiskou, A., Perez, L. H., Ferby, I., Ozon, R., Jesus, C., and Nebreda, A. R. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins, *J Biol Chem* 276, 36028-34.

Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I., and Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis [In Process Citation], *J Cell Biol* 146, 573-84.

Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace Jr, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia., *Cell* 71, 587-597.

Kasten, M., and Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity, *Oncogene* 20, 1832-8.

Katich, S. C., Zerfass-Thome, K., and Hoffmann, I. (2001). Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene, *Oncogene* 20, 543-50.

Kato, J.-Y., Matsuoka, M., Strom, D. K., and Sherr, C. J. (1994b). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase., *Mol Cell Biol* 14, 2713-2721.

Kerkhoff, E., and Rapp, U. R. (1998). High-intensity Raf signals convert mitotic cell cycling into cellular growth, *Cancer Res* 58, 1636-40.

Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14973-7.

Kitada, K., Johnson, A. L., Johnston, L. H., and Sugino, A. (1993). A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene dbf4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5, *Mol Cell Biol* 13, 4445-57.

Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., and Newport, J. (1994). Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14, *Mol Biol Cell* 5, 273-282.

- Korner, K., Jerome, V., Schmidt, T., and Muller, R. (2001). Cell cycle regulation of the murine *cdc25B* promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element, *J Biol Chem* *276*, 9662-9.
- Krek, W., and Nigg, E. (1991). Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates., *EMBO J* *10*, 3331-3341.
- Kudo, Y., Yasui, W., Ue, T., Yamamoto, S., Yokozaki, H., Nikai, H., and Tahara, E. (1997). Overexpression of cyclin-dependent kinase activating CDC25B phosphatase in human gastric carcinomas., *Jpn J Cancer Res* *88*, 947-952.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., and Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation, *Proc Natl Acad Sci USA* *89*, 7491-7495.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. (1992). Regulation of the *cdc25* protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts, *Cell* *70*, 139-151.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts, *Science* *273*, 1377-1380.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14.3.3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25, *Genes & Dev* *13*, 1067-1072.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K. H., Wang, S. X., and Dunphy, W. G. (1998a). The *xenopus* *chk1* protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts, *J Cell Biol* *142*, 1559-1569.
- Kumagai, A., Yakowec, P. S., and Dunphy, W. G. (1998b). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts, *Mol Biol Cell* *9*, 345-354.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kosthka, S., Kraft, R., and Görlisch, D. (1997). export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor., *Cell* *90*, 1061-71.
- Labbé, J. C., Lee, M. G., Nurse, P., Picard, A., and Dorée, M. (1988b). Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2+*, *Nature* *335*, 251-254.
- Labbé, J. C., Picard, A., Karsenti, E., and Doree, M. (1988). An M-phase-specific protein kinase of *Xenopus* oocytes: partial purification and possible mechanism of its periodic activation, *Dev Biol* *127*, 157-69.
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffman, I. (1998). The *cdc25B* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells, *J Cell Science* *111*, 2445-2453.

- Lane, H., and Nigg, E. (1997). Cell-cycle control: POLO-like kinases join the outer circle, *Trends in Cell Biology* 7, 63-68.
- Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T-antigen., *cell* 37, 801-813.
- Lavoie, J. N., Rivard, N., L'Allemain, G., and Pouyssegur, J. (1996). A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry, *Prog Cell Cycle Res* 2, 49-58.
- Leclerc, V., and Leopold, P. (1996). The cyclin C/CDK8 kinase. In *Prog. Cell Cycle Res.*, L. Meijer, S. Guidet, and L. Vogel, eds. (New York, USA, Plenum Press), pp. 197-216.
- Leclerc, V., Tassan, J. P., O'Farrell, P. H., Nigg, E. A., and Leopold, P. (1996). *Drosophila* Cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with the large subunit of RNA Polymerase II., *Mol Biol Cell* 7, 505-513.
- Lee, K. M., Saiz, J. E., Barton, W. A., and Fisher, R. P. (1999). Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs), *Curr Biol* 9, 441-4.
- Lee, M., Reynisdottir, I., and Massagué, J. (1995). Cloning of p57Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution, *Genes & Dev* 9, 639-649.
- Lee, M. G., and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*, *Nature* 327, 31-35.
- Lee, M. S., Enoch, T., and Piwnica-Worms, H. (1994). *mik1+* encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15, *J Biol Chem* 269, 30530-7.
- Levin, D. E., and Bishop, J. M. (1990). A putative protein kinase gene (*kin1+*) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8272-6.
- Lew, D. J., and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control, *Curr Opin Cell Biol* 8, 795-804.
- Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P. T., Slamon, D. J., Arceci, R., Lu, L., and Dai, W. (1996). Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas, *J Biol Chem* 271, 19402-8.
- Li, C. Y., Suardet, L., and Little, J. B. (1995). Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF- β cyto inhibitory effect., *J Biol Chem* 270, 4971-4974.
- Liu, F., Stanton, J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H. (1997). The human myt kinase preferentially phosphorylates cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex., *Mol Cell Biol* 17, 571-583.

- Liu, M., Lee, M.-H., Cohen, M., Bommakanti, M., and Freedman, L. P. (1996). Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937., *Genes & Dev* *10*, 142-153.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., and Maller, J. L. (1988). Purification of maturation - promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events, *Proc Natl Acad Sci* *85*, 3009-3013.
- Lopez-Girona, A., Kanoh, J., and Russell, P. (2001). Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast, *Curr Biol* *11*, 50-4.
- Lopez-Girona, A. F., B. Mondesert, O. Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein [see comments], *Nature* *397*, 172-5.
- Lorenz, P., Pepperkok, R., and Pyerin, W. (1994). Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle, *Cell Mol Biol Res* *40*, 519-27.
- Lu, K. P., Hanes, S. D., and Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis, *Nature* *380*, 544-7.
- Lucibello, F. C., Truss, M., Zwicker, J., Ehlert, F., Beato, M., and Muller, R. (1995). Periodic cdc25C transcription is mediated by a novel cell cycle- regulated repressor element (CDE), *Embo J* *14*, 132-42.
- Lundgren, K., Walworth, R., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). mik1 and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2., *Cell* *45*, 145-153.
- Ma, Z. Q., Chua, S. S., DeMayo, F. J., and Tsai, S. Y. (1999). Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over- expressing human cdc25B [In Process Citation], *Oncogene* *18*, 4564-76.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage, *Science* *288*, 1425-9.
- Maity, A., McKenna, W. G., and Muschel, R. J. (1995). Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells, *Embo J* *14*, 603-9.
- Marcote, M., Knighton, D., Basi, G., Sowadski, J., Brambilla, P., Draetta, G., and Taylor, S. (1993). A three dimensional model of the cdc2 protein kinase: Localization of cyclin- and suc1-binding regions and phosphorylation sites, *Mol Cell Biol* *13*, 5122-5131.
- Masui, Y., and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes, *J Exp Zool* *177*, 129-45.

Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase, *Science* 282, 1893-7.

Mattaj, I. W., and Englmeier, A. (1998). Nucleo-cytoplasmic transport: the soluble phase, *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.

McCully, E. K., and Robinow, C. F. (1971). Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy, *J Cell Sci* 9, 475-507.

McGowan, C. H., and Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15, *Embo J* 12, 75-85.

Mercer, W. E. (1998). Checking on the cell cycle, *J Cell Biochem Suppl* 31, 50-4.

Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C., Su, L., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases, *EMBO J* 11, 2909-2917.

Millar, J., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., and Russell, P. (1991a). p55 cdc25 is a nuclear phosphoprotein required for the initiation of mitosis in human cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10500-10504.

Millar, J., McGowan, C., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991b). p80^{cdc25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{cdc2} in fission yeast, *EMBO J* 10, 4301-4309.

Millar, J., and Russell, P. (1992). The cdc25 M-Phase Inducer: An unconventional protein phosphatase, *Cell* 68, 407-410.

Mils, V., Baldin, V., Goubin, F., Pinta, I., Papin, C., Waye, M., Eychene, A., and Ducommun, B. (2000). Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase, *Oncogene* 19, 1257-65.

Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2001). Mitosis: a history of division, *Nat Cell Biol* 3, E17-21.

Miyata, H., Doki, Y., Shiozaki, H., Inoue, M., Yano, M., Fujiwara, Y., Yamamoto, H., Nishioka, K., Kishi, K., and Monden, M. (2000). CDC25B and P53 are independently implicated in radiation sensitivity for human esophageal cancers., *Clinical Cancer Research* 6, 4859-65.

Miyata, H., Doki, Y., Yamamoto, H., Kishi, K., Takemoto, H., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., Inoue, M., Shiozaki, H., *et al.* (2001). Overexpression of CDC25B overrides radiation-induced G2-M arrest and results in increased apoptosis in Esophageal cancer cells., *Cancer Research* 61, 3188-3193.

Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G. F. (2000). Human CDC25A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis, *EMBO reports* 1, 71-79.

Mongay, L., Plaza, S., E., V., C., S.-P., and J., V. (2001). Association of the cell cycle regulatory proteins P45SKP2 and CKsHs1. functional effect on CDK2 complex formation and kinase activity, *JBC* 276, 25030-36.

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation, *Nature* 374, 131-134.

Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure., *Curr Opin Cell Biology* 8, 767-72.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-Dependent Kinases: engines, clocks and microprocessors, *annuRevCellDevBiol* 13, 261-291.

Moroianu, J. (1998). Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin β family, *Journal of cellular biochemistry* 70, 231-9.

Moroianu, J. (1999). Nuclear import and export pathways, *Journal of cellular biochemistry Supplements* 32/33, 76-83.

Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1995). Myt1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15, *Science* 270, 86-90.

Muller, S. J., and Cardonna, S. (1993). Cell cycle regulation of a human cyclin-like gene encoding uracil-DNA glycosylase, *J Biol Chem* 268, 1310-1319.

Murray, A. (1994). Cell cycle checkpoints, *Curr Opin Cell Biol* 6, 872-876.

Murray, A., and Hunt, T. (1993). *The cell cycle* (New York, W.H. Freeman and company).

Murray, A. W., and Marks, D. (2001). can sequencing shed light on cell cycling?, *nature* 409, 844-846.

Muslin, A. J., and Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference, *Cell Signal* 12, 703-9.

Nagata, A., Igarashi, M., Jinno, S., Suto, K., and Okayama, H. (1991). An additional homolog of the fission yeast cdc25 gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells, *The new Biologist* 3, 959-968.

Nefsky, B., and Beach, D. (1996). Pub1 acts as an E6-AP-like protein ubiquitin ligase in the degradation of cdc25, *EMBO J* 15, 1301-1312.

Newmeyer, D. D., and Forbes, D. J. (1988). nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation., *Cell* 52, 641-653.

Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication, *Mol Cell Biol* 18, 629-43.

Nigg, E. A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish, *Curr Opin Cell Biol* 10, 776-83.

- Nilsson, I., and Hoffman, I. (1999). Cell cycle regulation by the cdc25 phosphatase family. In *Prog. Cell Cycle Res.*, L. Meijer, A. Jézéquel, and B. Ducommun, eds. (New York, USA, Plenum Press), pp. In press.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994). Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression, *J Biol Chem* 269, 6320-4.
- Nishioka, K., Doki, Y., Shiozaki, H., Yamamoto, H., Tamura, S., Yasuda, T., Fujiwara, Y., Yano, M., Miyata, H., Kishi, K., *et al.* (2001). Clinical significance of CDC25A and CDC25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus., *Br J Cancer* 85, 412-21.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast, *Nature* 256, 457-51.
- O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation, *Embo J* 16, 545-54.
- Orr-Weaver, T. L., and Weinberg, R. A. (1998). A checkpoint on the road to cancer, *Nature* 392, 223-224.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelierie, F., and Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export, *Science* 278, 141-4.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle, *EMBO J* 11, 961-971.
- Paris, J., LeGuelllec, R., Couturier, A., LeGuelliec, K., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill, S., and Philippe, M. (1991). Cloning by differential screening and characterization of a *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2., *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1039-1043.
- Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., Lee, M. S., Ogg, S., Falk, J. L., Swenson, K. I., and Piwnica-Worms, H. (1991). Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner, *Embo J* 10, 1255-63.
- Patel, R., Holt, M., Philipova, R., Moss, S., Schulman, H., Hidaka, H., and Whitaker, M. (1999). Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells, *J Biol Chem* 274, 7958-68.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R. S., Byrnes, M. J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M. T., and Piwnica-Worms, H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding, *Cell Growth Differ* 9, 197-208.

- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14.3.3 protein binding by phosphorylation of CDC25C on Serine-216, *Science* 277, 1501-1505.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view, *Biochem J* 308, 697-711.
- Pines, J. (1996). Cell Cycle: reaching for a role for the CKS proteins., *Current Biology* 6, 1399-1402.
- Polyak, K., Lee, M., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J., Tempst, P., and Massagué, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a Cyclin-Dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals, *Cell* 78.
- Poon, R. Y., Chau, M. S., Yamashita, K., and Hunter, T. (1997). The role of Cdc2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells, *Cancer Res* 57, 5168-5178.
- Raleigh, J. M., and O'Connell, M. J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both wee1 and cdc25, *J Cell Sci* 113, 1727-36.
- Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., and Noel, J. P. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent, *Cell* 89, 875-86.
- Rhind, N., Furnari, B., and Russell, P. (1997). Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast, *Genes Dev* 11, 504-11.
- Rhind, N., and Russell, P. (1998). Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol Cell Biol* 18, 3782-7.
- Rice, R. L., Rusnak, J. M., Yokokawa, F., Yokokawa, S., Messner, D. J., Boynton, A. L., Wipf, P., and Lazo, J. S. (1997). A targeted library of small-molecule, tyrosine, and dual-specificity phosphatase inhibitors derived from a rational core design and random side chain variation, *Biochemistry* 36, 15965-15974.
- Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P., and Reed, S. I. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34cdc28/cdc2- associated protein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *Genes and Devel* 4, 1332-1334.
- Richardson, W. D., Mills, A. D., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1988). nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores., *Cell* 52, 655-664.
- Robbins, J., Dilworth, S., Laskey, R., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence, *Cell* 64, 615-623.
- Roberts, B. (1989). nuclear location signal-mediated protein transport, *Biochim Biophys Acta* 1008, 263-280.

- Roberts, B., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1987). The effect of protein context on nuclear location signal function, *Cell* 50, 465-475.
- Rommel, C., and Hafen, E. (1998). Ras--a versatile cellular switch, *Curr Opin Genet Dev* 8, 412-8.
- Roshak, A. K., Capper, E. A., Imburgia, C., Fornwald, J., Scott, G., and Marshall, L. A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase, *Cell Signal* 12, 405-11.
- Rotman, G., and Shiloh, Y. (1999). ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress, *Oncogene* 18, 6135-44.
- Russell, P., and Nurse, P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast, *Cell* 45, 145-153.
- Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog, *Cell* 49, 559-567.
- Russo, G. L., Vandenberg, M. T., Yu, I. J., Bae, Y. S., Franza, B. R., Jr., and Marshak, D. R. (1992). Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle, *J Biol Chem* 267, 20317-25.
- Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., and Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5139-5143.
- Saha, P., Eichbaum, Q., Silberman, E. D., Mayer, B. J., and Dutta, A. (1997). p21 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases., *Mol Cell Biol* 17, 4338-4345.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25, *Science* 277, 1497-1501.
- Sasaki, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Tanahashi, M., Moriyama, S., Nakashima, Y., Fukai, I., Kiriya, M., Yamakawa, Y., and Fujii, Y. (2001). Expression of the cdc25B gene as a prognosis marker in non-small cell lung cancer, *Cancer Lett* 173, 187-92.
- Schreiber, J., Molinete, M., Boeuf, H., De murcia, G., and Menissier-de murcia, J. (1992). The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity, *EMBO J* 11, 3263-9.
- Schulman, H. (1993). The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases, *Curr Opin Cell Biol* 5, 247-53.
- Sergere, J. C., Thuret, J. Y., Le Roux, G., Carosella, E. D., and Leteurtre, F. (2000). Human CDK10 gene isoforms, *Biochem Biophys Res Commun* 276, 271-7.

- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., and Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH, *Nature* 374, 280-2.
- Serrano, M., Hannon, G., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4, *Nature* 366, 704-708.
- Sert, V., Cans, C., Tasca, C., Bret-Bennis, L., Oswald, E., Ducommun, B., and De Rycke, J. (1999). The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks, *Oncogene In press*.
- Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W., and Lu, K. P. (1998). The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins, *Genes Dev* 12, 706-20.
- Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins, *TIBS* 20, 187-190.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [published erratum appears in *Genes Dev* 2000 Mar 15;14(6):750], *Genes & Development* 14, 289-300.
- Silver, P., Chiang, A., and Sadler, I. (1988). Mutations that alter both localization and production of a yeast nuclear protein, *Genes Dev* 2, 707-717.
- Solomon, M. J., Lee, T., and Kirschner, M. K. (1992). The role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase., *Mol Biol Cell* 3, 13-27.
- Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J. P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J. C., and Lamb, N. J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis, *J Biol Chem* 269, 5989-6000.
- Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human cdc25 protein., *Nature* 351, 242-244.
- Stukenberg, P. T., and Kirschner, M. W. (2001). Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in CDC25., *Molecular Cell* 7, 1071-83.
- Takemasa, I., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ohue, M., Noura, S., Miyake, Y., Matsumoto, T., Aihara, T., Tomota, N., Tamaki, Y., *et al.* (2000). Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of Human Colorectal Carcinoma., *Cancer Research* 60, 3043_50.
- Tang, D., and Wang, J. H. (1996). Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuron-specific Cdk5 activators, *Prog Cell Cycle Res* 2, 205-16.

Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S., and Okayama, H. (1995). Requirement for tyrosine phosphorylation of CDK4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation., *Nature* 376, 358-362.

Tiefenbrun, N., Melamed, D., Levy, N., Resnitzky, D., Hoffman, I., Reed, S. I., and Kimchi, A. (1996). Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest, *Mol Cell Biol* 16, 3934-44.

Torok, K., Wilding, M., Groigno, L., Patel, R., and Whitaker, M. (1998). Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis, *Curr Biol* 8, 692-699.

Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint, *Embo J* 17, 2728-35.

Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F- induced S phase, *Mol Cell Biol* 19, 6379-95.

Vincent, I., Bu, B., Hudson, K., Husseman, J., Nochlin, D., and Jin, L. (2001). Constitutive Cdc25B tyrosine phosphatase activity in adult brain neurons with M phase-type alterations in Alzheimer's disease, *Neuroscience* 105, 639-50.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network, *Nature* 408, 307-10.

Vousden, K. H., and Woude, G. F. (2000). The ins and outs of p53, *Nat Cell Biol* 2, E178-80.

Walworth, N., Davey, S., and Beach, D. (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checpoint pathway to cdc2., *Nature* 363, 368-371.

Wegener, S., Hampe, W., Hermann, D., and Schaller, H. (2000). Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C., *Eur J Cell Biol* 11, 810-5.

Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus, *Cell* 82, 463-73.

Xu, X., and Burke, S. P. (1996). Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of Human cdc25, *J Biol Chem* 271, 5118-5124.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gambelin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997b). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity, *Cell* 91, 961-71.

Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., *et al.* (1997a). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism, *Science* 278, 1957-60.

- Yang, J., Bardes, E. S. G., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., and Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1, *Genes Dev* 12, 2131-2143.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the xenopus oocyte: a role for 14.3.3 mediated inhibition of Cdc25 nuclear import, *EMBO J* 18, 2174-2183.
- Yankulov, K. Y., and Bentley, D. L. (1997). Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIF, *Embo J* 16, 1638-46.
- Yao, Y., Slosberg, E. D., Wang, L., Hibshoosh, H., Zhang, Y. J., Xing, W. Q., Santella, R. M., and Weinstein, I. B. (1999). Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV- Cdc25B transgenic mice, *Oncogene* 18, 5159-66.
- Zeng, Y., Forbes, K. C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnicka-Worms, H., and Enoch, T. (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1 [In Process Citation], *Nature* 395, 507-10.
- Zheng, X. F., and Ruderman, J. V. (1993). Functional analysis of the P box, a domain in cyclin B required for the activation of Cdc25, *Cell* 75, 155-164.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature* 408, 433-9.
- Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fisher, G., and Lu, K. P. (2000). Pin1-Dependent Prolyl Isomerization Regulates Dephosphorylation of CDC25C and Tau Proteins, *Molecular Cell* 6, 873-883.
- Zwicker, J., Gross, C., Lucibello, F. C., Truss, M., Ehlert, F., Engeland, K., and Müller, R. (1995). Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1, *Nucleic Acid Res* 23, 3822-3830.

ANNEXE 1

Rôle des phosphatases CDC25 dans le contrôle de la prolifération

N. Davezac, B. Ducommun *, V. Baldin

Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire du contrôle de la prolifération, université Paul-Sabatier, CNRS UMR 5088, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

Résumé

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est contrôlée par l'activation et l'inactivation séquentielle de kinases (CDKs) associées à leur sous-unité régulatrice, les cyclines. Dans les cellules de mammifères, trois phosphatases CDC25 à double spécificité (phosphotyrosine et phosphosérine/thréonine) régulent positivement ces complexes CDK/cycline et participent ainsi au contrôle du cycle cellulaire. L'activité des CDC25 est elle-même régulée par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Ces phosphatases sont également impliquées dans les mécanismes de surveillance cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN. Des anomalies de l'expression de CDC25 A et CDC25 B ont été relevées dans un certain nombre de tumeurs, indiquant que ces phosphatases pourraient avoir des propriétés oncogéniques. Ces résultats ouvrent aujourd'hui de nouvelles perspectives en thérapie antitumorale. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

cycle cellulaire / cycline / kinases dépendantes des cyclines / phosphatases CDC25

Summary – Involvement of CDC25 phosphatases in growth control.

Progression in cell cycle is controlled by CDKs (cyclin dependent kinases) and their cyclins regulatory subunits. In mammalian cells, three dual specificity phosphatases called CDC25 activate CDKs/cyclin complexes. The activity of CDC25 is regulated by phosphorylation and dephosphorylation events. CDC25 phosphatases also participate in cell cycle checkpoints activated in response to DNA damage. Two members of this family, CDC25 A and CDC25 B, have oncogenic properties, and their overexpression has been detected in various types of tumors. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

CDC25 phosphatases / cell cycle / cyclin / dependent kinases

Le cycle cellulaire correspond à une série d'événements orchestrés dont les étapes successives doivent être chronologiquement achevées. Parmi les enzymes qui régulent ces événements et assurent la progression dans le cycle cellulaire, les complexes CDK/cycline jouent un rôle prédominant [1] (figure 1). Ces complexes sont constitués d'une sous-unité catalytique, membre de la famille des

kinases dépendantes des cyclines (CDKs) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline, dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire. L'activité des kinases CDKs est régulée par deux grands mécanismes : l'association avec d'autres protéines et des réactions de phosphorylations et de déphosphorylations. Le premier mécanisme met en jeu des partenaires protéiques capables d'activer ou d'inhiber

* Correspondance et tirés à part.

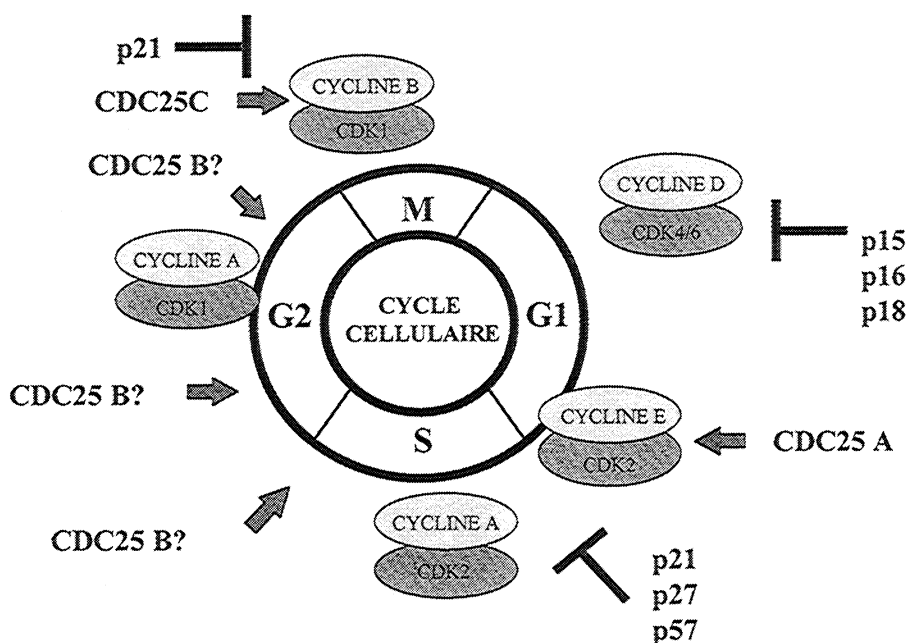


Figure 1. Contrôle du cycle cellulaire par les différents complexes CDKs/cycline. Plusieurs régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire sont indiqués sur ce schéma.

l'activité des CDKs. Ainsi, l'association des cyclines aux CDKs est un prérequis à l'activation de ces kinases. Comme le montre la *figure 1*, différentes cyclines spécifiques de phases du cycle cellulaire (par exemple, les cyclines D en G1, et la cycline B à la transition G2/M) assurent durant des périodes précises l'activation des complexes enzymatiques. À l'inverse, les CKIs (*cyclin dependant kinase inhibitors*) sont des partenaires protéiques qui peuvent inactiver ces kinases. Deux familles de CKIs ont été identifiées : l'une, regroupant les protéines p21, p27 et p57 [2-4], inhibe les différents complexes CDK/cycline et l'autre, composée de p15, p16 et p18, inhibe plus spécifiquement la formation des complexes CDK4 (CDK6)/cycline D [5]. Le second mécanisme de régulation de l'activité des CDKs implique des événements de phosphorylation et de déphosphorylation. Ils peuvent être soit activateurs, comme la phosphorylation sur un résidu thréonine conservé (Thr 161 sur CDK1 et Thr 160 sur CDK2) par une *CDK activating kinase*, la CAK [6-8] ; soit inhibiteurs, comme les phosphorylations sur la thréonine-14 et la tyrosine-15 (sur CDK1) par les kinases WEE1 et MYT1 [9-11]. À l'inverse, les phosphatases CDC25 sont responsables de la déphosphorylation des résidus tyrosine et thréonine et de l'activation des complexes CDK/cycline. Cette régulation a été particulièrement bien étudiée dans le cas de CDK1/cycline B, enzyme responsable du contrôle de l'entrée en mitose [12, 13] (*figure 1*).

Les mécanismes de régulation de la transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire sont extrêmement bien conservés au cours de l'évolution. Ainsi, CDK1 (plus connu sous le nom de CDC2 ou p34^{CDC2}) a été le premier régulateur identifié chez tous les organismes étudiés [14]. Par la suite, des études réalisées chez la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe* ont permis d'identifier également le gène CDC25 comme un acteur essentiel de la transition G2/M [15]. Des études biochimiques ont montré que CDC25 était la phosphatase responsable de la déphosphorylation de CDC2 [16]. Des homologues du gène CDC25 de la levure *S. pombe* ont été clonés chez de très nombreux eucaryotes en complémentant la perte de CDC25 endogène, révélant ainsi un haut degré de conservation de sa fonction activatrice au cours de l'évolution. Chez l'homme, il existe trois gènes CDC25 : CDC25 A, B et C [17-19]. Ces trois phosphatases présentent une grande homologie de séquence en acides aminés au niveau du site catalytique localisé dans leur partie C-terminale, tandis que leurs domaines N-terminaux diffèrent de façon importante. Cette divergence suggère que ces trois phosphatases puissent avoir des fonctions différentes dans la régulation du cycle cellulaire. L'intérêt majeur accordé à ces phosphatases vient également du fait qu'elles pourraient jouer un rôle dans la prolifération anarchique des cellules puisque certains homologues humains de CDC25 présentent des propriétés oncogéniques *in vitro* et que leur

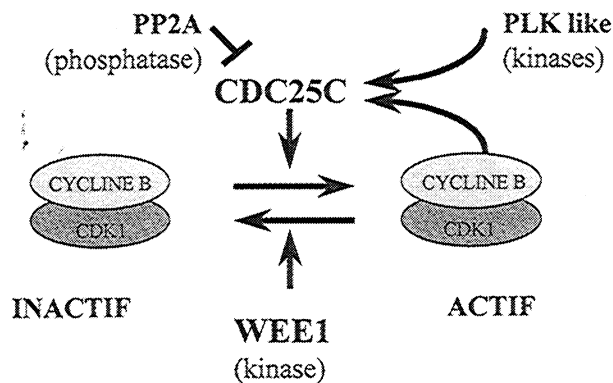


Figure 2. Régulation du complexe CDK1/cycline B à la transition G2/M. Intervention de différentes kinases et phosphatase pour la régulation de l'activité de CDC25 C.

expression est dérégulée dans certaines tumeurs. Dans cette revue, nous résumerons les connaissances actuelles sur les phosphatases CDC25, puis nous présenterons les perspectives actuelles qu'ouvre une meilleure connaissance de leurs fonctions et de leurs régulations dans le contrôle de la prolifération normale et cancéreuse.

LES PHOSPHATASES CDC25

Identification des différentes CDC25

L'identification initiale de régulateurs du cycle cellulaire chez des levures modèles comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* a rapidement permis la recherche de leurs homologues dans d'autres organismes. La première phosphatase humaine, CDC25 C, a été isolée à partir d'une banque d'ADNc de cellules HeLa par la technique de la PCR (*polymerase chain reaction*), en utilisant des oligonucléotides dégénérés dérivés de régions très conservées entre les protéines CDC25 de levure et de drosophile. Un test de complémentation fonctionnelle, réalisé dans une souche de levure *S. pombe* déficiente de manière thermosensible pour la fonction de CDC25, a permis de montrer que cette protéine humaine était capable de remplacer la fonction altérée de CDC25 de levure [15]. Grâce à l'utilisation de la PCR, les protéines CDC25 A et B ont également été identifiées à partir d'une banque d'ADNc provenant d'un tératocarcinome humain. Plus récemment, nous avons montré qu'il existe au moins trois variants de la protéine CDC25 B (B1, B2 et B3), résultant de l'épissage alternatif du même pré-ARN messager [20]. Enfin, une autre équipe a montré qu'il existe deux autres variants d'épissage : CDC25 B4 et CDC25 B5 [21].

Dans les cellules humaines, la localisation chromosomique des trois gènes CDC25 par la technique FISH (*fluorescence in situ hybridization*) positionnent CDC25 C dans la région 5q31 [22], CDC25 A dans la région 3p21 et CDC25 B dans la région 20p13 [23].

De nombreuses observations montrent que les phosphatases humaines CDC25 semblent intervenir à des moments différents du cycle cellulaire. Des études biochimiques indiquent que le complexe CDK1/cycline B est un substrat de la phosphatase CDC25 C, impliquant donc cette phosphatase dans le contrôle de la transition G2/M [24]. Des expériences de micro-injection, dans des cellules HeLa, d'anticorps dirigés contre la phosphatase CDC25 C inhibent l'entrée des cellules en mitose confirmant donc cette hypothèse. Des travaux similaires ont été réalisés avec la phosphatase CDC25 A : la micro-injection d'anticorps anti-CDC25 A provoque une inhibition de la synthèse d'ADN, impliquant donc cette phosphatase à la transition G1/S [25, 26]. Ce résultat a été conforté par le fait qu'un mutant de CDC25 A (C430A) dépourvu d'activité catalytique est capable d'interagir fortement avec les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A [27] (*figure 1*). Les données concernant CDC25 B sont plus contradictoires. Des travaux ont suggéré que CDC25 B serait la cible du complexe CDK1/cycline B impliqué dans la dynamique des microtubules observée en prophase [28]. Des travaux plus récents, effectués sur des cellules HeLa synchronisées, puis transfectées par des oligonucléotides antisens de CDC25 B, montrent une inhibition de la progression en phase S, suggérant que cette phosphatase puisse jouer un rôle dans cette phase du cycle [29]. L'absence de convergence des résultats obtenus soulève un certain nombre de questions. Le rôle des phosphatases CDC25 B est-il redondant au cours du cycle cellulaire faisant donc intervenir un membre de cette famille plusieurs fois ? Pourrait-il exister un relais des activités des variants d'épissage de la phosphatase CDC25 B au cours des phases S et G2 ? Enfin, l'interaction avec d'autres molécules joue-t-elle un rôle dans la modulation de leur activité et/ou de leur localisation subcellulaire et donc dans le déroulement du cycle cellulaire ? De récents travaux ayant trait à la localisation subcellulaire des variants de CDC25 B ont été réalisés [30, 31] et la divergence des résultats obtenus augmente la méconnaissance fonctionnelle des isoformes de CDC25 B.

Régulation de l'activité des phosphatases CDC25 par phosphorylation

L'activité des phosphatases CDC25 est régulée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation impliquant un certain nombre d'enzymes.

Différentes kinases interviennent dans la régulation de l'activité des phosphatases CDC25. Le complexe CDK1/cycline B est l'un des premiers régulateurs de l'activité phosphatase CDC25 C mis en évidence. Des expériences réalisées *in vitro* ont permis, d'une part, de confirmer que la cible de CDC25 C est le complexe CDK1/cycline B et, d'autre part, de révéler qu'en retour ce complexe est capable de phosphoryler CDC25 C. Cette phosphorylation/activation de l'enzyme par son substrat représente donc une véritable boucle d'auto-amplification jouant un rôle clef dans le contrôle de l'activation de l'entrée en mitose [24]. Par ailleurs, l'inactivation de CDC25 C semble impliquer sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A [32]. En ce qui concerne CDC25 A, il a été montré que son taux protéique ne varie pas significativement au cours du cycle cellulaire mais que son activité phosphatase est faible en phase G1 et augmente à la transition G1/S. Cette augmentation d'activité a également été reliée à un événement de phosphorylation par le complexe CDK2/cycline E, permettant de proposer, comme pour CDC25 C, l'existence d'une boucle d'auto-amplification [26]. Il n'existe que peu d'indications sur les modalités de régulation de la phosphatase CDC25 B ; son activité pourrait cependant être liée à son état de phosphorylation [33].

Chez le xénope, la régulation de l'activité de CDC25 implique également une autre kinase, la polo-kinase (PLX1) [34], dont les homologues sont retrouvés dans la majorité des cellules eucaryotes. Chez les mammifères, il existe notamment trois kinases apparentées : PLK1, PRK/FNK et SNK [35]. PLX1 phosphoryle CDC25 sur des résidus sérine et thréonine spécifiques. Cette phosphorylation active CDC25 à un niveau comparable à celui observé dans des extraits mitotiques [34]. L'immunodéplétion de PLX1 dans des extraits d'œufs de xénope supprime l'hyperphosphorylation de CDC25 C et l'activation du complexe CDK1/cycline B [36]. L'activité de l'homologue humain de PLX1, PLK1 est concomitante à celle du complexe CDK1/cycline B à la transition G2/M [37]. Cependant, bien que l'activité de PLK1 soit nécessaire pour la maturation fonctionnelle des centrosomes en fin de phase G2 et en début de prophase [38], il n'est pas certain que PLK1 régule elle-même l'activité de CDC25 C dans les cellules humaines. L'activation de PRK/FNK, un membre apparenté à la famille *polo-like kinase*, pourrait être responsable de la régulation de l'activité phosphatase de CDC25 C [38].

En 1998, une autre protéine kinase capable de phosphoryler CDC25 C humaine sur la sérine 216 a été découverte. Cette kinase, appelée C-TAK1 (*CDC twenty five C associated kinase*), doit son nom à sa capacité à interagir physiquement avec

CDC25 C [39]. La phosphorylation de la sérine 216 de CDC25 C permet sa liaison aux protéines de la famille 14-3-3. Ces complexes sont présents durant toute l'interphase, puis disparaissent en mitose parallèlement à la déphosphorylation de cette sérine [39]. La phosphorylation de CDC25 C par C-TAK1 sur la sérine 216 a été démontrée *in vitro*, et des cotransfections dans des cellules Cos-7 de CDC25 C (sauvage ou mutée sur la sérine 216) avec C-TAK1 l'ont confirmée [39]. C-TAK1 est une protéine ubiquitaire constitutivement active au cours du cycle cellulaire. L'hypothèse selon laquelle cette enzyme phosphorylerait pendant l'interphase la majorité de CDC25 C, et la rendrait ainsi inactive par un mécanisme pouvant impliquer la liaison aux protéines 14-3-3, prédomine [39].

La kinase RAF serait également impliquée dans la régulation de l'activité des phosphatases CDC25 A et B. En effet, des études biochimiques, qui n'ont cependant pas été confirmées, ont révélé que dans des immunoprécipités de CDC25 A, réalisés à partir d'extraits d'ovocytes de xénope ou de cellules HeLa, la protéine kinase RAF est associée à la phosphatase CDC25 A. Des expériences de phosphorylation *in vitro* suggèrent que CDC25 A et B puissent être des substrats de la kinase RAF et que cette phosphorylation puisse participer à l'activation de ces phosphatases [40].

Comme le montrent ces différents travaux, les phosphatases CDC25 sont soumises à l'action de différentes enzymes qui régulent leur activité phosphatase. Il est vraisemblable que ces modifications post-traductionnelles (ou d'autres restant à identifier) puissent aussi être nécessaires à la reconnaissance de partenaires et/ou de substrats.

L'intervention de multiples régulateurs indique que les activités des phosphatases CDC25 sont étroitement contrôlées dans des contextes cellulaires précis ou en réponse à des stimuli intra- ou extracellulaires.

Régulation de l'activité de CDC25 en réponse à des dommages à l'ADN

Les événements cruciaux de la vie d'une cellule, tels que la réplication de l'ADN ou la division cellulaire, peuvent être stoppés par des points de contrôle appelés *checkpoints*. Ces points de contrôle sont activés dans diverses situations, par exemple si les phases précédentes ne sont pas achevées ou si des dommages à l'ADN ou du cytosquelette surviennent. Bien qu'ils puissent emprunter des voies de signalisation variées et encore mal connues, ils conduisent à un arrêt du cycle cellulaire par la régulation de l'activité des complexes CDK/cycline. Chez *S. pombe*, comme dans les cellules humaines, l'arrêt

du cycle cellulaire en phase G2 induit par des dommages à l'ADN fait intervenir une phosphorylation inhibitrice de CDK1. Ainsi, après exposition à des radiations ionisantes, CDK1 est phosphorylée sur son résidu tyrosine 15 et une inhibition de son activité est observée [41]. Cet arrêt du cycle cellulaire peut être réversé par une mutation de la Tyr 15 en Phenylalanine sur CDK1 [41]. Une kinase impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN est la sérine thréonine kinase CHK1 (*checkpoint kinase 1*) [42]. CHK1 intervient dans le blocage du cycle en G2 en réponse à des dommages à l'ADN, causés par des rayons ultraviolets ou des rayonnements gamma, et a pour cible la phosphatase CDC25 chez *S. Pombe* [43] et CDC25 C dans les cellules de mammifères [44]. La phosphorylation de la sérine 216 de CDC25 C par CHK1 crée un site de reconnaissance pour les protéines de la famille 14-3-3. Par un mécanisme encore mal compris, cette phosphorylation et cette interaction conduisent à l'inactivation de la phosphatase CDC25 C [44]. Une seconde kinase est également impliquée dans le point de contrôle lié à l'achèvement de la réplication et aux dommages à l'ADN. Il s'agit de la kinase appelée CDS1 chez *S. pombe* [45] et CHK2 chez les mammifères [46]. CDS1/CHK2 phosphoryle CDC25 sur le même site que CHK1, suggérant que CDC25 C puisse ainsi empêcher l'entrée en mitose lors de dommages à l'ADN (CHK1) ou en réponse à un arrêt de la réplication (CHK2). In vitro, la kinase CHK1 phosphoryle aussi les phosphatases CDC25 A et B ; ainsi, ces deux phosphatases pourraient être également impliquées dans des mécanismes de surveillance cellulaire [44]. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la kinase C-TAK1 phosphoryle CDC25 C sur la sérine 216. Par conséquent, trois kinases phosphorylent le même site. Cette apparente redondance pourrait en fait refléter l'existence d'un niveau supplémentaire de complexité dans la régulation du contrôle de la transition G2/M. Les trois kinases pourraient avoir des substrats différents ou préférentiels in vivo, mais également être impliquées de façon constitutive ou en réponse à des modifications ou des altérations spécifiques du cycle cellulaire (dommages à l'ADN, réplication, etc.).

CDC25 A ET B : ONCOGÈNES POTENTIELS ?

Les premières études abordant cette question datent de 1995 [47] et reposent sur des résultats obtenus après cotransfection de fibroblastes murins par les ADNc des différents CDC25 humains et par HA-RAS^{G12V} (mutation activatrice du proto-oncogène RAS). Les résultats obtenus montrent une coopération entre RAS activé et CDC25 A ou B aboutissant à une immortalisation des cellules et à la

Tableau I. Augmentation de l'expression des phosphatases CDC25 dans différents types de tumeurs.

Type de tumeurs [références]	% de tumeurs présentant une expression augmentée de CDC25 A ou CDC25 B	
	CDC25 A	CDC25 B
Cancers du sein [47]		32
Carcinomes gastriques [49]	38	70
Carcinomes de la tête et du cou [50]	80	50
Lymphomes non Hodgkiniens [51]		56
Cancer du poumon [52]	60	45
Cancer du colon [53]	52 *	

* Augmentation de l'activité PTP corrélée à l'augmentation de l'expression de CDC25 A.

formation de foyers à confluence. Ces cellules sont également capables de former des colonies en agar mou, et des tumeurs lors de leur injection dans des souris nude (immunodéficientes). De plus, la transfection de CDC25 A dans des fibroblastes primaires déficients pour l'antioncogène Rb induit l'apparition de foyers de transformation et confirme le caractère oncogénique de CDC25 A. Parallèlement, les auteurs de cette première étude ont analysé l'expression des phosphatases CDC25 sur 124 tumeurs mammaires de patientes traitées entre 1972 et 1982. Les tissus normaux ou cancéreux ont été hybridés avec des ribosondes antisens de CDC25 A, B et C. Dans les tissus normaux, aucune expression de CDC25 B et C n'a été détectée. En revanche, CDC25 B est fortement exprimée dans 32 % des tissus tumoraux (tableau I). Cette surexpression de CDC25 B a été corrélée à l'augmentation de la microvascularisation de la tumeur, facteur de mauvais pronostic. La positivité de l'expression de CDC25 B est également liée au stade élevé du cancer pour lequel les atypies nucléaires sont fréquentes [47].

Une étude plus récente a montré que l'expression de CDC25 A mais aussi de CDC25 B pouvait être régulée par le proto-oncogène c-myc. En effet, des sites potentiels de liaison du facteur de transcription myc/max ont été identifiés sur le premier et le deuxième intron du gène CDC25 A (dans CDC25 B un seul site a été identifié). Bien qu'une surexpression de CDC25 A soit observée après une expression du facteur myc, aucune démonstration des effets in vivo de myc sur l'expression de CDC25 A n'a cependant été apportée [48].

À partir de ces observations, des études sur différents types de tumeurs ont été réalisées. L'analyse de lignées cellulaires de carcinomes gastriques a révélé que les niveaux d'expression de CDC25 B étaient généralement supérieurs à ceux des phosphatases CDC25 A et C, tant au niveau des ARN messagers qu'au niveau protéique. Cependant, aucune amplification ni réarrangement des gènes CDC25 n'ont été détectés [49]. L'analyse de prélèvements de carcinomes gastriques a révélé que 70 % des tumeurs exprimaient l'ARNm de CDC25 B à un plus haut niveau que les muqueuses saines correspondantes, tandis que 38 % des tumeurs surexprimaient l'ARNm de CDC25 A (*tableau I*). Par des méthodes immunohistochimiques, des cellules positives pour CDC25 B ont été détectées dans 78 % des cas, avec un fort marquage dans 49 % des cas. De plus, une corrélation entre le taux d'expression de CDC25 B, le stade et la profondeur de l'invasion de la tumeur a été mise en évidence. Ces données suggèrent que la surexpression de CDC25 B pourrait favoriser le développement et la progression des carcinomes gastriques [49].

Une autre équipe a analysé l'expression des phosphatases CDC25 dans 20 carcinomes de la tête et du cou par la technique de la RT-PCR quantitative (*reverse transcription-PCR*). Dans 80 % des tumeurs, une surexpression de CDC25 A d'un facteur 3 à 12 a été détectée par rapport aux muqueuses saines. Une surexpression de 3 à 5,5 fois de l'ARNm de CDC25 B n'a été observée que dans 50 % des cas [50] (*tableau I*).

Une quatrième étude réalisée sur 63 lymphomes non Hodgkiniens a montré que dans 56 % des cas, CDC25 B était surexprimée et que cette surexpression était fréquemment associée à une agressivité du lymphome. CDC25 A n'a été retrouvée surexprimée que dans trois tumeurs. Par ailleurs, la surexpression de CDC25 B a été corrélée à celle de c-myc. Ces résultats suggèrent que dans les lymphomes non Hodgkiniens, la surexpression de CDC25 B dont la spécificité ou non de variant reste à définir pourrait participer à la pathogénicité et coopérer avec l'oncogène c-myc dans le développement de ces tumeurs [51].

Dans des cancers du poumon, des études par RT-PCR ont montré une surexpression de l'ARNm de CDC25 A, CDC25 B et c-myc dans respectivement 60 %, 45 % et 18 % des cas. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la surexpression des ARNm de CDC25 A et B et de c-myc. De plus, dans cette étude, les auteurs ont montré que le gène CDC25 B était amplifié dans 40 % des tumeurs testées (*tableau I*) au niveau de la région 20p13 [23]. Cependant cette amplification ne peut être la cause de la surexpression observée dans 45 % des tumeurs

puisque le taux d'amplification est également de 40 % dans les tumeurs ne surexprimant pas CDC25 B [52].

Enfin, une étude a comparé l'activité nucléaire phosphatase totale sur résidus phosphotyrosine (PTP) et l'expression de CDC25 A dans des tissus épithéliaux normaux ou de cancers du colon. L'activité phosphatase nucléaire a été mesurée selon la technique « vert malachite » sur des noyaux extraits des tissus normaux ou cancéreux et un peptide synthétique phosphorylé sur tyrosine basé sur la séquence de CDC2. Dans 52 % des cancers du colon, l'activité PTP était augmentée et cette augmentation était corrélée à l'augmentation de l'expression de CDC25 A [53].

CONCLUSION

Les résultats que nous venons de présenter apportent des informations importantes quant au rôle que pourraient jouer les régulateurs du cycle cellulaire dans le contrôle de la prolifération des tissus tumoraux. De nombreux points restent cependant à clarifier, comme les rôles respectifs que pourraient jouer les variants de CDC25 B dans les processus oncogéniques, où des dérégulations de cette phosphatase ont été relevées.

Du fait de leur potentiel oncogénique, mais également de leurs propriétés essentielles de régulateurs positifs du cycle cellulaire, ces protéines pourraient également représenter des cibles thérapeutiques intéressantes pour de nouvelles approches de pharmacologie antitumorale. Outre les inhibiteurs des CDKs, qui font à l'heure actuelle l'objet de recherches avancées [54], des inhibiteurs de phosphatases sont également activement recherchés. Ainsi, des cribles visant à identifier des molécules capables d'inhiber l'activité des phosphatases CDC25 ont été proposés [55], brevetés [56] et ont déjà permis d'identifier certains inhibiteurs [57, 58]. Aussi, les axes de recherche, orientés d'une part sur l'étude fonctionnelle des phosphatases CDC25 et d'autre part sur l'identification de leurs inhibiteurs potentiels, ouvrent des perspectives nouvelles en pharmacologie du contrôle de la prolifération.

RÉFÉRENCES

- 1 Murray A, Hunt T. The cell cycle. WH Freeman and company; New York: 1993.
- 2 Harper JW, Adami G, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein CIP1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993; 75: 805-16.
- 3 Polyak K, Lee M, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts J, Tempst P, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 1994; 78: 59-66.

- 4 Lee M, Reynisdottir I, Massagué J. Cloning of p57Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; 9: 639-49.
- 5 Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* 1995; 11: 1581-8.
- 6 Fesquet D, Labbé JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, et al. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates CDC2 and other cyclin-dependent kinases (cdks) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* 1993; 12: 3111-21.
- 7 Poon RYC, Yamashita K, Adamczewski JP, Hunt T, Shuttleworth J. The CDC2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33CDK2 and p34CDC2. *Embo J* 1993; 12: 3123-32.
- 8 Solomon M, Harper J, Shuttleworth J. CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* 1993; 12: 3133-42.
- 9 Russell P, Nurse P. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 1987; 49: 559-67.
- 10 McGowan CH, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34CDC2 exclusively on Tyr15. *Embo J* 1993; 12: 75-85.
- 11 Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates CDC2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; 270: 86-90.
- 12 Millar J, McGowan C, Lenaers G, Jones R, Russell P. p80^{CDC25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{CDC2} in fission yeast. *Embo J* 1991; 10: 4301-9.
- 13 Dunphy W, Kumagai A. The CDC25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 1991; 67: 189-96.
- 14 Forsburg SL, Nurse P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 227-56.
- 15 Russell P, Nurse P. CDC25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 1986; 45: 145-53.
- 16 Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, et al. Dephosphorylation and activation of a p34CDC2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 1991; 351: 242-4.
- 17 Sadhu K, Reed SI, Richardson H, Russell P. Human homolog of fission yeast CDC25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5139-43.
- 18 Galaktionov K, Beach D. Specific activation of CDC25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 1991; 67: 1181-94.
- 19 Nagata A, Igarashi M, Jinno S, Suto K, Okayama H. An additional homolog of the fission yeast CDC25 gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *The New Biologist* 1991; 3: 959-68.
- 20 Baldin V, Cans C, Superti-Furga G, Ducommun B. Alternative splicing of the human CDC25 B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* 1997; 14: 2485-95.
- 21 Forrest AR, McCormack AK, DeSouza CP, Sinnamon JM, Tonks ID, Hayward NK, et al. Multiple splicing variants of CDC25 B regulate G2/M progression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 510-5.
- 22 Sartor H, Ehlert F, Grzeschik KH, Muller R, Adolph S. Assignment of two human cell cycle genes, CDC25 C and CCNB1, to 5q31 and 5q12, respectively. *Genomics* 1992; 13: 911-2.
- 23 Demetrick DJ, Beach DH. Chromosome mapping of human CDC25 A and CDC25 B phosphatases. *Genomics* 1993; 18: 144-7.
- 24 Hoffmann I, Clarke P, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. Phosphorylation and activation of human CDC25 C by CDC2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis. *Embo J* 1993; 12: 53-63.
- 25 Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, et al. CDC25 A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J* 1994; 13: 1549-56.
- 26 Hoffman I, Draetta I, Karsenti G. Activation of the phosphatase activity of human CDC25 A by a CDK2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *Embo J* 1994; 13: 4302-10.
- 27 Xu X, Burke SP. Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of human CDC25. *J Biol Chem* 1996; 271: 5118-24.
- 28 Gabrielli BG, De Souza CPC, Tonks ID, Clark JM, Hatward NK, Ellem KAO. Cytoplasmic accumulation of CDC25 B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Science* 1996; 109: 1081-93.
- 29 Garner-Hamrick PA, Fisher C. Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate CDC25 B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer* 1998; 76: 720-8.
- 30 Woo ES, Rice RL, Lazo JS. Cell cycle dependent subcellular distribution of CDC25 B subtypes. *Oncogene* 1999; 18: 2770-5.
- 31 Karlsson C, Katich S, Hagting A, Hoffmann I, Pines J. CDC25 B and CDC25 C differ markedly in their properties as initiators of mitosis [In Process Citation]. *J Cell Biol* 1999; 146: 573-84.
- 32 Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Dephosphorylation of CDC25 C by Type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 397-411.
- 33 Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffman I. The CDC25 B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Science* 1998; 111: 2445-53.
- 34 Kumagai A, Dunphy WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a CDC25-regulatory kinase from xenopus egg extracts. *Science* 1996; 273: 1377-80.
- 35 Lane H, Nigg E. Cell-cycle control: polo-like kinases join the outer circle. *Trends in Cell Biology* 1997; 7: 63-8.
- 36 Abrieu A, Brassac T, Galas S, Fisher D, Labbe JC, Doree M. The polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in xenopus eggs. *J Cell Sci* 1998; 111: 1751-7.
- 37 Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, Nigg EA. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of PLK1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol* 1995; 129: 1617-28.
- 38 Li B, Ouyang B, Pan H, Reissmann PT, Slamon DJ, Arceci R, et al. PRK, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J Biol Chem* 1996; 271: 19402-8.
- 39 Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes MJ, Wu Z, et al. C-TAK1 protein kinase phosphorylates human CDC25 C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 197-208.
- 40 Galaktionov K, Jessus C, Beach D. Raf1 interaction with CDC25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* 1995; 9: 1046-58.
- 41 Rhind N, Furnari B, Russell P. CDC2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev* 1997; 11: 504-11.
- 42 Walworth N, Davey S, Beach D. Fission yeast CHK1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to CDC2. *Nature* 1993; 363: 368-71.
- 43 Furnari B, Rhind N, Russell P. CDC25 mitotic inducer targeted by CHK1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 1997; 277: 1495-7.
- 44 Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, et al. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to CDK regulation through CDC25. *Science* 1997; 277: 1497-501.

- 45 Lindsay HD, Griffiths DJ, Edwards RJ, Christensen PU, Murray JM, Osman F, et al. S-phase-specific activation of CDS1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 382-95.
- 46 Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the CHK2 protein kinase. *Science* 1998 ; 282 : 1893-7.
- 47 Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, et al. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* 1995 ; 269 : 1575-7.
- 48 Galaktionov K, Chen XC, Beach D. CDC25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996 ; 382 : 511-7.
- 49 Kudo Y, Yasui W, Ue T, Yamamoto S, Yokozaki H, Nikai H, et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating CDC25 B phosphatase in human gastric carcinomas. *Jpn. J Cancer Res* 1997 ; 88 : 947-52.
- 50 Gasparotto D, Maestro R, Piccinin S, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, et al. Overexpression of CDC25 A and CDC25 B in head and neck cancers. *Cancer Research* 1997 ; 57 : 2366-8.
- 51 Hernandez S, Hernandez L, Bea S, Cazorla M, Fernandez P, Nadal A, et al. CDC25 cell cycle-activating phosphatases and c-myc expression in human non-hodgkin's lymphomas. *Cancer research* 1998 ; 58 : 1762-7.
- 52 Wu W, Fan YH, Kemp BL, Walsh G, Mao L. Overexpression of CDC25 A and CDC25 B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 4082-5.
- 53 Dixon D, Moyana T, King MJ. Elevated expression of the CDC25 A protein phosphatase in colon cancer. *Exp Cell Res* 1998 ; 240 : 236-43.
- 54 Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong J, Blow JJ, Inagaki N, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases CDC2, CDK2 and CDK5. *Eur J Biochem* 1997 ; 243 : 527-36.
- 55 Baratte B, Meijer L, Galaktionov K, Beach D. Screening for antimitotic compounds using the CDC25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34^{CDC2}/cyclin B^{CDC13} protein kinase. *Anticancer Research* 1992 ; 12 : 873-80.
- 56 Draetta G, Damagnez V, Cottarel G. 1995. Methods for identifying inhibitors of CDC25. Issued US patent 5, 443, 962 22nd Aug. 1995.
- 57 Horiguchi T, Nishi K, Hakoda S, Tanida S, Nagata A, Okayama H. Dnacin A1 and dnacin B1 are antitumor antibiotic that inhibit CDC25 B phosphatase activity. *Biochem Pharmacol* 1994 ; 48 : 2139-41.
- 58 Rice R, Rusnak JM, Yokokawa F, Yokokawa S, Messner DJ, Boynton AL, et al. A targeted library of small-molecule, tyrosine, and dual-specificity phosphatase inhibitors derived from a rational core design and random side chain variation. *Biochemistry* 1997 ; 36 : 15965-74.

ANNEXE 2

Study of the Cytotoxic Distending Toxin-Induced Cell Cycle Arrest in HeLa Cells: Involvement of the CDC25 Phosphatase

Nathalie Escalas, Noélie Davezac, Jean De Rycke,* Véronique Baldin, Raoul Mazars, and Bernard Ducommun¹

LBCMCP-CNRS, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France; and *Laboratoire Associé de Microbiologie Moléculaire, INRA-ENVT, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse, France

HeLa cells exposed to *Escherichia coli* cytolethal distending toxins (CDT) arrest their cell cycle at the G2/M transition. We have shown previously that in these cells the CDK1/cyclin B complex is inactive and can be reactivated *in vitro* using recombinant CDC25 phosphatase. Here we have investigated *in vivo* the effects of CDC25 on this cell cycle checkpoint. We report that overexpression of CDC25B or CDC25C overrides an established CDT-induced G2 cell cycle arrest and leads the cells to accumulate in an abnormal mitotic stage with condensed chromatin and high CDK1 activity. This effect can be counteracted by coexpression of the WEE1 kinase. In contrast, overexpression of CDC25B or C prior to CDT treatment prevents G2 arrest and allows most of the cells to progress through mitosis with only a low percentage of cells arrested in abnormal mitosis. The implications of these results on the biochemical nature of the CDT-induced cell cycle arrest are discussed. © 2000 Academic Press

Key Words: cytolethal distending toxin; cell cycle; checkpoint; CDC25.

INTRODUCTION

Over the past decade, bacterial toxins have played a significant role in the elucidation of various aspects of eukaryotic cell biology and there is now emerging evidence that several bacteria can interfere with the eukaryotic cell cycle machinery (reviewed in [1]). Cytolethal distending toxins (CDT) constitute a family of protein toxins that inhibit proliferation by inducing a cell cycle block at the G2/M transition [2]. This block is caused by the maintenance of the CDK1 protein kinase, the main cell cycle regulator that triggers the major changes occurring at mitosis, in an inactive tyrosine phosphorylated state [3–5]. That effect is reminiscent of the mode of action of DNA-damaging agents that stop the cells at G2/M through the activation of a

cell cycle checkpoint. However, recently we showed that CDT does not induce any DNA strand break as demonstrated by single-cell gel electrophoresis assay and by the absence of slowing down of S-phase in synchronized HeLa cells. Our results suggested that CDT is able to trigger a G2 cell cycle checkpoint that is initiated during DNA replication and that is independent of DNA damage [6].

The timing of the activation of CDK1 at mitosis is dependent on the balance between the activities of the WEE1 and MYT1 kinases and the CDC25 dual-specificity phosphatase. Upon activation, CDC25 removes the phosphates on tyrosine 15 and threonine 14 of CDK1 and thereby activates the CDK1–cyclin B complex (for review [7]). Three CDC25 phosphatases have been identified in human cells. CDC25A is present in G1 and appears to be involved in the control of the G1/S transition [8, 9]. In contrast CDC25B and CDC25C are both present in G2 and appear to be involved in the control of mitosis [10, 11]. However, they probably do not share the same role since their profile of activation and their substrates are not identical [11–13, 18, 19]. Furthermore, their intracellular localization and their stability are different [12–17].

Recently, the molecular mechanisms that lead DNA damage to the inhibition of CDK1 activation and therefore to the arrest at the G2/M transition have started to be deciphered [20]. Studies performed in yeast and in mammals have led to the identification of checkpoint kinases called CHK1 and CHK2 that are activated by unreplicated DNA and DNA damage. These kinases phosphorylate a conserved site on CDC25C (Ser 216) to create a binding site for a 14.3.3 protein that prevents CDC25 from activating CDK1–cyclin B [21–25].

The aim of our study was to investigate further the molecular mechanisms that are triggered by the CDT toxin and in particular to clarify the nature of the G2/M cell cycle arrest with regard to what is now known on the role of CDC25 phosphatase in that checkpoint. In a previous work we were able to show that CDK1/cyclin B complexes purified from CDT-treated cells could be reactivated *in vitro* using recombinant CDC25 phos-

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (33) 5 61 55 81 09. E-mail: ducommun@cict.fr.

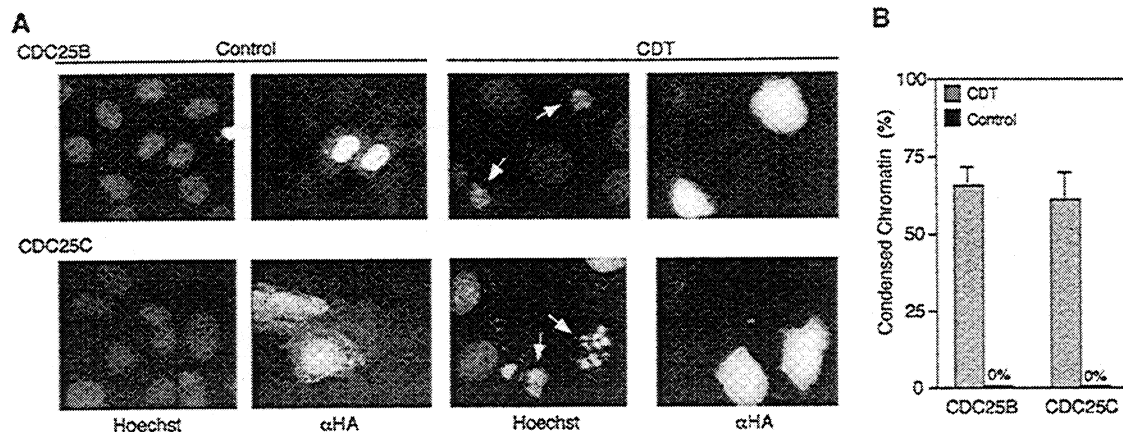


FIG. 1. Overexpression of CDC25B and CDC25C overrides CDT-induced G2 cell cycle arrest. HeLa cells were treated for 24 h with purified CDT or a control fraction and then transfected with HA-CDC25B or HA-CDC25C. (A) The cells were fixed and stained 24 h after transfection with Hoechst and with polyclonal anti-HA antibody. Note that as described previously, nuclei of CDT-treated cells are often enlarged compared to control cells [3, 6]. White arrows indicate nuclei in CDC25-treated cells. (B) The percentage of cells displaying a condensed chromatin aspect was determined. These results are the average of three independent experiments.

phatase. We therefore wanted to investigate *in vivo* the effects of the overexpression of CDC25B and CDC25C on the CDT-induced G2/M block. In this publication we show that the overexpression of CDC25 phosphatases overrides the cell cycle arrest and allows the cells to enter an abnormal mitotic stage. That effect can be reverted by the concomitant overexpression of the WEE1 inhibitory tyrosine kinase. Furthermore, we also show that overexpression of CDC25 prior to the exposure to CDT prevents cell cycle arrest in G2.

RESULTS AND DISCUSSION

Overexpression of CDC25B and CDC25C Overrides CDT-Induced G2 Cell Cycle Arrest

We recently demonstrated that the CDK1 protein kinase from CDT-treated cells could be reactivated *in vitro* using recombinant CDC25B phosphatase [6]. We therefore hypothesized that, as is the case when a G2/M cell cycle block is initiated by DNA damage (see Introduction), the CDC25 phosphatase activity would be unable to target CDK1. If true, a large overexpression of CDC25 phosphatase should overcome that effect. To examine this hypothesis we assayed the effect of the overexpression of CDC25 phosphatases on the behavior of CDT-treated cells. Asynchronous HeLa cells were exposed for 24 h to purified CDT or to a control purification fraction (see Materials and Methods for details) and then transfected with plasmids driving the overexpression of HA-epitope-tagged versions of either CDC25B or C under the control of the CMV promoter. The cells were examined by immunofluorescence microscopy 24 h after transfection. Nuclei were stained with Hoechst 33342 and transfected cells

(about 10% in a typical experiment) were detected using anti-HA polyclonal antibodies. We found that both overexpressions of CDC25B or CDC25C (Fig. 1A) caused abnormal and permanent condensation of the chromatin in CDT-treated cells. In contrast, untransfected cells, i.e., not stained with anti-HA antibodies, remained arrested in G2 with uncondensed chromatin. As shown in Fig. 1B, after 24 h about 70% of CDC25B- and CDC25C-overexpressing cells displayed a condensed nuclei aspect. In contrast, under our experimental conditions, cells that were not exposed to CDT but that were transfected with CDC25B or C did not display any sign of chromatin condensation at least until 48 h after transfection (Fig. 1).

Wee1 Reverses CDC25-Induced Chromatin Condensation in CDT-Treated Cells

As is well established, the WEE1 kinase phosphorylates and inactivates CDK1, thus counteracting the action of CDC25 phosphatases on CDK1 activation at G2/M. We wondered whether the effect we observed with CDC25 expression in CDT-treated cells was only dependent on the consequence of CDC25-induced dephosphorylation of CDK1. We therefore examined the ability of WEE1 to reverse the CDC25 effect. HeLa cells were treated with CDT for 24 h and then transfected with both CDC25C- and WEE1-expressing plasmids in 1:1 and 1:2 ratio. The phenotype of the cells was then examined after 24 h. As illustrated in Fig. 2A, increasing amount of WEE1 largely reverted the CDC25C effect with a frequency of chromatin condensation that decreased to about 10%. As shown in Fig. 2B, cotransfected cells expressed both WEE1 and CDC25C. Similar results were also obtained with

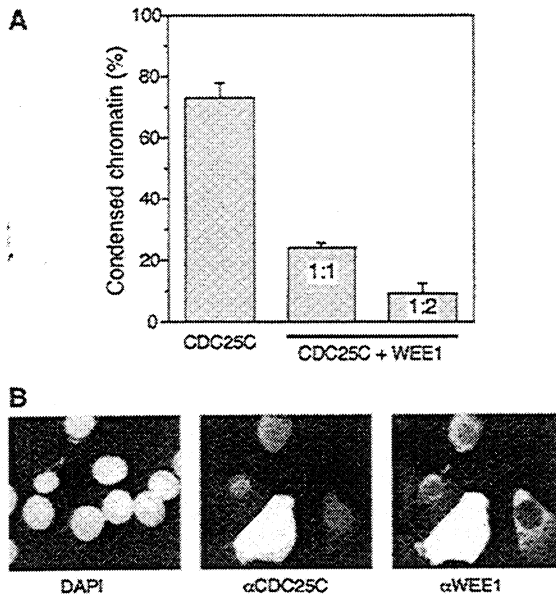


FIG. 2. Wee1 reverses CDC25-induced chromatin condensation in CDT-treated cells. HeLa cells were treated for 24 h with purified CDT or a control fraction and then transfected with both HA-CDC25C and human WEE1 in different ratios (1:1 and 1:2). The cells were fixed and stained 24 h after transfection with DAPI, monoclonal anti-HA antibody, and polyclonal anti-WEE1 antibody. (A) The percentage of cells displaying a condensed chromatin aspect was determined under each condition. These results are the average of three independent experiments. (B) Staining with DAPI, anti-CDC25C, and anti-WEE1 antibodies 24 h after transfection (1:2 ratio).

CDC25B (not shown). Thus we can conclude that condensation of the chromatin in CDT-treated cells was dependent on the dephosphorylation of CDK1 by CDC25 phosphatases.

Overexpression of CDC25C Causes CDT-Treated Cells to Enter an Abnormal Mitotic Stage

The phenotype of CDT-treated cells that overexpress HA-tagged CDC25 was further examined by immunofluorescence using several marker of mitosis. HeLa cells were treated for 24 h with CDT and then transfected with CDC25C and examined 24 h later. First, using antibodies against nuclear lamins, we found that the normal peripheral lamina staining of the CDC25C-expressing cells was absent but a bright staining of the condensed chromatin was detected. This result indicated that the nuclear envelope was probably collapsed rather than fully disrupted (Fig. 3A). Second, cells expressing CDC25C were strongly stained with the MPM2 antibody that recognizes mitotic phosphoepitopes and that is a good marker for high CDK1/cyclin B activity (Fig. 3B). In contrast, CDT-treated untransfected cells did not display any feature of mitosis. In these cells, the nuclear lamina was still present (Fig. 3A), the MPM2 staining was not exem-

plified and displayed a typical speckled pattern (Fig. 3B) [26]. Similar findings were obtained when the CDC25B phosphatase was used (not shown).

We can conclude from this set of data that upon overexpression of CDC25B or CDC25C, HeLa cells are able to bypass the CDT-induced G2 block and to enter and accumulate in an abnormal mitotic stage that cannot proceed further correctly. These observations also suggest that an additional checkpoint mechanism is activated in this situation.

Overexpression of CDC25 Prevents CDT-Induced G2 Arrest

We next examined the effect of CDT treatment on cells that have been already transfected to express either CDC25B or C. The rationale of that experiment was based on the prediction that CDC25 overexpression could buffer and prevent the inhibitory signal generated by CDT and therefore lead cells to pass the G2/M checkpoint and to proceed correctly into mitosis.

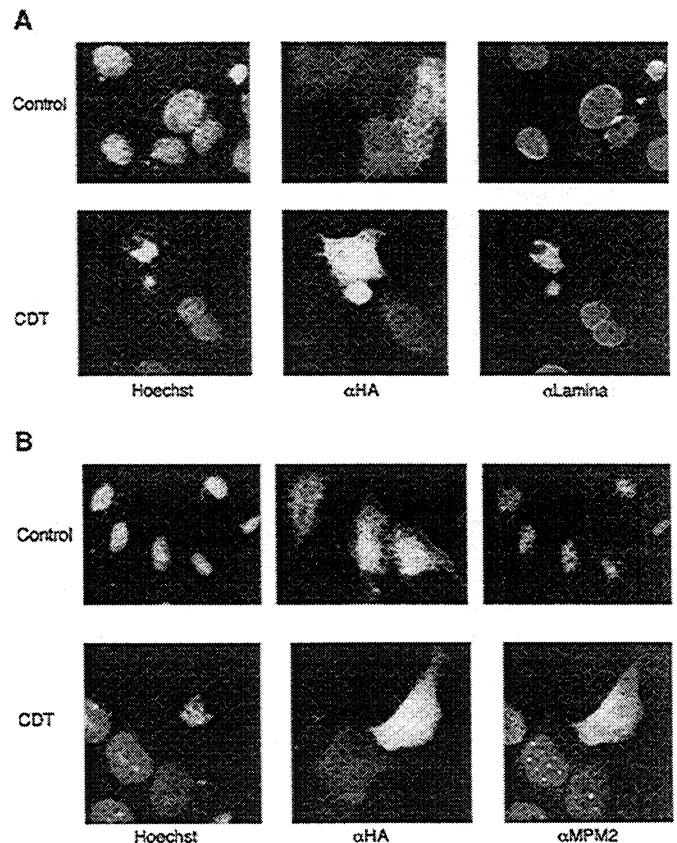


FIG. 3. Overexpression of CDC25C causes CDT-treated cells to enter an abnormal mitotic stage. HeLa cells were treated for 24 h with purified CDT or a control fraction and then transfected with HA-CDC25C. The cells were fixed and stained 24 h after transfection with Hoechst, with polyclonal anti-HA antibody to detect CDC25C, and with either anti-lamin (A) or anti-MPM2 antibodies (B).

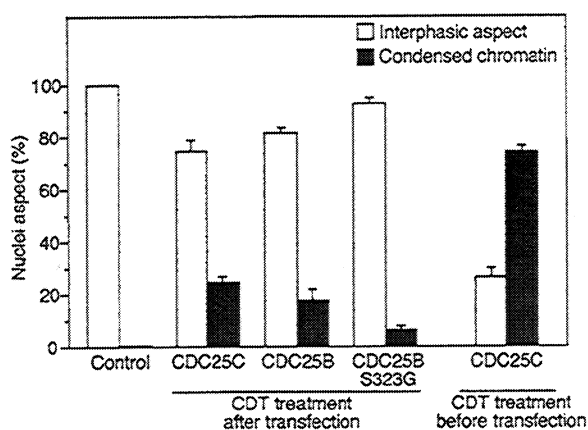


FIG. 4. Overexpression of CDC25 prevents CDT-induced G2 arrest. HeLa cells were transfected with plasmids allowing the expression of HA-CDC25C, HA-CDC25B, or the Ser 323-Gly mutant of HA-CDC25B. Cells were treated or not (control) with CDT for 24 h before or after transfection. The cells were fixed and stained with Hoechst and polyclonal anti-HA antibody. The percentage of cells displaying a interphasic aspect or an abnormal condensed chromatin aspect (see Fig. 1) was determined. These results are the average of three independent experiments.

HeLa cells were transfected and treated 24 h later with CDT or a control fraction, and the aspect of the chromatin was monitored. As shown in Fig. 4, after 24 h of treatment with CDT, most of the cells expressing CDC25B or CDC25C displayed a interphasic nuclei aspect (75% for CDC25C and 82% for CDC25B) and only about 25% displayed an abnormal condensed chromatin aspect. This percentage of condensed chromatin aspect remained low compared to what was observed when CDC25C or CDC25B were transfected after CDT treatment (see also Fig. 1). In contrast, control transfected cells (either with CDC25B or C) that were treated with the control purification fraction did not display any figure of chromatin condensation and the aspect of their nuclei remained interphasic (Fig. 4).

A similar experiment was performed with a CDC25B Ser 323-Gly mutant (a position homologous to Ser 216 in CDC25C) that does not bind 14.3.3 proteins and that is therefore proposed to be insensitive to the checkpoint activation cascade [27]. In that case the effect of CDC25B expression prior to CDT treatment was significantly more important since after 24 h 93% of the cells displayed a interphasic nuclei aspect and only 8% displayed an abnormal chromatin condensation (Fig. 4).

We therefore hypothesized that most of the transfected cells expressing CDC25B or CDC25C were able to proceed correctly into mitosis in the presence of CDT treatment. To investigate further that issue, cells transfected with vectors allowing the expression of HA-epitope-tagged versions of CDC25C, CDC25C-S216G, CDC25B, and CDC25B-S323G were treated or not for

24 h with CDT and then their cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Control cells that were not treated with CDT and that expressed or not these different constructs did not display any change in their cell cycle distribution over the duration of the experiment (Fig. 5 and data not shown). In contrast, while untransfected cells (HA-) treated with CDT were mostly arrested with a G2 DNA content, cells transfected (HA+) with CDC25C or CDC25B were mostly in G1 as if they had been able to ignore the G2/M checkpoint. This effect was even more pronounced when the CDC25C-S216G and CDC25B-S323G mutants that do not bind 14.3.3 proteins were used. In that case the cell cycle distribution was comparable to the control untreated population.

Thus, we can conclude from that set of experiments that the expression of CDC25B or C largely prevents the CDT-dependent activation of the G2/M checkpoint by providing a basal level of phosphatase that is sufficient for CDK1 activation. As also suggested by the data shown in Fig. 4, when CDC25 mutants that cannot bind to 14.3.3 are used, the effect is even clearer since in that case, the exogenous CDC25 cannot be triggered by the G2 checkpoint pathway and remains fully active thus allowing the cells to proceed into the cell cycle even in the presence of CDT.

Our current working model to support the data presented in this study is presented in Fig. 6. Under basal conditions (Fig. 6A), the CDC25B and C phosphatases are essential regulators required to activate CDK complexes at the G2/M border and to allow entry into mitosis. It has been previously shown that upon treatment with CDT, HeLa cells are arrested at the G2/M checkpoint [3] and that CDK1/cyclin B complexes isolated from these cells can be reactivated *in vitro* using recombinant CDC25B [6]. Thus it is likely, as depicted in Fig. 6B, that CDT activates an intracellular signaling cascade that leads to the functional inactivation of CDC25. Here we report that overexpression of CDC25B or C can induce these arrested cells to activate CDK1/cyclin B and to enter a condensed chromatin stage where they remain arrested. This result suggests that overexpression of CDC25 is able to overcome an established G2/M checkpoint; however, the cells that do so are not proficient to proceed correctly into mitosis and are therefore subsequently blocked in an abnormal mitotic stage (Fig. 6C). Such a result is reminiscent of the effect of ICRF193, a DNA topoisomerase II inhibitor that reveals a DNA-catenation-sensitive mitotic checkpoint [28]. In contrast, when a sufficient level of CDC25 phosphatase is provided to the cells prior to exposure to CDT, they are able to ignore the CDT-induced G2/M cell cycle checkpoint and for a majority of them to continue cycling (Fig. 6D), as if exogenous CDC25 was able to buffer the checkpoint mechanism. Only about 20% of cells were stacked with

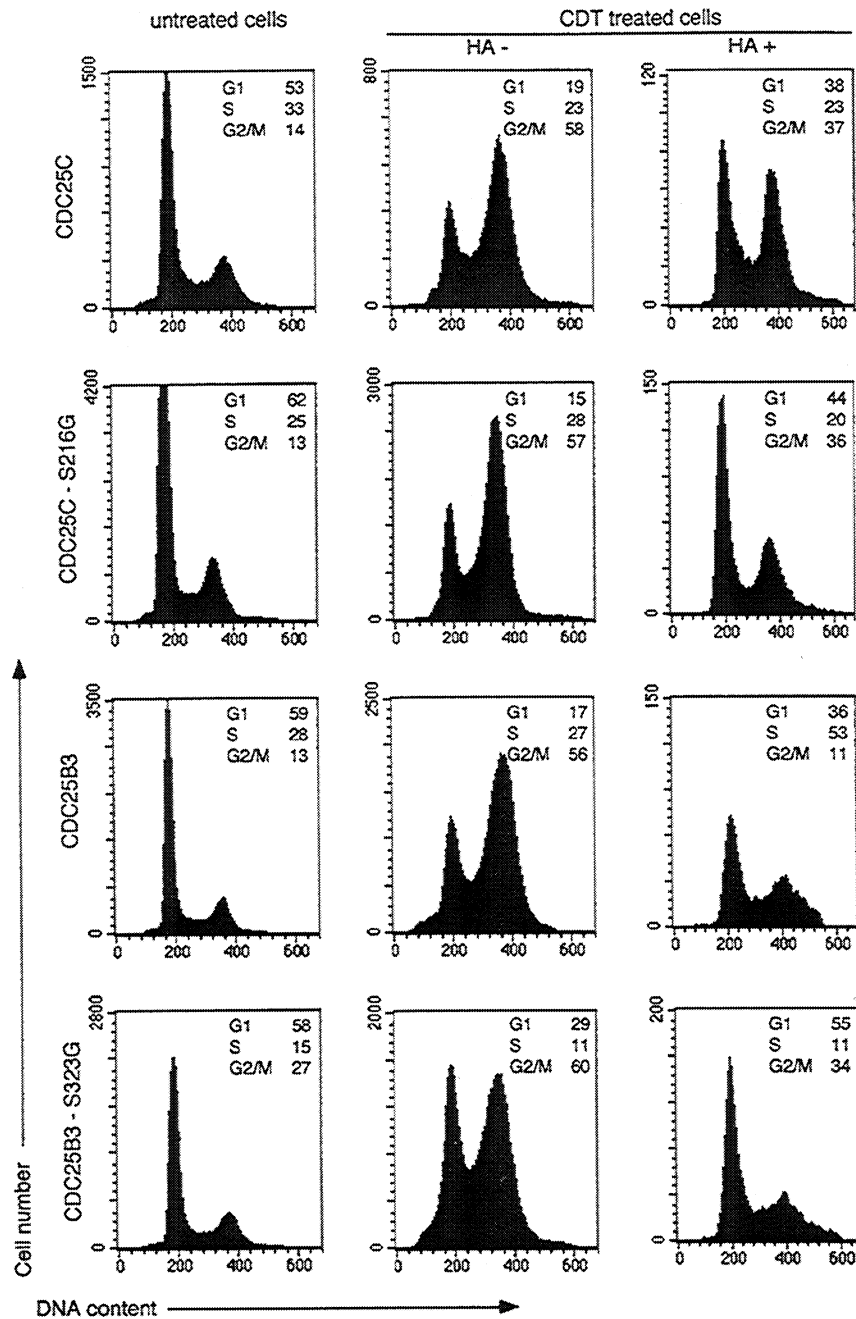


FIG. 5. Overexpression of CDC25 allows CDT-treated cells to progress in G1. HeLa cells were transfected with vectors allowing the expression of HA-tagged versions of CDC25C, CDC25C-S216G, CDC25B, and CDC25B-S323G. 24 h later, the cells were treated or not for 24 h with purified CDT and then fixed and stained with propidium iodide and monoclonal anti-HA antibody prior to the analysis by flow cytometry. The percentage of CDT-treated cells with G1, S, and G2/M DNA content was determined using the ModFit software for the transfected cells expressing CDC25 (HA+) and for the untransfected cells that do not express CDC25 (HA-). In the case of untreated cells, the whole population is shown since similar profiles are obtained for HA- and HA+ cells.

abnormal chromatin condensation, and this might represent a population that is probably arrested at the G2/M checkpoint and is subsequently targeted to an abnormal mitosis process by the high CDC25 level. In agreement with this hypothesis, we find that overex-

pression of CDC25B and C mutants that cannot be inhibited by the G2 checkpoint pathway is more efficient than overexpression of wild-type CDC25B and C at preventing CDT-dependent cell cycle arrest in G2.

Together with our previous work [6], the experi-

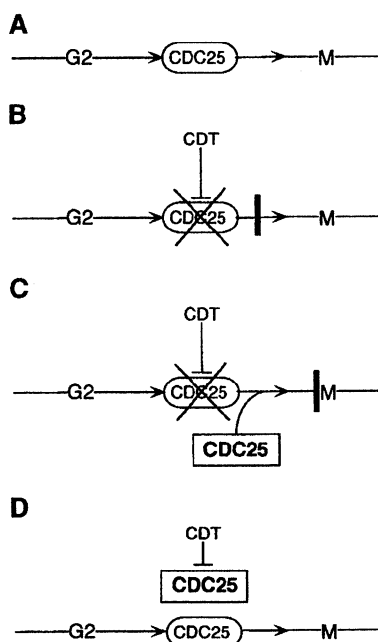


FIG. 6. Current working model. (A) Endogenous CDC25 phosphatases trigger entry into mitosis. (B) CDT arrests HeLa cells at the G2 checkpoint through the inhibition of CDC25 function. (C) Overexpression of CDC25 (rectangular box) in CDT-treated cells overrides G2 arrest but lead the cells to accumulate in mitosis with abnormal condensed chromatin. (D) Overexpression of CDC25 prior to CDT treatment prevents cell cycle arrest in G2. See text for details.

ments reported in this publication clearly indicate that the CDT bacterial toxin activates a G2/M cell cycle checkpoint that acts through the CDC25 pathway. The characterization of the molecular nature of the events that downregulate CDC25 in the absence of DNA damage is therefore a challenging prospect.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfection. HeLa cells, obtained from the American Type Culture Collection, were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Transfections were achieved using linear ethylenimin polymers (PEI) (EXGEN 500, Euromedex) according to the instructions of the manufacturer using 2 μ g of purified plasmid. The transfection efficiency was usually in the range of 10 to 15%.

CDT and control purification. CDT was produced from *Escherichia coli* DH5- α hosting recombinant plasmid pDS7-96, which contains the three open reading frames (*cdt*, *Acct*, and *cdtC*) necessary to encode CDT activity. The toxic preparation consisted in the sterile supernatant of a 24-h trypticase soy broth-aerated culture of this recombinant strain and the control nontoxic preparation was a supernatant of strain DH5- α hosting the same plasmid without insert, as previously described [29].

Immunofluorescence. Cells grown on glass coverslips were recovered, washed once with PBS, fixed in 3.7% formaldehyde in PBS at

4°C for 40 min, and then washed three times with PBS. Cells were then permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature and with a further incubation in 100% cold methanol for 10 min at -20°C. Fixed and permeabilized cells were then saturated with 1% BSA in PBS for 15 min at room temperature. The cells were then incubated for 1 h at 37°C with polyclonal anti-HA antibody (Babco) diluted 1/400 in PBS/BSA 1%. After three washes with 1% PBS/BSA, the cells were incubated with Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Molecular Probes) diluted to 1/500 in PBS/BSA 1% for 45 min at room temperature, washed in 1% PBS/BSA, and finally incubated with 1 μ g/ml Hoechst for 10 min at room temperature. Coverslips were washed with PBS and mounted in Mowiol. Monoclonal antibodies against MPM2 (Upstate Biotechnology) and polyclonal antibodies against lamins (J. C. Courvalin) were used at the concentration of 1/100. A488-conjugated goat anti-mouse and FITC-goat anti-rabbit-conjugated antibodies were used as secondary antibodies. Microscopic examinations were performed under a Leica photomicroscope. Pictures were taken on Kodak Tmax 400 films.

Plasmids. Plasmids were constructed using the pcDNA3-HA vector and wild-type or mutant CDC25B cDNA (B3 variant) and has been described elsewhere [27]. The triple HA-tag was placed in frame with the coding sequences at their amino-terminal end. The pcDNA plasmid allowing the expression of CDC25C was a generous gift of M. Molinari. The pCMV human Wee1 plasmid used in this study has previously been described [30].

Flow cytometry. HeLa cells were transfected as described above and treated 24 h latter with CDT for an additional 24 h. Cell cycle distribution was then assessed essentially as described previously [6] using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The detection of CDC25-transfected cells was performed by immunolabeling with monoclonal anti-HA antibodies 1/100 (Boehringer) using A488-conjugated anti-mouse secondary antibody 1/100 (Alexa). Collection and analysis of the cell cycle distribution for HA-positive and HA-negative cells were performed using CellQuest and the ModFit software (Becton Dickinson).

We gratefully acknowledge J. M. Darbon for critical reading of the manuscript and the members of our lab for valuable comments. We acknowledge J. C. Courvalin for antibodies, M. Molinari and N. Watanabe for plasmids, C. Tasca for production of CDT toxin, and J. P. Nougayrede for FACS analysis. This work was supported by the PRFMIP program of the French ministry of research, the CNRS, l'Université Paul Sabatier, l'Association pour la Recherche sur le Cancer and la Ligue Nationale Contre le Cancer. N.D. was a recipient of a fellowship from the French ministry of research.

REFERENCES

- Henderson, B., Wilson, M., and Hyams, J. (1998). Cellular microbiology: Cycling into the millennium. *Trends Cell Biol.* **8**, 384-387.
- Peres, S. Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J. P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J., and Oswald, E. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **24**, 1095-1107.
- Comayras, C., Tasca, C., Peres, S. Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing *cdc2* protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* **65**, 5088-5095.
- Whitehouse, C. A., Balbo, P. B., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Mirabito, P. M., and Pickett, C. L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* **66**, 1934-1940.

5. Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T., and Thelestam, M. (1999). The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *J. Clin. Invest.* **103**, 107–115.
6. Sert, V., Cans, C., Tasca, C., Bret-Bennis, L., Oswald, E., Ducommun, B., and De Rycke, J. (1999). The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene* **18**, 6296–6304.
7. Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131–134.
8. Hoffman, I., Draetta, I., and Karsenti, G. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* **13**, 4302–4310.
9. Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igashari, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13**, 1549–1556.
10. Millar, J., McGowan, C., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991). p80^{cdc25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{cdc2} in fission yeast. *EMBO J.* **10**, 4301–4309.
11. Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansoerge, W., and Hoffman, I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* **111**, 2445–2453.
12. Nishijima, H., Nishitani, H., Seki, T., and Nishimoto, T. (1997). A dual-specificity phosphatase Cdc25B is an unstable protein and triggers p34(cdc2)/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea. *J. Cell Biol.* **138**, 1105–1116.
13. Gabrielli, B. G., De Souza, C. P. C., Tonks, I. D., Clarck, J. M., Hatward, N. K., and Ellem, K. A. O. (1996). Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J. Cell. Sci.* **109**, 1081–1093.
14. Millar, J., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., and Russell, P. (1991). p55 cdc25 is a nuclear phosphoprotein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10500–10504.
15. Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J.-C., Russell, P., Fernandez, A., and Lamb, N. (1992). cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **118**, 785–794.
16. Gabrielli, B. G., Clark, J. M., McCormack, A. K., and Ellem, K. A. (1997). Ultraviolet light-induced G2 phase cell cycle checkpoint blocks cdc25-dependent progression into mitosis. *Oncogene* **15**, 749–758.
17. Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1997). Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1/cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* **272**, 32731–32735.
18. Gabrielli, B. G., Clarck, J. M., McCormack, A., and Ellem, K. A. O. (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of cdc25 regulates activity toward cyclinB1/cdc2 but not cyclin A/cdk2. *J. Biol. Chem.* **272**, 28607–28614.
19. Xu, X., and Burke, S. P. (1996). Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of Human cdc25. *J. Biol. Chem.* **271**, 5118–5124.
20. Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664–1672.
21. Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277**, 1495–1497.
22. Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H., and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell* **10**, 833–845.
23. Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14.3.3 protein binding by phosphorylation of CDC25C on Serine-216. *Science* **277**, 1501–1505.
24. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497–1501.
25. Lopez-Girona, A., Fumari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14.3.3 protein. *Nature* **397**, 172–175.
26. Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I., and Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J. Cell Biol.* **146**, 573–584.
27. Mils, V., Baldin, V., Pinta, I., Goubin, F., Papin, C., Waye, M., Eychenne, A., and Ducommun, B. (2000). Specific interaction between 14.3.3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. *Oncogene* **19**, 1257–1265.
28. Downes, C. S., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Gimenez-Abian, J. F., Creighton, A. M., and Johnson, R. T. (1994). A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells [published erratum appears in *Nature*, 1994, Dec 15;372(6507):710]. *Nature* **372**, 467–470.
29. Comayras, C., Tasca, C., Pèrès, S., Oswald, E., Ducommun, B., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin arrests HeLa cell-cycle at G2/M by preventing the cdc2 protein kinase activation. *Infect. Immun.* **65**, 5088–5095.
30. Baldin, V., Cans, C., Watanabe, N., and Ducommun, B. (1997). Evidence for a mammalian Nim1-like kinase pathway acting at the G0-1/S transition. *BBRC* **236**, 130–135.

Received December 29, 1999

Revised version received February 25, 2000

ANNEXE 3

Analyse des clones U2OS-tTA et U2OS-tTA-HACDC25B2.11G par électrophorèse bi-dimensionnelle suivie d'électrotransfert et de western blot.

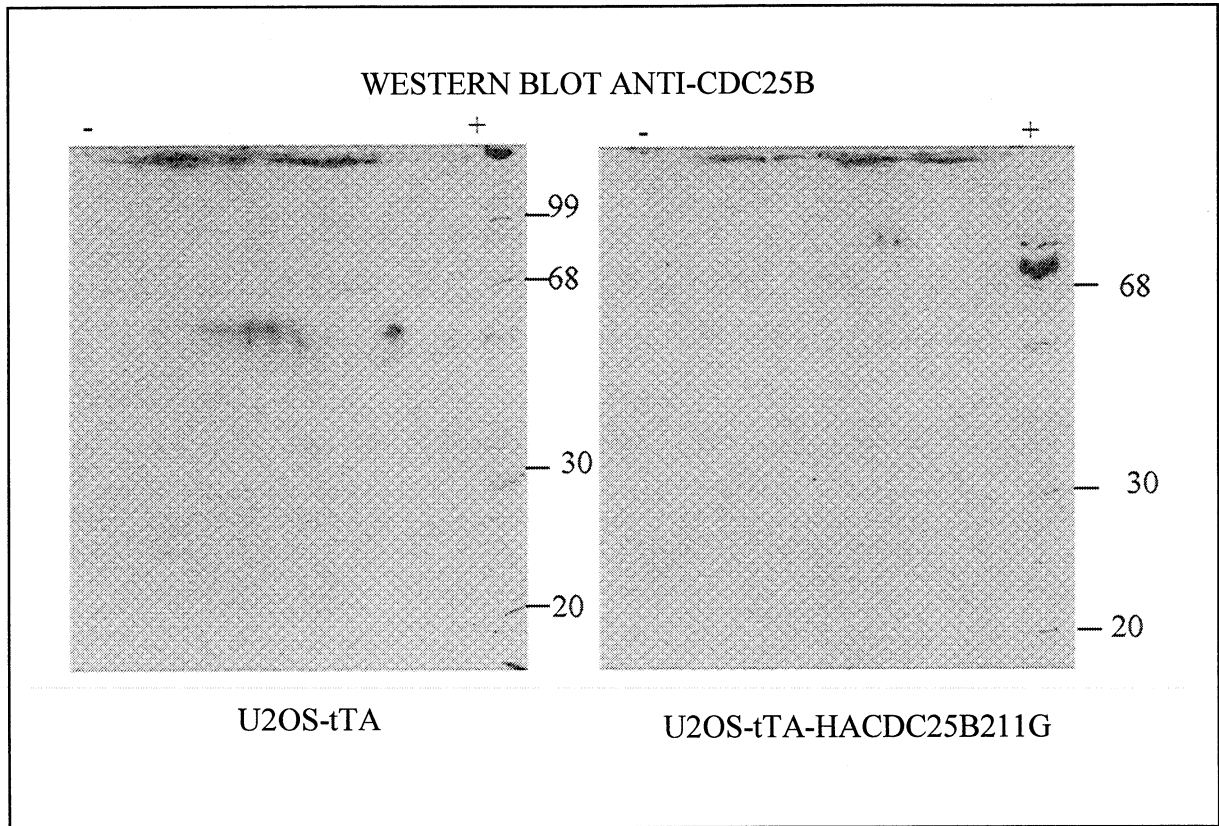
Après l'immunoprécipitation réalisée avec la matrice d'affinité anti HA, les protéines sont éluées dans des fractions de 500 µl d'un tampon glycine (glycine 100 mM, Tris 50 mM, pH=2,2) puis neutralisées par 100 µl de Tris 1M pH=8,8. Les fractions ainsi éluées sont précipitées par une solution de TCA 20% 1heure sous agitation (roue) à 4°C, puis centrifugées 30 minutes à 10000g à 4°C. Le surnageant est alors enlevé et remplacé par 1 ml d'acétone 100%. L'échantillon est à nouveau centrifugé 30 minutes à 10000 g à 4°C. Le surnageant est ôté et le culot séché.

Les culots ainsi obtenus sont resuspendus dans 120 µl d'un tampon comprenant de l'urée (7M) de la thiourée (2M) du CHAPS (4%). Les culots ainsi resuspendus sont laissés à température ambiante 4H. Puis, le tampon ampholine (pH 3-10) est rajouté (2%) le DTT (20mM) et quelques traces de bleu de bromophénol. Tous les composés sont de la gamme PlusOne commercialisée par PharmaciaBiotech.

Les strips pH=3-10 (pharmacia biotech) sont mises à réhydrater dans ces échantillons pendant douze heures dans un IPGphor Isoelectric Focusing unit sans aucune tension appliquée, puis 30 minutes à 500 volts, 3à minutes à 100 volts puis augmentation progressive du voltage jusqu'à l'obtention de 20000 voltheure.

Les strips sont ensuite équilibrées dans un tampon d'équilibration SDS (urée 6M, Tris HCl pH=6,8 50mM, glycérol 30%, SDS 1%, DTT 4mg/ml) pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation douce puis dans un tampon d'équilibration (idem que précédemment sans le DTT) contenant 45mg/ml d'iodoacétamide pendant 15 minutes sous agitation douce à température ambiante.

Les strips ainsi traitées sont déposées sur des gels acrylamide 12,5 % et la migration est réalisée à 120 volts pendant trois heures. L'electrotransfert s'effectue à



Des extraits de cellules U2OS-tTA et U2OS-tTA-HACDC25B2.11G (8 mg) ont été immunoprécipités, élués et précipités puis analysés par électrophorèse bi-dimensionnelle suivie de western blot anti-CDC25B. 100 μ g d 'extrait protéique total est analysé en parallèle.

-: cathode de la strip pH=3-10

+: anode de la strip pH=3-10

60 volts pendant 1 heure. L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps antiCDC25B C20 de Santa-Cruz (1/1000). En parallèle 100 µg d'extrait cellulaire total est analysé de la même façon.

La phosphatase CDC25B2 étiquetée HA apparaît sous deux spots qui ne sont pas détectés avec les cellules U2OS-tTA. Ces deux spots sont alignés et ne présentent pas de différence de migration électrophorétique ce qui laisse penser que l'un des deux pourrait être du à une modification post-traductionnelle. Les différents signaux qui apparaissent avec le clone U2OS-tTA ne sont pas spécifiques et on les retrouve sous une seule bande dans les extraits bruts.

ANNEXE 4

The human pEg3 kinase associates with and phosphorylates the CDC25B
phosphatase. A potential role of pEg3 in cell cycle regulation.

Noélie Davezac^{1§}, Véronique Baldin^{1§}, Joëlle Blot³, Nobuo Nomura², Bernard
Ducommun¹ and Jean-Pierre Tassan^{3*}

§. these two authors equally contributed to this work.

1. LBCMCP-CNRS UMR5088, IFR109. Université Paul Sabatier, 118 Route de
Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France.

2. Kazusa DNA Research Institute, 1532-3 Yanauchino, Kisarazu, Chiba 292,
Japan.

3. UMR6061-CNRS. IFR 97. Université de Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard.
CS34317. 35043 Rennes Cedex. France

* corresponding author

Fax: (0033) 2 99 33 62 00

Tel: (0033) 2 99 33 62 82

E-mail : Jean-Pierre.tassan@univ-rennes1.fr

Running title: pEg3 kinase a potential cell cycle regulator

Keywords: cell cycle, CDC25B, pEg3, kinase, human cells.

ABSTRACT

The pEg3 protein is a member of the evolutionary conserved KIN1/PAR1/MARK kinase family which is involved in cell polarity and microtubules dynamic. In *Xenopus*, pEg3 has been shown to be a cell cycle dependent kinase whose activity raises a maximum level during mitosis of the first embryonic cell division. CDC25B is one of the three CDC25 phosphatase genes identified in human. It is thought to regulate the G2/M progression by dephosphorylating and activating the CDK/cycline complexes. In the present paper we show that the human pEg3 kinase is able to specifically phosphorylate CDC25B *in vitro*. One phosphorylation site was identified and corresponded to serine 323. This residue is equivalent to serine 216 in human CDC25C which plays an important role in the regulation of the phosphatase during the cell cycle and in the G2 checkpoint. pEg3 is also able to specifically associate with CDC25B *in vitro* and *in vivo*. We show that the ectopic expression of active pEg3 in human U2OS cells induces an accumulation of cells in G2. This effect is counteracted by overexpression of CDC25B. Taken together these results suggest that pEg3 is a potential regulator of the G2/M progression and may act antagonistically to the CDC25B phosphatase.

INTRODUCTION

In vertebrates, the cell cycle is controlled by successive activation of cyclin-dependent kinases (CDKs). The CDK1 kinase (CDC2) is the major regulator of cell entry into mitosis and has been evolutionary conserved since it is found from yeast to human. The activity of CDK1 is controlled at multiple levels by a variety of mechanisms including subunits association and phosphorylation (Morgan, 1997). In yeast *Schizosaccharomyces pombe*, CDK1 is inhibited by phosphorylation on tyrosine 15 by the Wee1/Mik1 kinase (McGowan & Russell, 1993; Russell & Nurse, 1987). In higher eukaryotes, CDK1 is also inhibited by an additional phosphorylation on threonine 14 by the Myt1 kinase (Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995). The dual specific phosphatase CDC25 dephosphorylates and activates CDK1 (Gould & Nurse, 1989).

In human, three CDC25 genes (CDC5A, B and C) have been identified (Galaktionov & Beach, 1991; Nagata et al., 1991; Sadhu et al., 1990). CDC25A is required for entry of cells into S phase (Hoffmann et al., 1994; Jinno et al., 1994) likely by dephosphorylating G1/S specific CDK/cyclin E complexes. Both CDC25B and CDC25C are involved in the control of G2/M transition (Gabielli et al., 1996; Lammer et al., 1998; Millar et al., 1991). However functions of CDC25B and CDC25C do not overlap since the CDC25B phosphatase activity peaks prior to CDC25C. Moreover CDC25B more efficiently induces mitosis than

CDC25C (Karlsson et al., 1999). How CDC25B functions in G2/M progression is not yet clear. Until recently most of the efforts have been concentrated on the regulation of CDC25C activity.

CDC25C is the substrate for several kinases and is involved in the DNA damage induced G2 arrest. DNA damage is followed by activation of a checkpoint which delays entry into mitosis by lengthening the G2 phase. Importance of serine at position 216 (S216) in CDC25C has been highlighted. CHK1 kinase which is activated upon DNA damage phosphorylates S216 (Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997). The phosphorylated S216 residue constitutes a binding site for 14-3-3 protein (Peng et al., 1997). Binding of 14-3-3 would prevent CDC25C nuclear localisation (Dalal et al., 1999; Kumagai & Dunphy, 1999; Yang et al., 1999) then delaying CDK1/cyclin B activation and mitosis. S216 is also phosphorylated during interphase in the absence of DNA damage occurs. The C-TAK1 kinase (CDC twenty five associated kinase 1) which was shown to associate with CDC25C, *in vitro* and in cells after transfection is responsible of this phosphorylation (Peng et al., 1998; Peng et al., 1997). It is assumed that S216 phosphorylation keeps CDC25C inactive during interphase by 14-3-3 binding.

The steady state level of CDC25B fluctuates during the cell cycle (Gabrielli et al., 1996), the maximal amount of CDC25B being detected during G2/M. The CDK1/cyclin A complex phosphorylates the CDC25B protein and controls its proteasome dependent degradation (Baldin et al., 1997) hence

regulating the amount of CDC25B during the cell cycle. The phosphatase activity of CDC25B is also cell cycle dependent reaching its maximal level from S-phase to G2 phase (Lammer et al., 1998). In human three splicing variants (CDC25B1, CDC25B2 and CDC25B3) have been identified (Baldin et al., 1997) but until now only differences in the subcellular localisation of CDC25B2 and CDC25B3 have been found (Woo et al., 1999). As for CDC25C, the CDC25B phosphatase is able to associate with 14-3-3 proteins (Conklin et al., 1995; Mils et al., 2000). Indeed the sequence surrounding serine 323 (in CDC25B3 numbering) residue which corresponds to S216 in CDC25C constitutes a major 14-3-3 binding site and S323 was shown to be absolutely necessary for 14-3-3 interaction (Forrest & Gabrielli, 2001; Mils et al., 2000). 14-3-3 binding regulates the CDC25B activity (Escalas et al., 2000; Forrest & Gabrielli, 2001). The S323 residue was shown to play a crucial function in the G2 DNA-damage checkpoint. The overexpression of CDC25B mutant for S323 residue is even more effective than wild type CDC25B in overriding the G2 arrest (Forrest & Gabrielli, 2001). The S323 residue also plays a critical role for the regulation of subcellular localization of the protein, since it is required for cytoplasmic sequestration of CDC25B upon nucleocytoplasmic shuttling (Davezac et al., 2000). Another aspect of CDC25B function is its involvement in microtubule nucleation at the centrosome as shown by overexpression experiments (Gabrielli et al., 1996).

We recently described the *Xenopus* pEg3 kinase, a new member of the KIN1/PAR-1/MARK family (Blot et al., in press). In *Xenopus*, pEg3 is a cell cycle dependent protein kinase. Phosphorylation and activity of pEg3 are regulated during the cell cycle. In synchronised cultured cells, phosphorylation of pEg3 is detected as soon as G2 phase and increases until mitosis. In early embryos pEg3 is maximally active during mitosis. These results suggested that pEg3 may play a role in cell cycle regulation. It was described that C-TAK1 associates with and phosphorylates CDC25C (Peng et al., 1998). C-TAK1 and pEg3 both belong to the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. These kinases are involved in the control of cell morphology (KIN1, (Levin & Bishop, 1990), cell polarity (PAR-1, (Guo & Kemphues, 1995) and in microtubules dynamic (MARK, (Drewes et al., 1997). On the basis of sequence similarities between pEg3 and C-TAK1 on one hand, and the regulation of pEg3 during G2/M on the other hand, we hypothesised that pEg3 could interact and phosphorylate CDC25.

In this paper we show that human pEg3 kinase specifically phosphorylates CDC25B *in vitro* and associates with CDC25B both *in vivo* and *in vitro*. Moreover in human cells, the expression of human pEg3 induces an accumulation of cells in the G2 phase. This effect is counteracted by overexpression of CDC25B. These results indicate that pEg3 is involved in cell cycle control and is a negative regulator of G2/M progression. They also strongly support that pEg3 has opposite function to CDC25B.

RESULTS

pEg3 expression in HeLa cells

The human KIAA0175 cDNA (Nagase et al., 1996) codes for a protein kinase sharing 65% identity with the overall sequence of *Xenopus* pEg3 protein (Blot et al., in press, Figure 1A). We will refer to the protein encoded by KIAA0175 cDNA as human pEg3. In *Xenopus laevis*, we have previously shown that pEg3 phosphorylation and activity are regulated during the cell cycle in embryos and in synchronised cultured somatic cells (Blot et al., in press). In order to examine the pEg3 expression in human cells, a rabbit polyclonal serum (N4) was raised against the catalytic domain of the kinase. In exponentially growing HeLa cells, affinity purified N4 antibody detected several bands. The band at 45 kDa and bands with a higher than 100 kDa are non specific cross-reacting proteins. The band of 75 kDa exactly corresponded to the size calculated from pEg3 sequence (Figure 1B, lane 1). The corresponding pre-immune serum did not detect any protein in exponentially growing cells (Figure 1B, lane 6). This band of 75 kDa co-migrated with the *Xenopus* pEg3 detected with the anti-*Xenopus* pEg3 L3 antibody in full-grown stage VI oocytes and exponentially growing *Xenopus* XTC cells (Figure 1B, lanes 4 and 5). This result was expected since human and *Xenopus* proteins contain exactly the same number of amino-acids (Figure 1A). In HeLa cells blocked in prometaphase with nocodazole, N4 antibody detected two

bands having a reduced electrophoretic mobility (Figure 1B, lane 2). We have previously shown that phosphorylation of pEg3 in *Xenopus* eggs and embryos resulted in reduced electrophoretic mobility of the protein in polyacrylamide gel. These bands co-migrated with pEg3 detected with L3 serum in *Xenopus* unfertilised eggs. (Figure 1B, lane 3). These results indicate that pEg3 is expressed in human cells and is probably phosphorylated in mitotic cells like the *Xenopus* protein.

Activity of recombinant human pEg3

The recombinant pEg3 kinase tagged with six histidine residues (FL) and the catalytically inactive kinase (FLK/R) obtained by replacing a conserved lysine by an arginine in the catalytic domain of pEg3 (see Materials and Methods and Figure 2A) were produced in *E. coli* and purified on a nickel agarose affinity column. The results of the purifications are shown in Figure 2B (lanes 1 and 2). The pEg3FLK/R appeared as a single fast migrating band whereas the full-length protein appeared as several retarded bands that likely corresponded to pEg3 autophosphorylation. A truncated version of pEg3 (Δ C) in which the conserved C-terminal domain is missing and its corresponding catalytically inactive mutant (Δ CK/R) were also produced and purified (Figure 2A and 2B, lanes 3 and 4). As shown by Coomassie blue staining, the pEg3 Δ CK/R protein migrated as a single band like pEg3FLK/R but with a higher electrophoretic mobility. The difference

in size corresponded to the deleted C-terminal domain. The pEg3 Δ C protein migrated as fuzzy bands like pEg3FL but with a higher electrophoretic mobility (Figure 2B, lane 3). We previously reported that the *Xenopus* pEg3 kinase is able to phosphorylate histone H1 *in vitro* (Blot et al., in press), we therefore tested the ability of the purified recombinant human pEg3 to phosphorylate histone H1 *in vitro*. Human pEg3FL and pEg3 Δ C were able to phosphorylate histone H1 (Figure 2B, lanes 5 and 7). pEg3FL and pEg3 Δ C were also able to autophosphorylate (Figure 2B, lanes 9 and 11). As expected pEg3FLK/R and pEg3 Δ CK/R were catalytically inactive (Figure 2B, lanes 6, 8, 10 and 12).

pEg3 specifically phosphorylates CDC25B phosphatase *in vitro*

It was previously described that C-TAK1, a member of the KIN1/PAR1/MARK kinase family, is able to associate with and to phosphorylate the CDC25C phosphatase (Peng et al., 1998). pEg3 presents a significant degree of sequence homology at the level of the catalytic domain with the C-TAK1 kinase. Thus we hypothesised that pEg3 might be able to phosphorylate CDC25. For this purpose active recombinant pEg3FL was used to test whether it could phosphorylate CDC25 phosphatases. Figure 3A shows that recombinant human pEg3 specifically phosphorylated *in vitro* translated CDC25B but not CDC25A nor CDC25C. In human cells three splicing variants of CDC25B (B1-3) have been isolated (Baldin et al., 1997). A kinase assay toward each of these splicing

variants was performed. The three isoforms were *in vitro* translated in rabbit reticulocyte lysate, immunoprecipitated and incubated with recombinant pEg3 kinase (ΔC or $\Delta CK/R$) in the presence of radioactive ATP. pEg3 ΔC was used instead of pEg3FL because pEg3FL co-migrates with CDC25B in SDS-PAGE. The results presented in figure 3B demonstrate that human pEg3 is able to phosphorylate the three variants of CDC25B without significant preference (Figure 3B, lanes 2, 4 and 6). All following experiments will be performed with only one splicing variant (CDC25B2). The control pEg3 $\Delta CK/R$ clearly demonstrates that this phosphorylation is actually due to added recombinant pEg3 kinase. As shown above pEg3 autophosphorylates and was also clearly detected (Figure 3B, lane 8 and also 2, 4, 6).

To determine which residue in CDC25B is phosphorylated by pEg3, three CDC25B3 mutants (S323G, S321G and S230G) were tested. These residues were selected because they are located in consensus 14-3-3 binding motifs. It was previously demonstrated that the C-TAK1 kinase phosphorylates S216 in CDC25C and creates a binding site for 14-3-3. Phosphorylation of S230G and S321 mutants was comparable to wild-type CDC25B3 (Figure 3C) indicating that S230 and S321 are not phosphorylated by pEg3 *in vitro*. In contrast a 50% reduction in phosphorylation was observed in the case of S323G mutant indicating that S323 is a target of pEg3. However, mutation of this residue did not completely abolish CDC25B3 phosphorylation indicating that pEg3

phosphorylates at least one additional amino-acid in CDC25B3 that remains to be identified.

pEg3 specifically interacts with CDC25B *in vitro*

Since pEg3 is able to specifically phosphorylate CDC25B it seemed possible that it could also physically interact with CDC25B. Co-immunoprecipitation experiments were performed to test this hypothesis. Because anti-human pEg3 antibody does not efficiently immunoprecipitate pEg3, we thought to use anti-Xenopus pEg3 (L2, Blot et al., in press). L2 serum was raised against a fragment of Xenopus pEg3 including C-terminal domain which is highly conserved in human pEg3. The cross-reactivity of L2 antibody was tested by western blotting using recombinant human pEg3 either full-length (FL) or deleted of the C-terminal domain (Δ C). The control pre-immune serum did not react against pEg3 (Figure 4A, lanes 3 and 4). L2 antibody could detect pEg3FL (Figure 4A, lane 5) but not pEg3 Δ C (Figure 4A, lane 6) although the Coomassie blue staining of polyacrylamide gel clearly shows that pEg3 Δ C protein was present in similar amounts (Figure 4A, lanes 1 and 2). These results indicated that the anti-Xenopus pEg3 L2 antibody specifically cross-reacted with human pEg3 via the conserved C-terminal domain of the protein. Then the ability of L2 serum to immunoprecipitate the recombinant human pEg3FL protein was tested. Immunoprecipitations were analysed by western blot with anti-human pEg3 N4

antibody. As shown in Figure 4A, pEg3FL was immunoprecipitated by L2 antibody (lane 8) but not with the corresponding pre-immune serum (lane7).

Recombinant pEg3FL was immunoprecipitated with L2 serum. Immune complexes were adsorbed on protein A sepharose beads and then were incubated with CDC25A, B and C produced in rabbit reticulocyte lysate in the presence of radioactive methionine. The L2 pre-immune serum (Pi) was used as a control. As shown in Figure 4B, CDC25B was detected in L2 immunoprecipitates and traces are visible with the pre-immune serum. However CDC25A and C were not detected in L2 immune complex. This experiment shows that pEg3 specifically interacted with the CDC25B phosphatase *in vitro*. This interaction may be direct or mediated by proteins of the rabbit reticulocyte lysate. To answer to this question, a similar experiment was performed using purified GST-CDC25B produced in bacteria instead of programmed rabbit reticulocyte lysate and the GST protein was used as a control. Anti-GST antibodies detected GST-CDC25B in immunoprecipitates obtained with L2 serum. The GST protein alone was not detected in L2 immune complexes. These results show that the interaction between pEg3 and CDC25B is direct.

pEg3 interaction domain in CDC25B

The *in vitro* association assay was then used to map the pEg3 interaction domain on the CDC25B phosphatase. A set of N-terminal deletion mutants of CDC25B were produced in rabbit reticulocyte lysate and tested for their ability to

interact with pEg3. Deletion of the 288 N-terminal residues of CDC25B did not abolish the interaction with pEg3 (Figure 5, lanes 9 to 16). However the non specific signal detected with the control immunoprecipitate was suppressed when the 200 N-terminal residues were deleted from CDC25B. CDC25B was not detected anymore when the 310 N-terminal residues were deleted (Figure 5, lane 18). This result indicates that in CDC25B, residues 288 to 310 are necessary for pEg3 interaction and may represent the pEg3 interaction domain in CDC25B.

We hypothesised that interaction with or phosphorylation by pEg3 could regulate the phosphatase activity of CDC25B *in vitro*. To address this question, CDC25B produced in reticulocyte lysate was phosphorylated *in vitro* by recombinant pEg3 and its activity was measured on the FDP substrate. The phosphatase activity did not change significantly compared to controls (data not shown). These results indicate that CDC25B activity is not directly controlled by the interaction with or phosphorylation by pEg3 *in vitro*.

***In vivo* interaction between pEg3 and CDC25B**

Since pEg3 is able to specifically interact with CDC25B *in vitro*, we tested if this interaction also occurred *in vivo*. For this purpose a co-immunoprecipitation experiment was performed using anti-Xenopus L2 antibody and extracts from a human osteosarcoma cell line (U2OS-Tet) overexpressing HA-tagged CDC25B2 under the control of the tetracycline repressible promoter (Figure 6, lane 1), or

from control U2OS-Tet cells which do not overexpress CDC25B (Figure 6, lane 2). CDC25B2 was present in L2 immunoprecipitate from U2Os cells overexpressing HA-CDC25B2 (Figure 6, lane 3) but was undetectable in immunoprecipitate made from U2OS-Tet control cells (Figure 6, lane 4). These experiences show that pEg3 and CDC25B phosphatases are able to interact *in vivo*.

The interaction of pEg3 with CDC25B was tested at different phases of the cell cycle using U2OS-HACDC25B2 cells treated with various drugs such as nocodazole and aphidicolin. No significant change in the pEg3/CDC25B interaction could be observed (data not shown).

CDC25B expression counteracts the G2 accumulation induced by human pEg3 overexpression in cultured cells

It was previously shown that *Xenopus* pEg3 protein phosphorylation and kinase activity are regulated during cell cycle (Blot et al., in press). In order to determine the possible role of human pEg3 in cell cycle control and the importance of CDC25B in this process, U2OS-Tet cells overexpressing CDC25B2 and U2OS-Tet control cells were transiently transfected with plasmids allowing expression of pEg3FL and pEg3FLK/R tagged with the green fluorescent protein (GFP). The percentages of G1, S and G2/M cells were determined by FACS analysis. The cell distribution through the different phases of the cell cycle of

untransfected U2OS-Tet and U2OS overexpressing HACDC25B2 cells were very similar (Figure 7A and 7B). In contrast expression of GFP-pEg3FL in U2OS-Tet cells induced an accumulation of cells in G2/M at the expense of G1 cells (Figure 7C). The mitotic index of the cell culture was determined and indicated that the percentage of mitotic cells was unchanged (data not shown). So the increase in the G2/M percentage corresponded to a G2 accumulation which might probably be the consequence of a delay in cell cycle progression or an arrest in G2. Overexpression of CDC25B2 in U2OS-Tet cells transfected with GFP-pEg3FL decreased the percentage of G2/M cells (Figure 7D). Percentages of cells in each phase of the cell cycle were very similar to controls when pEg3FLK/R was expressed in U2OS-Tet control cells and in U2OS cells overexpressing CDC25B2 (Figure 7E and 7F). Taken together these results indicate that the pEg3 kinase activity is necessary for G2 accumulation of cells and that CDC25B2 overexpression counteracts the effect of pEg3 expression suggesting that pEg3 and CDC25B have antagonistic functions.

DISCUSSION

We have previously reported that the *Xenopus* pEg3 protein is a cell cycle regulated kinase: phosphorylation and kinase activity of pEg3 are low during interphase and peak during mitosis (Blot et al., in press). In the present paper, we show that ectopic expression of the human pEg3 promoted an accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle suggesting that pEg3 is involved in the negative regulation of G2/M progression. This accumulation of cells in the G2 phase corresponds either to a delay or a blockage of the cell cycle. The CDC25B phosphatase is also involved in cell cycle progression. Microinjections of anti-CDC25B antibodies (Lammer et al., 1998) and overexpression of CDC25B inactive mutants (Gabrielli et al., 1996) demonstrated that CDC25B plays a role in the control of G2/M transition. Here we show that the overexpression of the CDC25B phosphatase counteracts the effect of pEg3 indicating that pEg3 and CDC25B may have antagonist functions.

We cannot exclude the possibility that the pEg3-induced accumulation of cells in G2 is independent of CDC25B. Ectopic expression of pEg3 may arrest cell cycle in G2 by an indirect mechanism. This may finally results in inhibition of the CDK1/cyclinB complex, the key regulator of the G2/M transition. Since CDC25B is an activator of the CDK1/cyclin B complex (Gabrielli et al., 1997), then overexpression of CDC25B phosphatase would simply release this inhibition by

activating the CDK1/cyclinB complex hence allowing mitosis to occur. However, we have shown that the human pEg3 protein kinase specifically associates with CDC25B *in vitro* and *in vivo*. Results of *in vitro* binding experiments indicate that human pEg3 directly interacts with CDC25B, no additional factor is required. The pEg3 association with CDC25B is stable during the cell cycle when HACDC25B expressing cells were synchronised with various drugs since no significant modification could be observed in cells treated with nocodazole or aphidicolin. Moreover, we have also shown that pEg3 is able to specifically phosphorylate the CDC25B phosphatase *in vitro*. Hence, the ectopic expression of pEg3 could perturb the cell cycle progression by interfering with the CDC25B function. This may occur either directly by phosphorylating CDC25B or indirectly by phosphorylating a protein which is also a substrate of CDC25B.

The expression of inactive pEg3FLK/R mutant does not induce the effect on cell cycle observed with the active kinase. This result indicates that the pEg3 kinase activity is necessary for the G2 accumulation of cells. Since pEg3 is able to specifically phosphorylate CDC25B, we speculated that the G2 arrest might be due to CDC25B phosphorylation by pEg3. One can assume that CDC25B phosphatase activity could be decreased or abrogated upon phosphorylation by pEg3. However, *in vitro*, the phosphatase activity of CDC25B was not changed following phosphorylation by pEg3 which rules out this possibility. Whether this is also true *in vivo* remains to be shown.

By the use of CDC25B mutants, we have shown that pEg3 phosphorylates CDC25B on serine 323 (S323) and on at least one additional unidentified residue. Truncated forms of CDC25B phosphatase bind to 14-3-3 proteins (Conklin et al., 1995; Mils et al., 2000). The sequence surrounding S323 constitutes a major 14-3-3 binding site and S323 was shown to be absolutely necessary for 14-3-3 interaction (Forrest & Gabrielli, 2001; Mils et al., 2000). It was recently suggested that 14-3-3 binding regulates the CDC25B activity (Forrest and Gabrielli, 2001). Overexpression of CDC25B in G2 checkpoint arrested cells overrides the DNA-damage induced G2 checkpoint. CDC25B mutated on S323 is even more effective than wild type CDC25B (Forrest and Gabrielli, 2001) indicating that S323 play a crucial function in the DNA-damage induced G2 checkpoint. The S323 residue is also essential for the cytoplasmic retention of CDC25B (Davezac et al., 2000). Function of phosphorylation of the corresponding S323 residue in CDC25C (S216) is well documented although incompletely understood. In CDC25C, the S216 residue is the target of several kinases including CHK1, a kinase involved in DNA-damage checkpoint. The phosphorylation of S216 by CHK1 creates a binding site for 14-3-3. The binding of 14-3-3 to CDC25C regulates the subcellular localisation of CDC25C and also regulates the phosphatase activity of CDC25C (Kumagai & Dunphy, 1999). *In vitro* CHK1 is able to phosphorylate CDC25B (Mils et al., 2000; Sanchez et al., 1997), however CHK1 was unable to promote CDC25B/14-3-3 interaction *in vitro* then strongly suggesting that CHK1

does not regulate this interaction (Mils et al., 2000). Another kinase, C-TAK1, phosphorylates CDC25C on the S216 residue (Peng et al., 1998). C-TAK1 phosphorylates CDC25C during interphase hence keeping it inactive. Interestingly C-TAK1 belongs to the KIN1/PAR-1/MARK family. One can speculate that pEg3 might regulate 14-3-3 binding or subcellular localisation of CDC25B or both. However no change in subcellular localisation of HACDC25B could be observed after transfection of cells with GFP-pEg3FL (data not shown). Might the pEg3 kinase be involved in a checkpoint acting on CDC25B is an important issue that will be explored.

The CDC25B phosphatase has been shown to promote centrosome microtubule nucleation at prophase (Gabrielli et al., 1996). The mechanism by which CDC25B acts in this process is not known yet, but it seems likely that it is mediated by the CDK1/cyclinB complex (Gabrielli et al., 1996). The pEg3 ectopic expression might interfere with microtubule nucleation, then delaying or stopping the cell cycle in G2. Overexpression of CDC25B would counteract the pEg3-induced G2 accumulation of cells via its microtubule nucleation promoting effect. Interestingly, the MARK1 and MARK2 kinases, two other members of the KIN1/PAR-1/MARK family, are involved in microtubules dynamic (Drewes et al., 1997). Then it will be of importance to test whether pEg3 might be involved in microtubules stability.

Our previous work showed that the pEg3 kinase is regulated during the cell cycle. The present results show that pEg3 is involved in the control of cell cycle progression and very probably the G2/M transition. The pEg3 protein belongs to the KIN1/PAR-1/MARK family of protein kinases which have a role in cell polarity and microtubules dynamic. Might pEg3 be involved in cell polarity remains to be demonstrated but one possibility is that pEg3 may link the cell cycle with cell polarity and, or cell morphology via the CDC25B phosphatase.

ACKNOWLEDGMENTS

Support of the comité de la Haute-Garonne de la Ligue contre le Cancer, of the association pour la Recherche contre le cancer (programme ARECA). This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 5960).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids construction

Cloning of the human pEg3 encoding KIAA0175 cDNA was previously described (Ref). This cDNA was cloned in pBluescript plasmid (pBluescript-Eg3). The coding sequence of KIAA0175 cDNA was amplified by PCR with primers 5'- GAGGGCTAGCAAAGATTATGATGAAC -3' (sense) which introduce a NheI restriction site and 5'- CCATCTCGAGTACCTTGCAGCTAGATAG -3' (antisense) which introduce a XhoI site. In italics are indicated the KIAA0175 specific sequences. All PCR were done using Pfu polymerase (Promega). The PCR product was digested with NheI and XhoI and cloned into NheI-XhoI sites in the pET21a vector (Invitrogene) giving the pET-Eg3FL plasmid. Lysine 40 was replaced by directed mutagenesis with Transformer Site-Directed Mutagenesis kit according to the manufacturer instructions (Clontech). Mutagenesis was realised on pET-Eg3FL plasmid. For this purpose the following oligonucleotide was used :

5'CTTACTGGAGAGATGGTcGCgATACGCATCATGGATAAAAACA
C-3'.

Underlined are bases corresponding to the arginine 40 residue and lower letters indicate silent modifications in order to introduce a NruI restriction site used to select the mutagenised plasmid (pET-Eg3FLK/R). Construction of the C-

terminal truncated pEg3 mutant was done by PCR on pBluescript-Eg3 plasmid with primers 5'- CGCGGATCCAAAGATTATGATGAACTTC -3' (sense) and 5'- CGGAATTCATTAAGTGTCTGTTCTG -3' (antisense) introducing a BamHI and an EcoRI site, respectively. The PCR fragment was introduced into BamHI and EcoRI sites of pET21a vector giving the pET-Eg3 Δ C plasmid. For constructing pET-Eg3 Δ CK/R plasmid the PCR was done using pET-Eg3FL K/R as the matrice and the PCR fragment was digested with BamHI and XmaI restriction enzymes. The same fragment was excised from pET-Eg3 Δ C and replaced by the PCR fragment containing the K/R mutation. The following primers 5'- CGCGGATCCAAAGATTATGATGAACTTC -3' (sense) introducing a BamHI site and 5'- CGGAATTCAGAAGCAGAATGCTACTG -3' (antisense) introducing an EcoRI site were used to amplified a DNA fragment coding for the catalytic domain of pEG3 (AA 2 to 242). This PCR product was cloned into BamHI-EcoRI sites of pET21a giving the pET21-Eg3N plasmid.

To construct pEGFP-Eg3FL plasmid a DNA fragment was amplified by PCR from pBluescript-Eg3 using the following primers 5'- CGCGGATCCAAAGATTATGATGAACTTC -3' (sense) introducing a BamHI site and 5'- CGGAATTCACCTTGCAGCTAGATAGG -3' (antisense) introducing an EcoRI site. The PCR product was then introduced into BglII and EcoRI sites of pEGFP-C1 plasmid. pEGFP-Eg3FL plasmid was constructed using the same strategy and same primers but pET-Eg3FL K/R was used as matrice.

Human cDNA encoding the full length of CDC25 B1, B2 and B3, deletion mutants and point mutation of S323G were cloned in pET14b (Novagen) as described previously (Mils et al., 2000). S321G and S230G mutations were generated by PCR mutagenesis on pET14b-CDC25 B3 plasmid using the following primers : 5'-GCGGCTCTTCCGGGGCCCGTCCATGCCCTG-3' ; 5'-GCCAGAGACCCGGGGGGGCCCCGACC -3' (sense) and 5'-CAGGGCATGGACGGGCCCCGGAAGAGCCGC-3' ; 5'-GGTCGGGGGCCCCCGGGTCTCTGGGC-3' (antisense).

Expression and purification of recombinant proteins

Recombinant pET- Eg3FL, FLK/R, Δ C and Δ CK/R plasmids were transformed in *E. coli* strain BL21(DE3) pLys S. Expression and purification of native his-tagged pEg3 proteins were done following the manufacturer recommendations (Qiagen Inc.). Proteins were eluted in IMAC buffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 10% glycerol) containing 250 mM imidazol (Sigma). After purification proteins were kept in 50% glycerol at -20°C until use.

Preparation of antibodies and affinity purification

Recombinant N-terminal domain of pEg3 (pEg3N) expressed in *E. coli* was purified and used to immunise rabbits. Affinity purification of N4

immunoglobulins was performed by the membrane bound antigen method (Harlow and Lane, 1988) using the pEg3N recombinant protein. Anti-*Xenopus* pEg3 sera L2 and L3 have been described previously (Blot et al, in press).

In vitro kinase assay

The activity of recombinant human pEg3 FL, FLK/R, Δ C and Δ CK/R proteins (250 ng) was tested with histone H1 as previously described for *Xenopus* pEg3 (Blot et al., in press).

In vitro translated CDC25 B protein was immunoprecipitated with polyclonal rabbit antibodies anti-human CDC25 B (raised against a C-terminal peptide) as described before (Baldin et al., 98). The immune complexes were incubated with 250 ng of recombinant human pEg3FL or truncated human pEg3 Δ C in kinase buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 1 mM DTT), 50 μ M ATP and 5 μ Ci γ ³²P-ATP. The reaction was performed during 30 min. at 30°C. The reaction was stopped by addition of 0.5 ml of lysis buffer, samples were centrifuged and beads were resuspended in Laemli sample buffer. Samples were separated by SDS-PAGE gel and analysed by autoradiography.

In vitro interaction

Wild type and mutant forms of CDC25 were *in vitro* translated in rabbit reticulocyte lysate (TNT7 Quick, Promega) in the presence of ³⁵S-Methionine.

Recombinant fusion protein GST-CDC25B or GST alone were expressed in *E. coli* as a Glutathione-S-Transferase fusion protein and purified as already described (Baldin et al Oncogene 14: 2485-2495, 1997). Recombinant pEg3FL protein (750ng) was immunoprecipitated with the L2 antibody directed against the *Xenopus* protein in lysis buffer (50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton-X100, 100 μ M Na₃VO₄, 1 mM DTT) supplemented with protease inhibitors (1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK), 10 μ g/ml tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 0.17 mg/ml phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and 10 μ g/ml calpain I), during 3 hours at 4°C. 50 μ l of 1:5 Protein A Sepharose (Sigma) was added and the incubation was carried on for an additional 45 minutes. The immune complexes were washed three times with 1 ml of lysis buffer and resuspended in 100 μ l of the same buffer containing *in vitro* translated CDC25 B proteins or recombinant GST-CDC25 B fusion proteins. After 1 hour of incubation at 4°C, the samples were centrifuged for 3 min. at 734 g, then washed twice with the same buffer and twice with lysis buffer containing 250 mM NaCl. As a control, a similar procedure, in which recombinant pEg3 protein was omitted and pre-immune serum used, was followed. The precipitates were then subjected to SDS-PAGE analysis and autoradiography. When GST-CDC25 B fusion protein was used, the analysis was performed by Western-blot

using antibodies against GST (Pharmacia Biotech, 1/1000) and anti-Goat HRP (DAKO, 1/2500).

Cell culture and transfections

Xenopus tadpole XTC cell line was propagated in L-15 medium supplemented with 7.5% fetal bovine serum (FBS) and penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) (Life Technologies, USA) and maintained at 21°C at ambient atmosphere.

U2Os-tTA (a generous gift of F. Goubin) and derived cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (Eurobio), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), U2Os-HA CDC25B2 were cultured in the same media supplemented with hygromycin (200 µg/ml) and G418 (100 µg/ml) (Seromed). Establishment and characterisation of the U2OS-tTA cell lines conditionally expressing CDC25B proteins will be described elsewhere (Theis-Febvre et al., in preparation). To turn off the expression of CDC25B, cells were maintained in presence of tetracycline (2 µg/ml). All the cell lines grow at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Transient transfections were achieved using linear ethylenimin polymers (PEI, Exgen 500, Euromedex). One million of cells were plated in 100 mm dishes and transfected the next day with 30 µl of Exgen 500 and 15 µg of purified

plasmids (pEGFP-Eg3FL or pEGFP-Eg3FLK/R). The medium was removed two hours after and the cells were recovered for cell cycle analysis 24 hours after transfection. As much as 50% of cells were transfected as determined by epifluorescence microscopic observations.

Co-immunoprecipitation

Cell pellets were resuspended in 3-5 volumes of lysis buffer containing 1 % NP40. The immunoprecipitations were performed using 10 μ l polyclonal L2 antibodies raised against Xenopus pEg3 and its corresponding pre-immune serum during 4 hours at 4°C. Protein A Sepharose (50 μ l of 1:5 dilution, Sigma) was added and the incubation was carried on for an additional hour. The samples were then washed twice with lysis buffer (without NP40) and twice with lysis buffer containing 250 mM NaCl. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and Western-blot as previously described (Baldin et al Oncogene 14: 2485-2495, 1997) using monoclonal anti-HA antibody (12CA5, Roche Molecular Biomedicals).

Flow cytometry analysis

The cells were recovered by scraping, centrifuged at 200 g for 5 min. at 4°C and fixed in 70% ethanol overnight at – 20°C. Then, cells were rehydrated adding 1 volume of PBS, incubated on ice 15 minutes and then centrifugated at

200 g for 5 minutes at 4°C, twice. After an additional centrifugation, the cell pellet was resuspended in PBS supplemented with RNase A (1mg/ml), propidium iodide (1 mg/ml) and incubated for 25 minutes at 37°C. The pEg3FL or pEg3FLK/R over-expressing cells were detected on the basis of the GFP fluorescence. The data were collected using a FACS-Calibur (Becton Dickinson) flow cytometer and the quantification was performed using the ModFitLT software.

Misceallenous methods

Xenopus stage VI oocytes and unfertilised eggs were obtained as previously described (Blot et al., in press). HeLa and XTC protein extracts used for western blotting analysis were obtained by cell lysis in Laemli sample buffer followed by heating at 95°C for 5 min.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 : pEg3 expression in human cultured cells

(A) Schematic representation of *Xenopus* and human pEg3 kinase. The catalytic (N) domain is represented by a hatched box, the medium (M) domain by a white box and C-terminal (C) domain by a pointed box. Percentages of sequence identity for each domain between the two molecules are given.

(B) Proteins extracted from exponentially growing (Exp.) and nocodazole treated (Noc.) HeLa cells were analysed by western blotting with affinity purified anti-human pEg3 antibody (N4). In order to compare the electrophoretic mobility of human and *Xenopus* pEg3, proteins of *Xenopus* unfertilised eggs (UFE), full-grown stage VI oocytes (VI) and cultured XTC cells (XTC) separated on the same 10% polyacrylamide gel were analysed by western blotting with affinity purified anti-*Xenopus* pEg3 antibody (L3). The N4 pre-immune serum (PiN4) was also tested by western blotting with protein extract of exponentially growing HeLa cells. Arrows and arrow head indicate phosphorylated and hypophosphorylated pEg3, respectively.

Figure 2 : production of recombinant human pEg3 and kinase activity

(A) Schematic representation of human pEg3 recombinant proteins. pEg3FL: full length protein, pEg3ΔC: protein deleted of the C-terminal domain, K/R: lysine 40 replaced by an arginine. N, M and C as in Figure 1A.

(B) Recombinant full-length pEg3 (FL), pEg3 deleted of the C-terminal domain (ΔC) and their corresponding inactive mutants (FLK/R and ΔCK/R, respectively) were produced in bacteria. After purification, proteins were run on a 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue (Coomassie). To test the kinase activity of these proteins, purified recombinant kinases were incubated for 30 min. at 30°C in the presence of histone H1 (H1) or not (Autophosp.) and radioactive ATP. After incubation, proteins were separated on a 12% (Autophosp.) and 18% (H1) polyacrylamide gel and autoradiographed.

Figure 3 : pEg3 phosphorylates CDC25B phosphatases *in vitro*

(A) CDC25A, B and C proteins were translated in rabbit reticulocyte lysate, immunoprecipitated with respective anti-CDC25 antibodies raised against a C-terminal peptide then incubated in the presence of active pEg3 recombinant kinase (ΔC) and radioactive ATP for 30 min. at 30°C. Samples were separated on a 8% SDS PAGE and were subjected to autoradiography and western blotted with antibodies raised against CDC25. The ³²P incorporation was quantified and normalised to the amount of CDC25 protein. The indicated values are the average of three independent determinations.

(B) *In vitro* translated CDC25B1-3 proteins (unlabelled) were incubated in the presence of pEg3 Δ C or pEg3 Δ CK/R recombinant kinases and radioactive ATP for 30 min. at 30°C separated on 8% SDS PAGE then subjected to autoradiography. Stars indicate the position of autophosphorylated pEg3 Δ C.

(C) *In vitro* translated wild-type or indicated mutant CDC25B3 protein were immunoprecipitated then incubated in the presence of pEg3 Δ C for 30 min. at 30°C separated on 8% SDS PAGE then subjected to autoradiography and analysed by western blot with antibodies raised against CDC25B. The 32 P incorporation was quantified and normalised to the amount of CDC25B3 protein. The indicated values are the average of three independent determinations.

Figure 4 : *In vitro* interaction between pEg3 and CDC25B.

(A) Purified full-length recombinant pEg3 (FL) and pEg3 deleted of the C-terminal domain (Δ C) were analysed by Coomassie Blue staining (Coomassie). These proteins were analysed by western blot with anti-*Xenopus* pEg3 serum (L2) and the corresponding pre-immune serum (PiL2). L2 and pre-immune sera were used to immunoprecipitate pEg3FL and immune complexes were analysed by western blot with anti-human pEg3 antibody (N4). Ig HC: immunoglobulins heavy chains.

(B,C) Purified recombinant pEg3FL protein (750ng) or control buffer solution were subjected to an immunoprecipitation with polyclonal antibodies against

Xenopus pEg3 (L2) or with the corresponding pre-immune serum (Pi). (B) Interaction between pEg3 and the phosphatases CDC25A, B and C. Immune complexes were then incubated with *in vitro* translated ³⁵S labelled CDC25 A, B or C proteins (IVT) for 30 min. at 4°C. After washing, bound material was run on SDS-PAGE and visualised by autoradiography. An aliquot of the *in vitro* translation product (IVT) was also loaded as a control. (C) Purified recombinant pEg3FL protein (750ng) was immunoprecipitated then incubated and processed as in (B) in the presence of recombinant GST or GST-CDC25B2 except that visualisation of the interaction was performed by western blotting using anti-GST antibodies. A sample of the GST preparation (GST) was also loaded as control.

Figure 5 : Mapping of the interacting domain of pEg3 on CDC25B.

Purified recombinant pEg3FL protein (750ng) or control buffer solution were subjected to an immunoprecipitation with polyclonal antibodies against pEg3 (IP). The precipitates were then incubated in the presence of *in vitro* translated CDC25B wild-type or mutant proteins for 30 min. at 4°C. After washing, bound material was run on SDS-PAGE and visualized by autoradiography. Aliquots of the *in vitro* translation products were also loaded as control (IVT). Note that the non-specific interaction that is detected between *in vitro* translated CDC25B and the control immunoprecipitate is vanished after deletion of the first 200 residues.

Figure 6 : *In vivo* interaction between pEg3 and CDC25B

Proteins (100µg) extracted from U2OS-HACDC25B2 cells expressing HA-epitope tagged CDC25B2 (B2) under the control of the tetracycline repressible promoter and U2OS-tTA control cells (-) were analysed by western blot using anti-HA antibodies. Immunoprecipitations were performed using the anti-Xenopus pEg3 L2 serum and, immune complexes were analysed by western blotting with anti-HA antibodies to detect the presence of CDC25B2 protein. In cells that do not express CDC25B2, two unrelated proteins are labelled with anti-HA (stars).

Figure 7 : CDC25B expression counteracts the G2 accumulation induced by human pEg3 overexpression in U2OS cells.

Exponentially growing U2OS-tTA parental cells (left panels) or expressing CDC25B (right panels) were transfected with pEGFP-C1 vectors allowing the expression of pEg3FL or pEg3FLK/R protein kinase. The cells were grown in the absence of tetracycline, then harvested 24 hours after transfection. Cell cycle distribution was analysed by flow cytometry after propidium iodide staining on the whole population (control) or gated on the GFP expressing cells. Quantification was performed using the ModFit software. The results presented here are representative of several independent experiments.

REFERENCES

- Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M. & Ducommun, B. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 32731-4.
- Blot, J., Chartrain, I., Roghi, C., Philippe, M. & Tassan, J.P. (in press). *Dev Biol*.
- Conklin, D.S., Galaktionov, K. & Beach, D. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7892-6.
- Dalal, S.N., Schweitzer, C.M., Gan, J. & DeCaprio, J.A. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 4465-79.
- Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M. & Ducommun, B. (2000). *Oncogene*, **19**, 2179-85.
- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1997). *Cell*, **89**, 297-308.
- Escalas, N., Davezac, N., De Rycke, J., Baldin, V., Mazars, R. & Ducommun, B. (2000). *Exp Cell Res*, **257**, 206-12.
- Forrest, A. & Gabrielli, B. (2001). *Oncogene*, **20**, 4393-401.
- Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K. & Ellem, K.A. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 28607-14.
- Gabrielli, B.G., De Souza, C.P., Tonks, I.D., Clark, J.M., Hayward, N.K. & Ellem, K.A. (1996). *J Cell Sci*, **109**, 1081-93.
- Galaktionov, K. & Beach, D. (1991). *Cell*, **67**, 1181-94.
- Gould, K.L. & Nurse, P. (1989). *Nature*, **342**, 39-45.
- Guo, S. & Kempfues, K.J. (1995). *Cell*, **81**, 611-20.
- Hoffmann, I., Draetta, G. & Karsenti, E. (1994). *Embo J*, **13**, 4302-10.
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. & Okayama, H. (1994). *Embo J*, **13**, 1549-56.
- Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I. & Pines, J. (1999). *J Cell Biol*, **146**, 573-584.
- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1999). *Genes Dev*, **13**, 1067-72.
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W. & Hoffmann, I. (1998). *J Cell Sci*, **111**, 2445-53.
- Levin, D.E. & Bishop, J.M. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8272-6.
- Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z. & Piwnicka-Worms, H. (1997). *Mol Cell Biol*, **17**, 571-83.
- McGowan, C.H. & Russell, P. (1993). *Embo J*, **12**, 75-85.
- Millar, J.B., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C. & Russell, P. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10500-4.
- Mils, V., Baldin, V., Goubin, F., Pinta, I., Papin, C., Wayne, M., Eychene, A. & Ducommun, B. (2000). *Oncogene*, **19**, 1257-65.
- Morgan, D.O. (1997). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-91.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1995). *Science*, **270**, 86-90.
- Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Tanaka, A. & Nomura, N. (1996). *DNA Res*, **3**, 17-24.
- Nagata, A., Igarashi, M., Jinno, S., Suto, K. & Okayama, H. (1991). *New Biol*, **3**, 959-68.

- Peng, C.Y., Graves, P.R., Ogg, S., Thoma, R.S., Byrnes, M.J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M.T. & Piwnica-Worms, H. (1998). *Cell Growth Differ*, **9**, 197-208.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S. & Piwnica-Worms, H. (1997). *Science*, **277**, 1501-5.
- Russell, P. & Nurse, P. (1987). *Cell*, **49**, 559-67.
- Sadhu, K., Reed, S.I., Richardson, H. & Russell, P. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5139-43.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. & Elledge, S.J. (1997). *Science*, **277**, 1497-501.
- Woo, E.S., Rice, R.L. & Lazo, J.S. (1999). *Oncogene*, **18**, 2770-6.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M. & Kornbluth, S. (1999). *Embo J*, **18**, 2174-83.

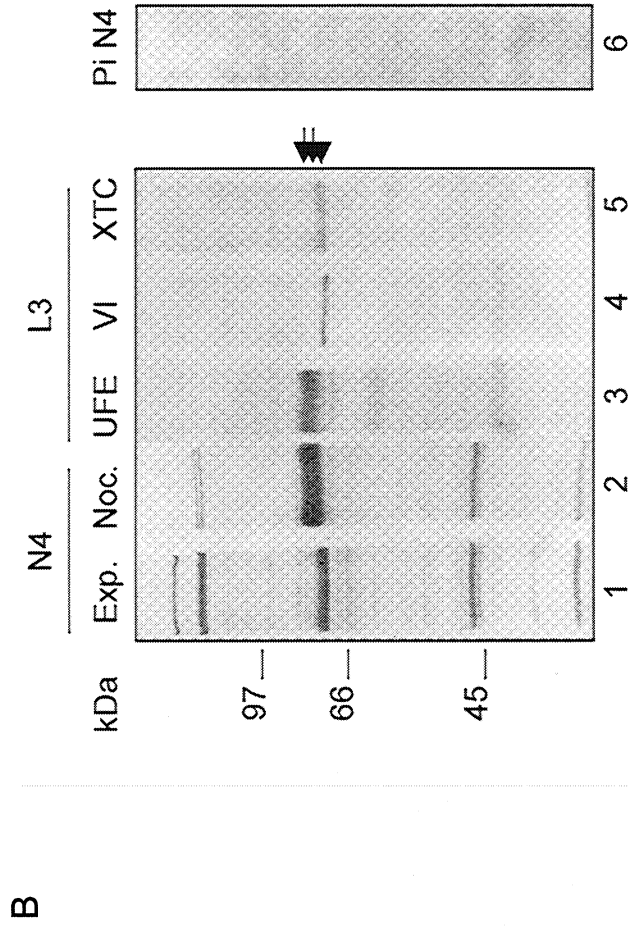
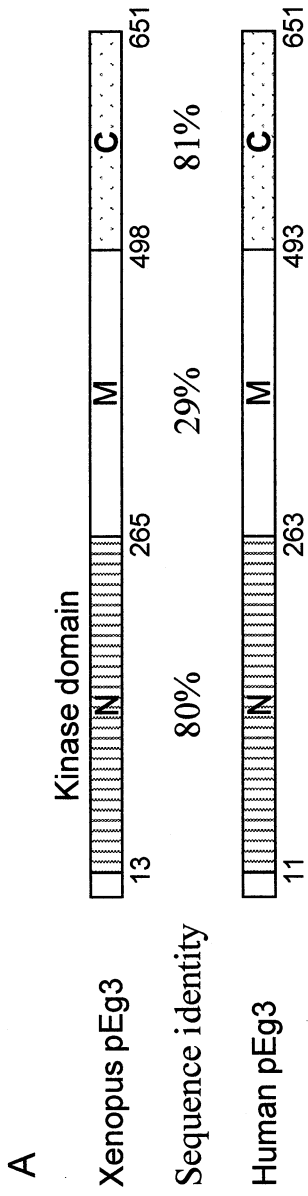
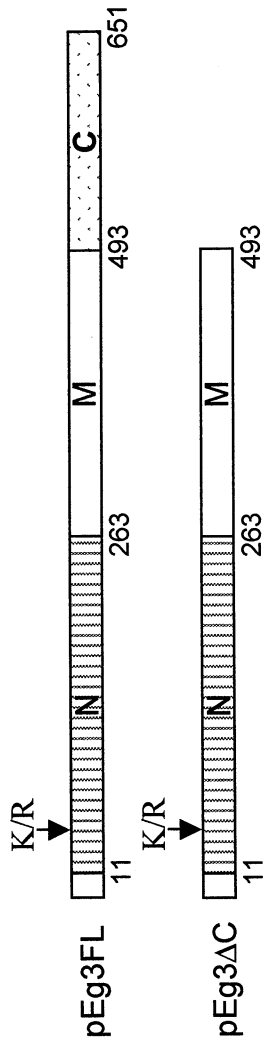


Figure 1

A



B

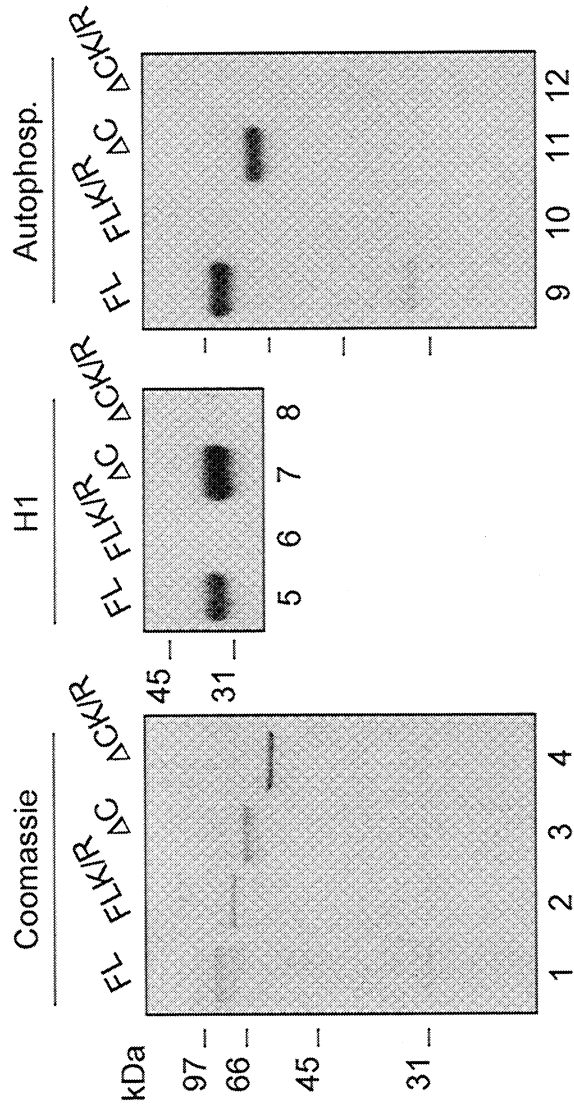


Figure 2

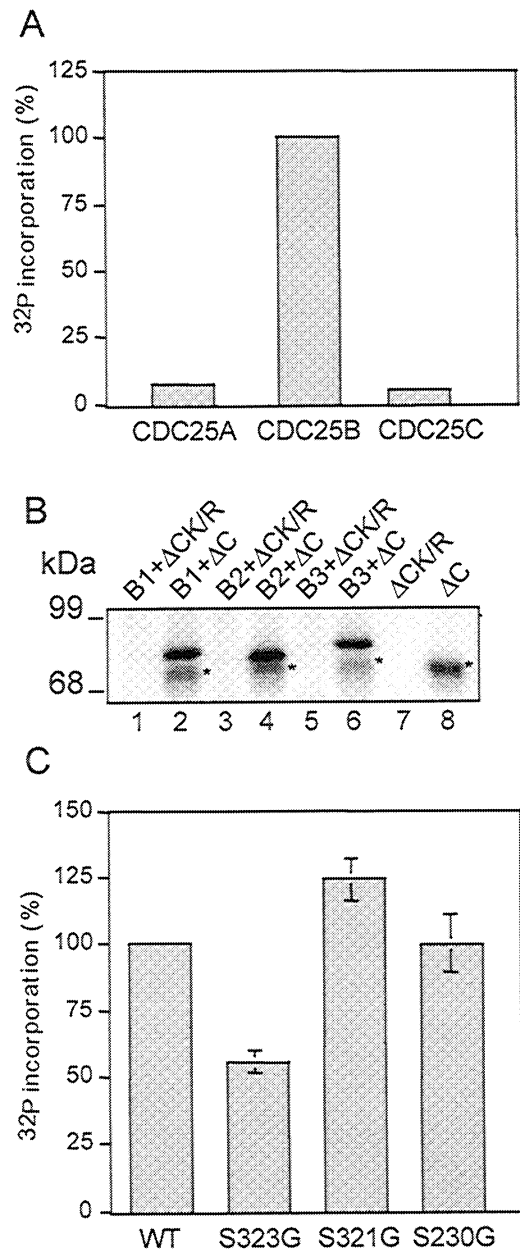


Figure 3

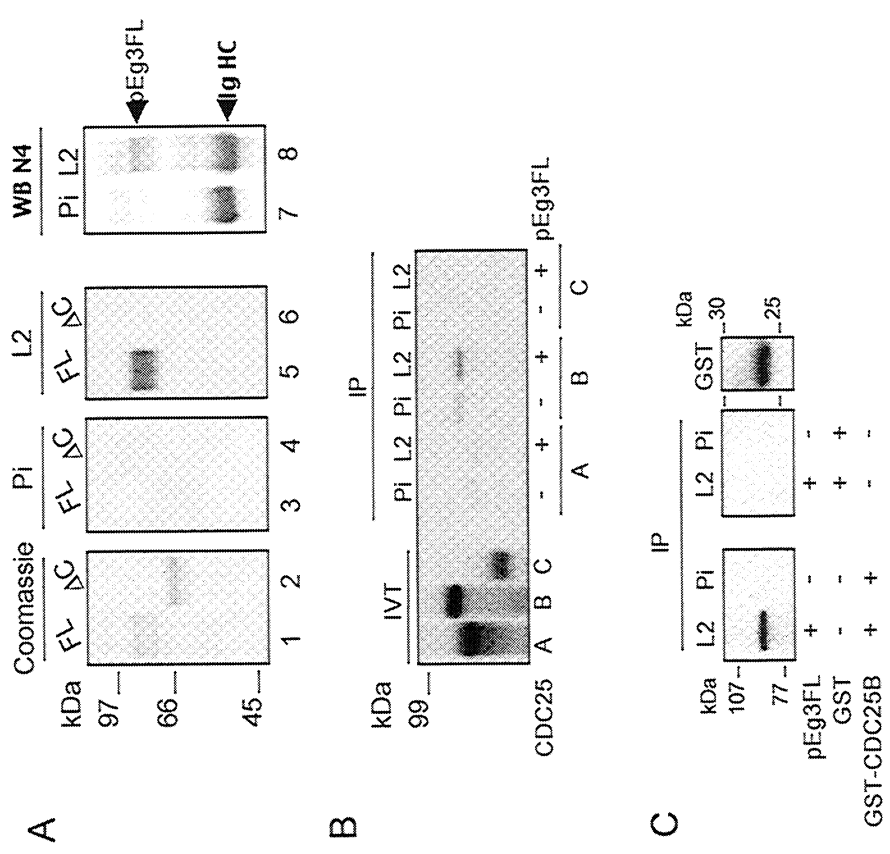


Figure 4

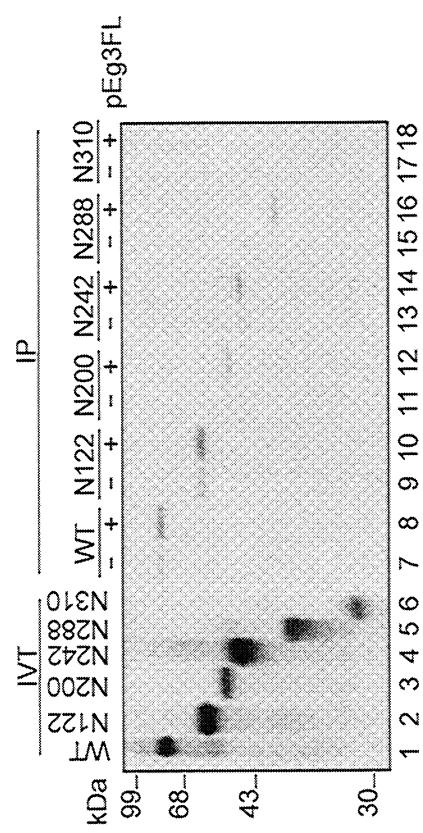


Figure 5

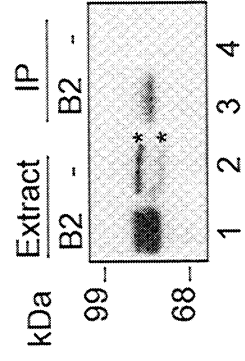


Figure 6

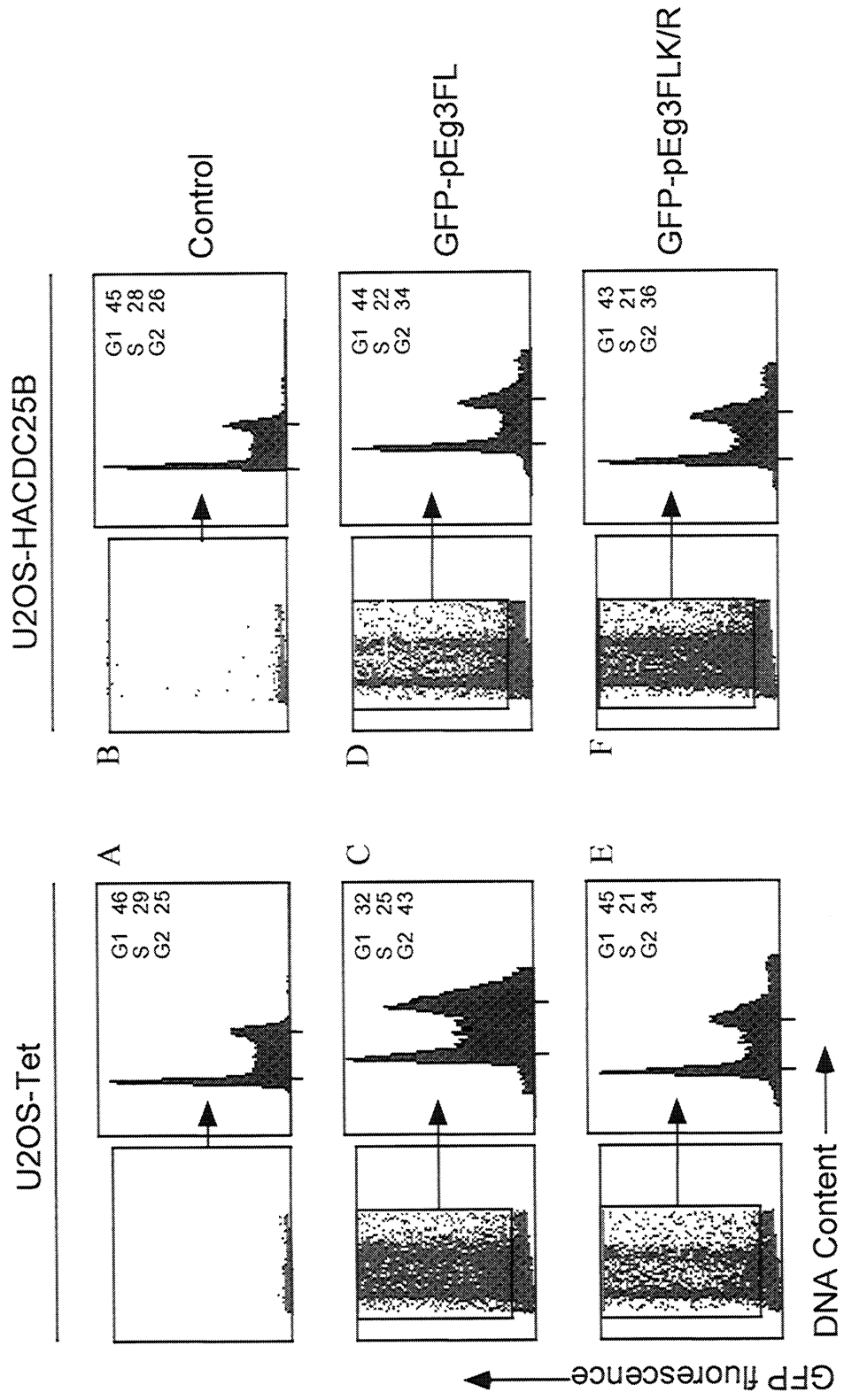


Figure 7

