



De la progestérone à l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope: Quels rôles pour H-Ras et la kinase Myt1?

Melina Gaffré Pocard

► To cite this version:

Melina Gaffré Pocard. De la progestérone à l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope: Quels rôles pour H-Ras et la kinase Myt1?. Biologie de la reproduction. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00180525

HAL Id: tel-00180525

<https://theses.hal.science/tel-00180525>

Submitted on 19 Oct 2007

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biologie du Développement
Ecole Doctorale La Logique du Vivant

Présentée par **Melina Gaffré**
Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

**De la progestérone à l'activation du MPF
dans l'ovocyte de Xénope :
Quels rôles pour H-Ras et la kinase Myt1 ?**

Soutenue le 25 septembre 2007, devant le jury composé de :

Dr Alain Eychène	Rapporteur
Dr Thierry Lorca	Rapporteur
Dr Evelyn Houliston	Examinatrice
Pr Philippe Denoulet	Examineur
Dr Catherine Jessus	Directrice de thèse

à Clarita

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude aux Dr Alain Eychenne et Thierry Lorca pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail de thèse, le Dr Evelyn Houliston pour avoir accepté de l'examiner, et le Pr Philippe Denoulet pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement le Dr Catherine Jessus pour avoir dirigé mon travail de thèse, pour le temps qu'elle a réussi à me consacrer malgré ses nombreuses responsabilités, pour ses compétences scientifiques et son enthousiasme permanent lors de l'écriture des articles entre autres.

Je suis très reconnaissante à Anthi Karaïskou pour m'avoir proposé de travailler avec elle sur le projet Myt1 et avec qui j'ai vraiment apprécié travailler. Malgré nos deux caractères forts de femmes du Sud et nos discussions (finalement toujours constructives), c'était pas gagné d'avance, mais tu as su courir le risque, et j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Je remercie Olivier Haccard pour avoir partagé ses connaissances scientifiques et techniques au début de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr René Ozon, pour ses visites matinales au labo durant lesquelles il portait un regard critique et constructif sur mes résultats.

Un très grand merci à Robert, mon voisin de box et du 12^e, pour son calme absolu devant n'importe quelle situation, pour ses conseils et pour toutes nos discussions interminables sur la vie, le 12^e, le bois de Vincenne, la politique, les voyages, l'immobilier, les travaux...etc...Robert, tu as rendu mon « passage » dans l'équipe très agréable. J'espère te recroiser un de ces quatre lors de tes balades solitaires dans le quartier par exemple!

Merci à David qui m'a appris la gymnastique de la Biologie Moléculaire, pour tous ses précieux conseils et pour toutes nos discussions non scientifiques. Merci à Gilliane pour tous ces déjeuners très agréables, à Marie partie chercher le soleil à Montpellier, à Catherine T. pour son dynamisme toujours communicatif et ses gateaux basques, sans oublier l'équipe de Katja. Merci également à Sylvie pour avoir pris soin de nos précieuses petites bêtes, et aux Xénopes pour avoir fait don de leurs ovaires à la science !

Merci à Mélanie avec qui j'ai apprécié travailler pendant une année, pour m'avoir accompagnée avec enthousiasme au stade Charlety, et pour son accent qui a rempli le labo de soleil et de cigales !

Merci à mes collègues du bout du couloir, et plus particulièrement à Isa, Lynda, Sylvie et Olivier, pour leur écoute, leur soutien, leurs conseils, et pour tous ces moments passés ensemble à l'heure du déjeuner, autour d'un verre ou d'une

soirée cranium ! Vos coups de fils quotidiens à l'heure du déjeuner vont me manquer !

Je remercie les filles de biotechno 2007 et les membres actifs de Doc'Up qui m'ont permis de m'épanouir en dehors du laboratoire, ce qui m'a fait le plus grand bien !

Un grand merci à tous mes amis pour leur soutien et pour avoir supporté mes absences et réapparitions, et tous mes coups de blues de thésarde. Je vous en suis éternellement reconnaissante: toute « la communauté », Lolo, Wanwan, Géraldine, Estelle, Rémy, Lorena et Yorgos.

Je tiens à remercier ma belle famille Agnès, Claude et Nicolas, pour leur soutien.

Je remercie du fond du cœur mes parents et mes soeurs sans qui je ne serai jamais arrivée jusque là.

Enfin, un merci tout particulier à Thomas, que j'ai rencontré dans ces couloirs et que je n'ai plus quitté. L'avenir nous appartient !

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse visait à améliorer la compréhension des mécanismes présidant à l'activation du moteur moléculaire assurant l'entrée en division des cellules eucaryotes : le MPF (M-Phase promoting Factor). Pour cela, le modèle d'étude sélectionné a été les divisions méiotiques de l'ovocyte de Xénope. Les ovocytes de Xénope sont naturellement bloqués en prophase de méiose I. En réponse à la progestérone, ils reprennent la méiose et se bloquent à nouveau en métaphase II en attente de la fécondation. Ce processus, appelé maturation méiotique, est sous le contrôle du complexe Cdc2-Cycline B, facteur universel de division des cellules eucaryotes. Nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes régulant l'activité de la kinase Cdc2 au cours de la maturation méiotique.

Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation de Myt1, une kinase de la famille Wee1. Ces kinases catalysent une phosphorylation inhibitrice sur la protéine Cdc2 et sont donc responsables du maintien du MPF sous une forme inactive pendant la phase G2 du cycle cellulaire. L'activation du MPF repose sur la conversion du stock de pré-MPF inactif en stock de MPF actif, suite à la déphosphorylation activatrice de Cdc2 par la phosphatase Cdc25, et à l'inhibition de Myt1. Nous avons montré que l'activité de Cdc2 était nécessaire à l'inhibition de Myt1 et que deux kinases, p90Rsk et Plx1, sont recrutées l'une ou l'autre pour contribuer à cette inhibition.

Dans un deuxième temps, nous sommes intéressés à l'implication de la protéine H-Ras lors de la reprise de la méiose. Nous avons montré que dans l'ovocyte de Xénope, l'injection de H-Ras induit la reprise de la méiose par le recrutement d'une PI3 kinase particulière. Cette voie, bien que présente et activable dans l'ovocyte, n'est pas recrutée *in vivo* par la progestérone en conditions normales.

L'ovocyte est donc équipé de plusieurs voies de signalisation fonctionnellement redondantes, susceptibles de conduire à l'activation du MPF, qui peuvent être recrutées dans des conditions pathologiques pour assurer la reprise de la méiose quand les effecteurs normaux ne sont pas disponibles.

ABSTRACT

The main objective of this PhD work was to unravel the mechanisms allowing the activation of the molecular engine driving entry into mitosis in eukaryotic cells: MPF (M-Phase promoting Factor). For this purpose, meiotic divisions of the *Xenopus* oocytes were selected as a model system. *Xenopus* oocytes are naturally arrested in prophase of the first meiotic division. After progesterone stimulation, they complete the first meiotic division and arrest at metaphase II. This process depends on the activation of MPF (M-phase promoting factor), a complex between Cyclin B and the Cyclin dependent kinase, Cdc2. Our goal was to study the regulation of the Cdc2 kinase during the meiotic maturation process.

We have first studied the regulation of the Myt1 kinase, a member of the Wee1 family. The role of these kinases is to phosphorylate Cdc2 on an inhibitory residue, Y15, hereby maintaining MPF under an inactive state during G2 phase of the cell cycle. We have shown that Cdc2 itself is the central player coordinating Myt1 inhibition. Furthermore, we have demonstrated that either the Mos/MAPK/p90Rsk pathway or Plx1 (the homolog of the drosophila Polo kinase) are recruited by Cdc2 and involved in the inhibition of Myt1.

We then studied the implication of the small G protein H-Ras in the resumption of meiosis. We have shown that the injection of H-Ras in *Xenopus* oocytes induces the resumption of meiosis through the recruitment of a particular PI3 Kinase, independently of its other known effectors, the Raf/MAPK pathway and RalGDS. However, although the H-Ras/PI3K pathway is functional in *Xenopus* oocyte, it is not the physiological transducer of progesterone responsible for meiotic resumption.

In conclusion, altogether these results show that *Xenopus* oocytes can activate functionally redundant pathways that can lead to MPF activation. Some of them are preferentially recruited by progesterone under physiological conditions. The other ones might rescue MPF activation under pathological situations, where the first ones are defectives.

LISTE DES ABREVIATIONS

APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

AMPc: Adénosine Monophosphate Cyclique

Bub : Budding uninhibited by benzamidazole

CAK : CDK Activating Kinase

Cdc : Cell Division Cycle

Cdh1 : Cdc20 Homologue 1

Cdk : Cyclin Dependent Kinase

Chk : Checkpoint Kinase

CHX : Cycloheximide

Cip : Cyclin dependent kinase Inhibitor proteins

CKI : CDK Inhibitor

CSF : Cytostatic factor

D-box : Destruction box

Emi1 : Early mitotic inhibitor

ERK : Extracellular Regulated Kinase

GAP : GTPase Activating Protein

GDI : GDP Dissociating Inhibitor

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

Grb2 : Growth factor receptor bound protein 2

GST : Glutathion S Transferase

GVBD : Germinal Vesicle Breakdown

IBMX : 3' Isobutyl-1-MethylXanthine

IGF-1 : Insuline Growth Factor 1

JNK : Jun Kinase

MAD : Mitogen Arrest Defect

MAP : Microtubule Associated protein

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MBP : Myelin Basic Protein

MEK : MAPK ERK Kinase

MPF : M-phase Promoting Factor

MTOC : Microtubule Organizing Center

NES: Nuclear Export Signal

NLS : Nuclear Localisation Signal

ORC : Origin-Recognition Complex

P90Rsk : p90 Ribosomal S6 Kinase

PDE : Phosphodiesterase

PDK1: 3'-Phosphatidylinositol Dependent Kinase

PH : Pleckstrin Homology domain

PI3K : Phosphatidylinositide 3' Kinase

PKA : cyclic AMP dependent protein Kinase

PKB/Akt : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

PKI : Protein Kinase Inhibitor

Plk : Polo like Kinase (Mammifère)

Plx : Polo like kinase (Xenopus)

PP : Phosphatase

PtdIns : Phosphatidyl Inositol

PtdIns(4,3)P₂ : Phosphatidyl Inositol 3,4-bisphosphate

PtdIns(3,4,5)P₃ : Phosphatidyl Inositol 3,4,5-triphosphate

Ringo : Rapid inducer of G2/M in oocytes

Smc : Structural Maintenance of Chromosome

Scc : Sisters Chromatides Cohesion

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le Cycle cellulaire

Figure 2 : La Mitose

Figure 3 : La régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes

Figure 4 : Accumulation et activation du MPF au cours du cycle cellulaire

Figure 5 : La régulation de Cdc25C au cours du cycle cellulaire

Figure 6 : Structure et régulation de l'APC/C

Figure 7 : Structure du fuseau de division

Figure 8 : Le complexe cohésine

Figure 9 : La séparation des chromatides sœurs en anaphase

Figure 10 : Le point de contrôle du fuseau

Figure 11 : La voie canonique des MAPK

Figure 12 : La voie ERK

Figure 13 : La voie JNK

Figure 14 : La voie p38MAPK

Figure 15 : La voie ERK5 ou BMK1

Figure 16 : L'ovogenèse chez les vertébrés

Figure 17 : Les stades de la vitellogenèse chez le Xénope

Figure 18 : Le profil d'activation du MPF au cours de la maturation méiotique

Figure 19 : La régulation de PKA

Figure 20: La voie de transduction induite par la progestérone

Figure 21 : Mécanisme d'activation initiale du MPF à partir du Cdc2 monomérique

Figure 22 : Formation de l'amorce de MPF actif à partir du pré-MPF

Figure 23 : Expériences de transfert de cytoplasme

Figure 24 : L'auto-amplification du MPF

Figure 25 : La transition métaphase I/métaphase II

Figure 26 : Le complexe Pré-RC

Figure 27 : La structure des Emi

Figure 28 : Le rôle de Erp1/Emi2 dans l'arrêt CSF chez le Xénope

Figure 29 : La sortie de métaphase II

Figure 30 : Alignement des séquences de Myt1 humain et de Xénope

Figure 31 : Structure de Myt1

Figure 32 : La régulation de Myt1, hypothèses

Figure 33 : Mode d'action et structure des petites protéines G

Figure 34 : Modifications post-traductionnelles et adressage à la membrane des protéines de type Ras

Figure 35 : Les effecteurs de Ras dans les cellules en culture

Figure 36 : Activation des PI3Ks de classe I par des récepteurs à activité tyrosine Kinase

SOMMAIRE

CHAPITRE I	4
LE MPF : CHEF D'ORCHESTRE DE LA PHASE M.....	4
1) Les phases du cycle cellulaire	4
a) L'interphase	4
b) La phase M	5
2) Contrôle moléculaire du cycle cellulaire	6
a) Les complexes Cdk-Cyclines	6
b) Les points de contrôle	7
3) Le MPF	8
a) Mise en évidence et composition moléculaire.....	8
b) La synthèse des Cyclines.....	8
c) La régulation de Cdc2 par phosphorylation	9
d) Les régulateurs du MPF	10
• Cdc25	10
• Wee1/Myt1.....	13
e) La sortie de phase M : Dégradation des Cyclines et APC/C	14
4) Organisation d'une division contrôlée.....	15
a) Organisation du fuseau de division.....	15
b) Séparation des chromatides sœurs en anaphase	16
c) Les points de contrôle du fuseau.....	17
CHAPITRE II.....	19
LES MAPK.....	19
1) Présentation générale	19
2) ERK1/2.....	20
3) JUN N-terminal Kinases	22
4) p38MAPKs.....	22
5) ERK5.....	23
CHAPITRE III	24
MPF ET MAPK, DEUX KINASES AU CENTRE DE LA DIVISION MEIOTIQUE ...	24
1) L'ovogenèse et la maturation méiotique.....	24
a) L'ovogenèse.....	24
b) La maturation méiotique chez le Xénope.....	25

c) Le profil d'activation du MPF au cours de la maturation méiotique	25
2) Voie de signalisation déclenchée par la progestérone	26
a) La stimulation hormonale.....	26
b) L'inhibition de l'activité de PKA	27
c) Nécessité d'une néosynthèse protéique.....	28
• Mos	28
• Les partenaires de Cdc2 : Les Cyclines B et Ringo/Speedy	30
d) L'activation initiale du MPF	32
• Démarrer avec une néo-synthèse de Cyclines.....	32
• Démarrer en modifiant la balance Myt1/Cdc25.....	33
e) La boucle d'auto-amplification du MPF	35
3) Etablissement du fuseau de métaphase I et transition métaphase I/métaphase II	37
a) L'activité MPF au cours de la transition MI/MII.....	37
b) Absence de phase S : inhibition des pré-RCs.....	39
4) L'arrêt en métaphase II	40
a) Caractéristiques de l'arrêt.....	40
b) Mos et les composants de la voie MAPK	41
c) Intervention des points de contrôle du fuseau	42
d) Cdk2/Cycline E.....	42
e) Emi/Erp.....	43
5) Sortie de métaphase II : l'activation de l'ovocyte	45
CHAPITRE IV	46
LA VOIE MOS/MAPK ET LE MPF : UNE CONNEXION VIA MYT1 ?	46
1) La famille des kinases Wee1	46
a) Présentation générale.....	46
b) Structure et mode d'action de Myt1.....	47
2) La régulation de Myt1	48
a) La régulation par la voie Mos/MAPK/p90Rsk	49
b) La régulation par les kinases Cdc2 et Plx1	51
c) La régulation par autophosphorylation	52
3) Résultats : Etude de la régulation de Myt1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope	53

a) La kinase Myt1 est hyperphosphorylée au cours de la maturation méiotique indépendamment de la voie Mos/MAPK/p90Rsk	53
b) Rôle de Plx1	55
c) Rôle de la voie MAPK/p90Rsk	56
CHAPITRE V	58
ACTIVATION DE LA MAPK : UN ROLE POUR RAS ?	58
1) Présentation générale des petites protéines G	58
a) Structure des petites protéines G Ras	58
b) Régulation des GTPases Ras : les GEFs et les GAPs	59
c) Modifications post-traductionnelles	59
d) Les effecteurs de Ras	60
• La voie Raf1	60
• La voie RalGDS	62
• La voie PI3K	63
2) Raf1 dans l'ovocyte de Xénope	65
3) Ras dans l'ovocyte de Xénope	66
• Rôle de H-Ras dans la reprise de la méiose	67
• Activation de la voie MAPK en réponse à H-RasV12	68
4) Résultats : Etude de la voie de transduction induite par Xe H-Ras dans l'ovocyte de Xénope	70
a) La voie induite par Xe H-Ras dans l'ovocyte de Xénope	70
b) Quel rôle physiologique pour Xe H-Ras dans la reprise de la méiose ?	72
c) H-Ras et la maturation induite par l'insuline et l'IGF-1	73
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	75
1) H-Ras et la maturation méiotique	75
2) Régulation de Myt1	77
BIBLIOGRAPHIE	80

CHAPITRE I

LE MPF : CHEF D'ORCHESTRE DE LA PHASE M

1) Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases par lesquelles passe une cellule avant de se diviser pour donner deux cellules filles contenant le même patrimoine génétique. Il comprend deux événements majeurs : l'interphase, qui est assimilée à une phase de croissance, et la phase M (Mitose) au cours de laquelle la cellule se divise (Figure 1). La durée du cycle cellulaire varie considérablement d'un type cellulaire à un autre (dix minutes pour les divisions des cellules embryonnaires de *Drosophila*, plusieurs jours pour certaines lignées cellulaires de mammifère) mais reste à peu près constante au sein d'un même type cellulaire.

a) L'interphase

L'interphase comprend trois phases : deux phases G1 et G2 (Gap), entrecoupées par une phase S, de synthèse de l'ADN (Figure 1). Les phases Gap ont une double fonction. Elles permettent à la cellule de préparer l'entrée et la réalisation de la phase suivante (accumulation d'ARNm et de protéines spécifiques aux phases S et M). Elles sont aussi le siège de « checkpoints » ou points de contrôle : les événements qui ont eu lieu pendant les phases précédentes vont être vérifiés. Si un problème survient, ou si une étape ne s'est pas déroulée correctement, des mécanismes de contrôle sont activés et arrêtent le cycle le temps de réparer les défauts détectés. Lorsque les défauts sont trop importants ou irréparables, ces checkpoints peuvent diriger la cellule vers la voie de l'apoptose. L'intervalle entre la fin de la mitose et le début de la phase S, est appelé phase G1. Au cours de cette phase, la cellule contrôle son environnement et sa taille, et pour certaines lignées cellulaires, la ploïdie. Si l'environnement contient les facteurs de croissance appropriés, et si la taille et la ploïdie sont correctes, la cellule s'engage vers la réplication de l'ADN (Phase S). La phase G1 est la seule phase du cycle au cours de laquelle la cellule peut se diriger vers un état quiescent appelé G₀ (G zéro) dans lequel elle peut rester un certain temps avant de reprendre la prolifération, ou de s'engager dans une voie de différenciation ou vers l'apoptose. La phase G2 correspond à l'intervalle entre la fin de la synthèse de l'ADN et le début de la phase M. En fin de G2, la cellule contrôle que la réplication de l'ADN génomique est bien complète et que cet ADN n'est pas endommagé avant de commencer la division. Dans le cas contraire, les checkpoints

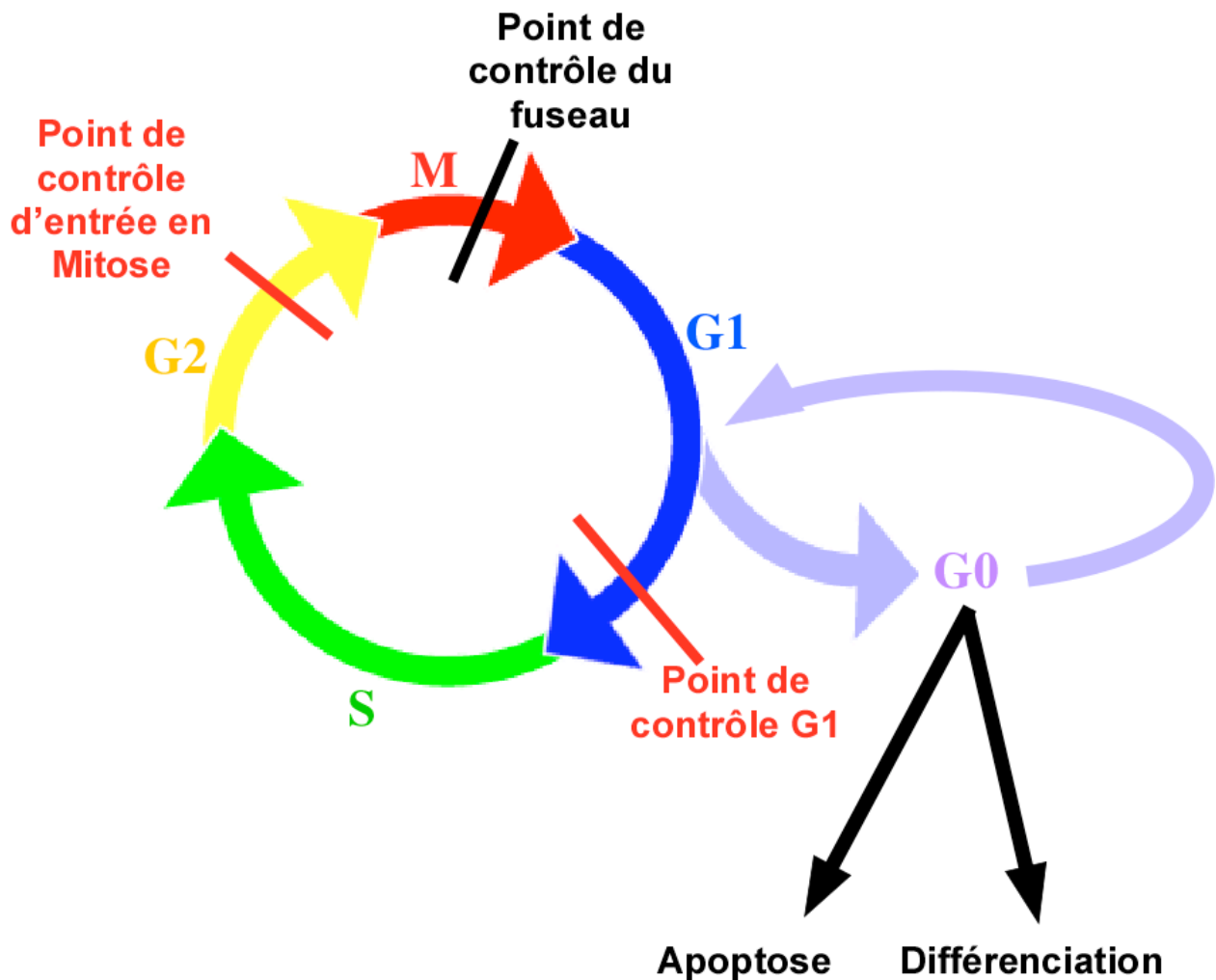


Figure 1 : Le Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases : la phase S (Synthèse : réplication de l'ADN) et la phase M (Mitose : division cellulaire), séparées par deux phases de croissance (Gap : G1 et G2). Les points de contrôle ou checkpoints permettent à la cellule de vérifier le bon déroulement de l'étape précédente. En G1, la cellule choisit entre la progression dans le cycle, et la sortie du cycle vers un état quiescent (G0).

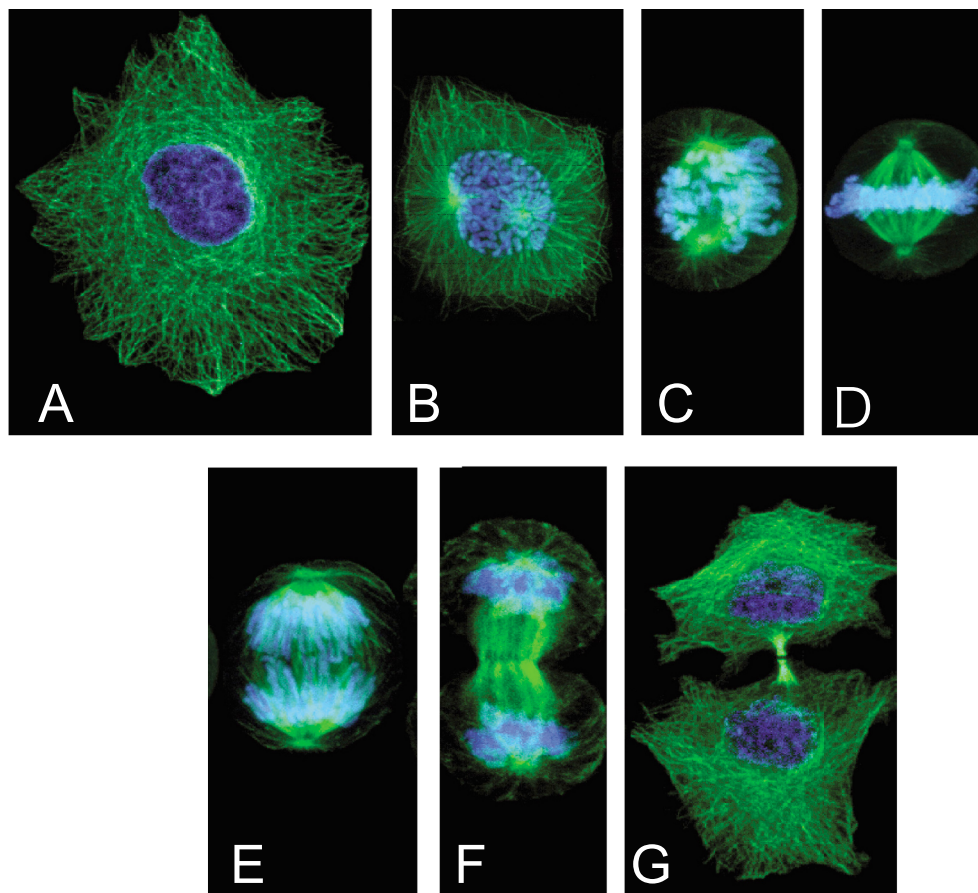
sont activés, arrêtent la progression dans le cycle et lancent un programme d'achèvement de la réplication ou la réparation de l'ADN (Figure 1).

La phase S est la phase pendant laquelle l'ADN et le centrosome sont répliqués. Les chromatides sœurs néoformées restent liées l'une à l'autre à l'issue de la réplication grâce à un complexe protéique de cohésines qui formerait un anneau enserrant les chromatides (voir Chapitre I-4.b).

b) La phase M

Il existe deux types de division cellulaire : la mitose et la méiose. La première est un mode de division dit clonal, non sexué, qui concerne les cellules somatiques. Elle aboutit à la formation de deux cellules filles identiques contenant chacune une même quantité identique de matériel génétique. Sa visée première est l'accroissement en nombre des populations cellulaires. La deuxième concerne les cellules de la lignée germinale. Elle comporte deux divisions successives sans interphase et conduit à la formation de quatre gamètes haploïdes génétiquement différents les uns des autres et de leur cellule mère. Sa visée est de produire un gamète destiné à la fécondation et à la formation d'un nouvel individu génétiquement distinct de ses géniteurs. La méiose sera présentée plus en détail dans le chapitre III.

La mitose est subdivisée en cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. A ces cinq phases, une vision scientifique récente y ajoute une sixième, la cytodierèse, qui commence en cours d'anaphase (Figure 2). Au cours de la prophase, les chromosomes se condensent et les centrosomes migrent de part et d'autre du noyau. La rupture de l'enveloppe nucléaire a lieu pendant la prométaphase. Les chromosomes s'attachent aux microtubules par l'intermédiaire de leur kinétochore, et migrent alors pour s'aligner à l'équateur de la cellule et former la plaque équatoriale, ou plaque métaphasique. La métaphase est caractérisée par l'alignement des chromosomes au niveau de la plaque. Lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés aux deux pôles du fuseau, la perte de la cohésion entre les chromatides sœurs marque le début de l'anaphase. L'anaphase est caractérisée par deux mouvements : l'anaphase A, marquée par la migration des chromatides sœurs vers chacun des pôles, et l'anaphase B, marquée par l'éloignement des pôles du fuseau l'un de l'autre et par conséquent l'allongement de la cellule. Enfin, lors de la télophase une enveloppe nucléaire se reforme au sein de chaque cellule, et les chromosomes se décondensent. Un anneau contractile d'actomyosine se forme, permettant la séparation des deux cellules filles, au cours du processus de cytokinèse (Figure 2).



D'après : Toru Hirota, IMP

Figure 2 : La Mitose

Exemple de la division d'une cellule humaine, visualisée au microscope à fluorescence

A : Interphase; **B** : Prophase; **C** : Pro-métaphase; **D** : Métaphase; **E** : Début d'anaphase; **F** : Fin d'anaphase; **G** : Télaphase

Les microtubules sont visualisés en vert et l'ADN en bleu.

L'initiation et la réalisation la phase M sont contrôlées par un facteur clé, le MPF (pour M-phase Promoting Factor) (Masui and Markert 1971). Sa composition moléculaire et sa régulation seront décrites dans le paragraphe 3.

2) Contrôle moléculaire du cycle cellulaire

a) Les complexes Cdk-Cyclines

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire se fait grâce à l'activation et l'inactivation successives d'une famille de Sérine/Thréonine kinases très conservées au cours de l'évolution, les Cdks (pour Cyclin-dependant kinases) (Morgan 1995). Elles sont régulées par leur association à différents types de Cyclines, chaque complexe Cdk-Cycline jouant un rôle spécifique selon le moment du cycle où ces complexes se forment. Il existe deux types de Cyclines : les Cyclines mitotiques qui se lient aux Cdks pendant la phase G2 et sont nécessaires à l'entrée en phase M, et les Cyclines G1 qui se lient aux Cdks en G1 et sont nécessaires à l'entrée en phase S (Figure 3).

Chez la levure, il existe une seule Cdk (Cdc28 chez *S. cerevisiae*, et Cdc2 chez *S. pombe*), qui est capable de réguler les différentes transitions du cycle en partie grâce à son association avec diverses Cyclines (Nasmyth 1993) (Figure 3). Chez les eucaryotes supérieurs, il a été découvert onze Cdks, qui sont regroupées en deux catégories. Les premières impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Cdk1 ou Cdc2, Cdk2, Cdk4 et Cdk6, ces deux dernières étant redondantes, et Cdk7), et les deuxièmes impliquées soit secondairement dans la progression du cycle soit dans d'autres fonctions cellulaires (Cdk5 est impliquée dans la différenciation neuronale par exemple) (Morgan 1997).

En début de phase G1, la cellule n'exprime aucune Cycline. Si les facteurs de croissance appropriés sont présents dans l'environnement extra-cellulaire, ils stimulent l'expression des Cyclines D qui s'associent à Cdk4 ou Cdk6, et régulent l'expression de petites protéines inhibitrices des Cdks (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, INK...). L'activation des complexes Cycline D/Cdk4 ou 6 conduit à la phosphorylation des protéines de la famille Rb (rétinoblastome), ce qui active les facteurs de transcription E2F et lève l'inhibition transcriptionnelle qui était exercée sur les gènes contrôlés par la famille E2F. La cellule exprime alors une cohorte de protéines impliquées dans la préparation de la phase S, dont la Cycline E. Cdk2 interagit avec la Cycline E en début de phase S et induit l'initiation de la réplication. Lorsque la Cycline E est dégradée, Cdk2 se lie à la Cycline A tout au long de la phase S. Ce complexe joue un rôle dans la réplication de l'ADN. Lors de la phase G2, la Cycline A change de partenaire et

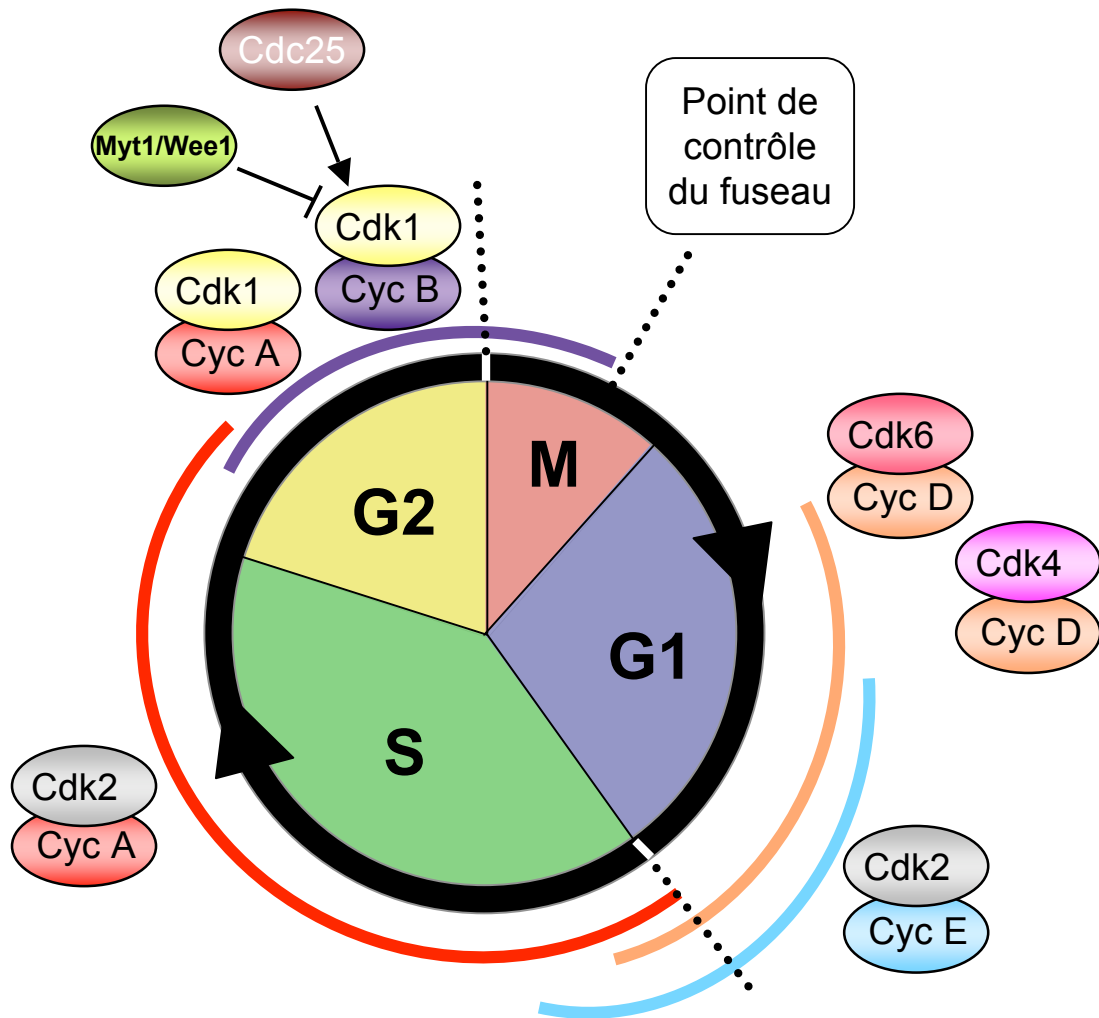


Figure 3 : La régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes

s'associe avec Cdk1. Ce nouveau complexe participerait à l'initiation de la phase M. Mais c'est l'association de Cdk1 avec la Cycline B qui forme le MPF et qui représente le véritable moteur responsable de l'entrée en phase M (Figure 3).

b) Les points de contrôle

La cellule dispose de divers mécanismes de surveillance, appelés points de contrôle ou « checkpoints », lui permettant de s'assurer du bon déroulement du cycle. Ils opèrent à trois étapes du cycle cellulaire (Figure 3), et permettent à la cellule de décider de poursuivre ou non vers la phase suivante (Nigg 2001). Les points de contrôle opèrent selon le scénario suivant : des protéines senseurs contrôlent certains critères donnés (par exemple la présence de cassures double brin de l'ADN, ou l'attachement bipolaire des kinétochores des chromosomes aux microtubule du fuseau). Si un défaut est détecté, ces protéines senseurs lancent une voie de signalisation (par exemple dans le cas des cassures double brin, l'activation des kinases ATM et ATR). Cette voie de signalisation débouche sur l'activation de plusieurs protéines effectrices qui permettent d'arrêter le cycle pour certaines d'entre elles, de réparer les défauts pour d'autres, ou d'engager la cellule vers l'apoptose en cas de défauts majeurs non réparables, tout cela de manière coordonnée. Le premier point de contrôle en G1 vérifie différents critères comme la taille cellulaire, la présence de facteurs nutritifs ou environnementaux et la qualité de l'ADN nucléaire. Une fois le checkpoint franchi, la cellule s'engage sans retour possible dans la phase S jusqu'au prochain point de contrôle qui se situe à la transition G2/M. Lors de ce deuxième point de contrôle, la cellule ne peut entrer en division que sous deux conditions évaluées par le checkpoint : une réplication de l'ADN correcte et totale et l'absence de dommages de l'ADN. Les deux principales protéines effectrices concernées par les points de contrôle G1/S et G2/M sont les kinases CHK1 et CHK2, et la protéine p53. CHK1 et CHK2 sont impliquées dans l'arrêt du cycle en inhibant des membres de la famille des phosphatases Cdc25 qui déphosphorylent et activent les Cdks (Bartek and Lukas 2003). Notons cependant que selon les types cellulaires, d'autres mécanismes moléculaires permettent l'arrêt du cycle en cas d'activation de checkpoint, comme la production d'inhibiteurs de Cdks, tels que p21^{Cip1} contrôlé par p53. Enfin il existe un troisième point de contrôle qui intervient pendant la mitose, en métaphase. Il s'agit du point de contrôle du fuseau qui prévient l'entrée en anaphase tant que deux critères ne sont pas remplis : tous les chromosomes doivent être attachés de façon bilatérale au fuseau mitotique par leur kinétochore, et la tension exercée de part et d'autre du kinétochore doit être équilibrée. Les protéines impliquées dans ce point de contrôle se situent au niveau du

kinétochore et sont assemblées dans un complexe protéique appelé le « core spindle checkpoint » (May and Hardwick 2006). Sa composition sera étudiée plus en détail au paragraphe 4 de ce chapitre.

3) Le MPF

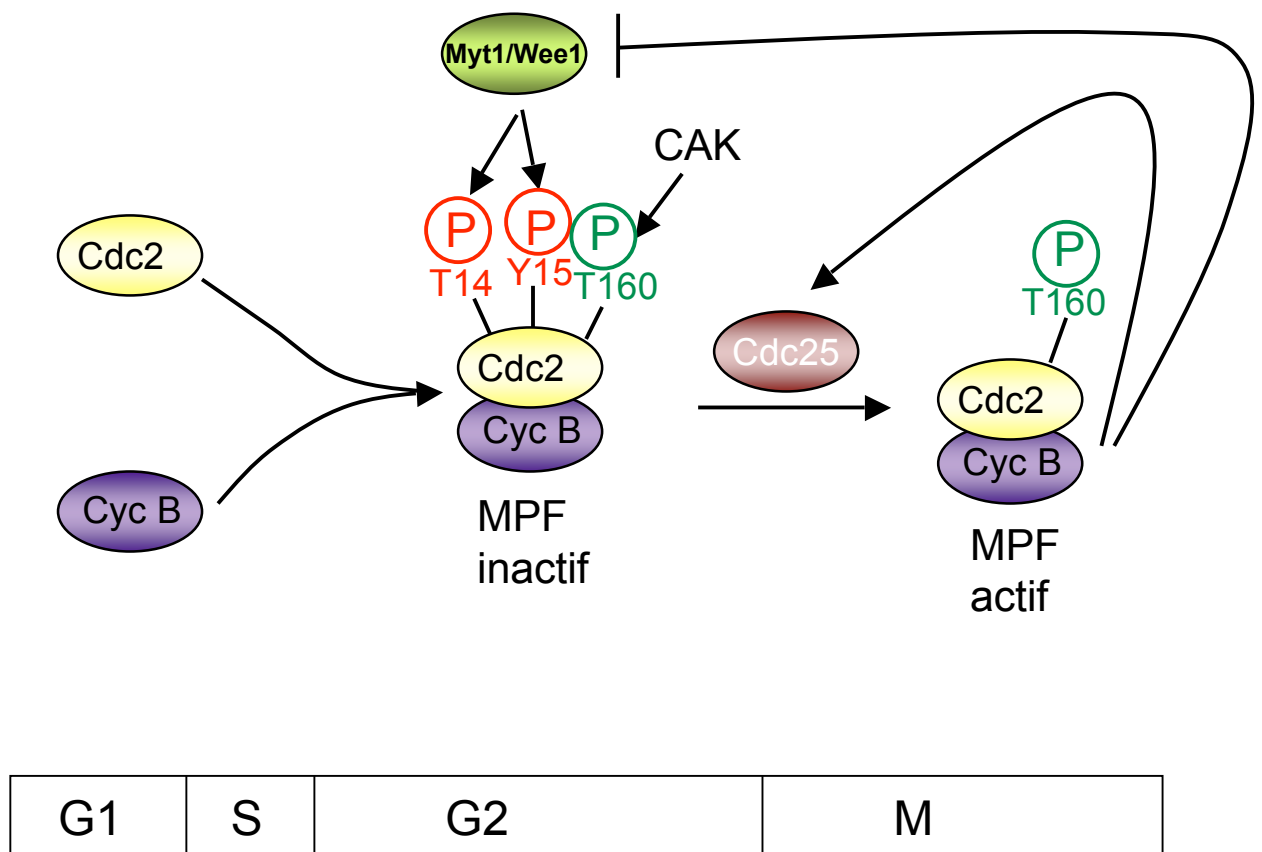
a) Mise en évidence et composition moléculaire

Le MPF est l'inducteur universel d'entrée en phase M. Il a été mis en évidence par Masui et Markert en 1971 (Masui and Markert 1971). Ces auteurs ont montré que l'injection de cytoplasme d'ovocyte de *Rana pipiens* bloqué en métaphase de deuxième division de méiose (donc en phase M) dans des ovocytes bloqués en prophase de méiose I (assimilée à une phase G2) induisait la reprise de la méiose. Cette expérience mettait en évidence l'existence d'un facteur cytoplasmique responsable de la reprise de la division, qu'ils ont nommé MPF pour Maturation Promoting Factor. Les nombreuses études qui ont suivi ont montré que le MPF était responsable de l'entrée en phase M de toutes les cellules eucaryotes, en mitose ou en méiose (Doree 1990). Le MPF est donc devenu M-phase Promoting Factor.

Le MPF est un hétérodimère composé d'une sous-unité régulatrice, la Cycline B, et d'une sous-unité catalytique, la kinase Cdk1/Cdc2 (Figure 4) (Dunphy et al., 1988; Gautier et al., 1988; Lohka et al., 1988; Gautier et al., 1990). Le complexe Cdc2/Cycline B est régulé à deux niveaux moléculaires : par des phosphorylations affectant la kinase Cdc2 et par des variations de la concentration et de la localisation de la Cycline B au cours du cycle.

b) La synthèse des Cyclines

La concentration et la localisation cellulaire de la Cycline B varient tout au long du cycle cellulaire. En phases S et G2, la protéine est accumulée, s'associe à son partenaire Cdc2, et le complexe est localisé dans le cytoplasme. Sa quantité augmente progressivement, et juste avant la mitose, le complexe est brutalement transloqué dans le noyau, un événement nécessaire à l'entrée en phase M (Li et al., 1997). L'importance de cette localisation nucléaire dans le déclenchement de la phase M est sujet à discussion. Il avait été proposé que cet adressage nucléaire soit nécessaire à la progression dans le cycle puisqu'une augmentation prématurée de la concentration en Cycline dans le noyau provoquait une entrée précoce en phase M (Pines and Hunter 1991; Li et al., 1997). Il a plus récemment été proposé que l'évènement crucial déterminant l'entrée en phase M repose sur l'activation du MPF au niveau centrosomal et non pas au niveau nucléaire (Jackman et al., 2003). L'activation du



D'après Arellano et al., 1997

Figure 4 : Accumulation et activation du MPF au cours du cycle cellulaire

MPF se ferait donc en premier lieu dans le cytoplasme (Picard et al., 1991; Ookata et al., 1992) et pourrait même être réalisée en l'absence de noyau (Perez-Mongiovi et al., 2000). Il a pourtant été montré que les centrosomes ne sont pas requis pour l'entrée en phase M (Hinchcliffe et al., 2001). Ils pourraient donc accélérer l'entrée en phase M en augmentant la concentration locale en MPF (Jackman et al., 2003). La relocalisation nucléaire serait importante dans la mesure où la phosphorylation de substrats nucléaires, comme les lamines par exemple, par le MPF est essentielle pour les premières étapes de la mitose. Le début de la mitose est d'ailleurs caractérisé par la phosphorylation de la Cycline sur le signal CRS (Cytoplasmic Retention Signal) (Pines and Hunter 1991) qui contient également la séquence NES (Nuclear Export Signal). Ceci qui a pour conséquence d'inhiber l'export du complexe Cdc2/Cycline B hors du noyau (Fesquet et al., 1993; Devault et al., 1995; Yang et al., 1998; Hagting et al., 1999).

c) La régulation de Cdc2 par phosphorylation

La concentration de Cdc2 est constante tout au long du cycle. Pour être activé, Cdc2 doit être associé à la Cycline et phosphorylé sur un résidu Thréonine conservé au cours de l'évolution (T160 chez l'Homme, T161 chez le Xénope) situé dans la « T-loop » de la kinase. La liaison à la Cycline provoque un changement de conformation du domaine VIII de Cdc2 qui contient cette T-loop, permettant ainsi à la Thréonine d'être phosphorylée par la CAK (Cdk Activating Kinase formée par le complexe Cdk7/Cycline H) (Solomon et al., 1992; Poon et al., 1993; Clarke 1995). Pendant l'interphase, le complexe Cdc2/Cycline B s'accumule donc et est phosphorylé sur la Thréonine activatrice. Parallèlement, ces complexes Cdc2/Cycline B sont inactivés (d'où l'appellation pré-MPF) par deux phosphorylations inhibitrices sur Thréonine 14 et Tyrosine 15 de Cdc2 chez les eucaryotes supérieurs (uniquement sur Tyrosine 15 chez la levure) (Coleman and Dunphy 1994) (Figure 4). Chez la levure *S. pombe* la Thr14 est pourtant conservée, et une phosphorylation peut être observée sous certaines circonstances (Den Haese et al., 1995). La phosphorylation de ces résidus est catalysée par les kinases Wee1 et Myt1 (Pines and Hunter 1991; Parker and Piwnicka-Worms 1992; Mueller et al., 1995a; Mueller et al., 1995b). Le rôle et la régulation de ces deux kinases seront étudiés plus en détail dans le chapitre IV.

Il a été montré qu'une perte de l'activité de Wee1 causait une entrée prématurée en phase M, alors que sa surexpression induisait un blocage en G2 ou un retard dans l'entrée en mitose (Parker et al., 1992; Parker and Piwnicka-Worms 1992; McGowan and Russell 1993; Mueller et al., 1995a). En fin de phase G2, la balance entre les activités des kinases

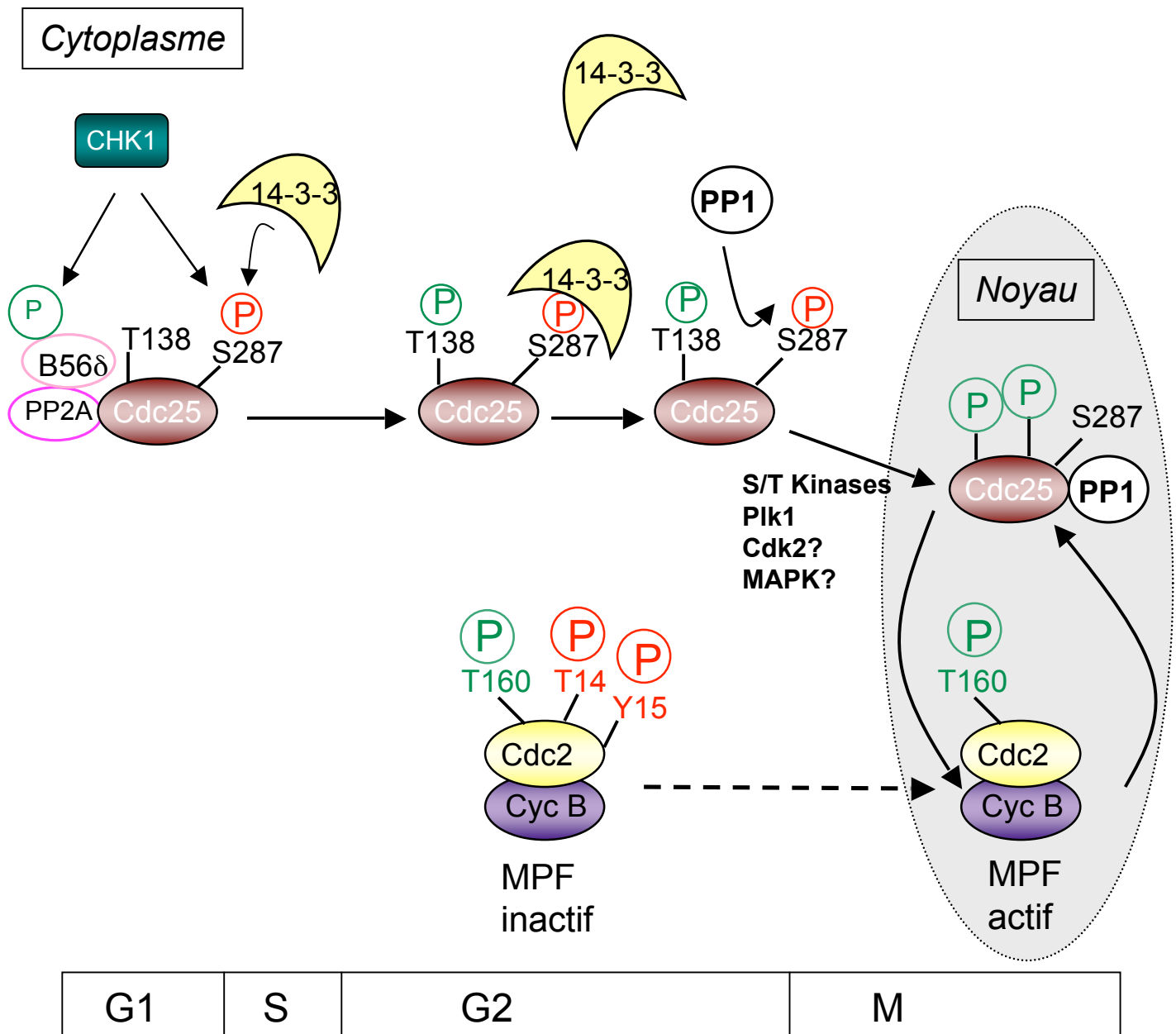
Wee1/Myt1 et de la phosphatase Cdc25 est inversée, et le MPF est déphosphorylé sur Tyrosine 15 et Thréonine 14 (Figure 4) (Dunphy and Kumagai 1991; Gautier et al., 1991; Kumagai and Dunphy 1991). Une fois activé, il provoque l'entrée de la cellule en phase M, et active totalement Cdc25 par un mécanisme d'auto-amplification, créant ainsi un rétrocontrôle positif.

d) Les régulateurs du MPF

Les enzymes Wee1/Myt1 et Cdc25 sont régulées par phosphorylation et dépendent donc de l'activité d'autres kinases et phosphatases. La région N-terminale de ces protéines contient un domaine régulateur riche en motifs Ser/Thr-Pro qui peuvent être phosphorylés à divers moments du cycle. L'extrémité C-terminale contient également de nombreux sites susceptibles d'être phosphorylés. Ces protéines sont hypophosphorylées en interphase, ce qui correspond respectivement à une forte activité de Wee1/Myt1 et à une faible activité de Cdc25. Elles sont hyperphosphorylées lors de l'entrée en mitose.

- **Cdc25**

Cdc25 est une phosphatase à double spécificité puisqu'elle déphosphoryle les Cdks sur les résidus Tyrosine et Thréonine. Son activité est régulée par sa localisation sub-cellulaire (qui dépend en partie de la liaison aux protéines de la famille 14-3-3), par son niveau de phosphorylation, et par dégradation. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de Cdc25 codées par des gènes distincts : Cdc25A, -B, et -C. Cdc25A et B possèdent d'ailleurs plusieurs isoformes issues d'épissage alternatif, ce qui complexifie la situation (Boutros et al., 2006). Des fonctions divergentes au cours du cycle leur ont été attribuées. Cdc25A jouerait un rôle lors de la transition G1/S en régulant préférentiellement Cdk2 (Hoffmann et al., 1994; Jinno et al., 1994), Cdc25B jouerait un rôle dans l'initiation de la phase M et Cdc25C serait impliqué dans la phase M en régulant Cdk1 (Millar et al., 1991b; Hoffmann et al., 1993). Les phénotypes des souris mutantes dans les gènes Cdc25 suggèrent cependant que les trois phosphatases peuvent se compléter mutuellement en cas de déficience de l'une d'entre elles. Par exemple, la délétion simultanée de Cdc25-B et -C est viable chez la souris, indiquant que Cdc25A seule est suffisante pour conduire la cellule à travers tous les stades du cycle cellulaire (Ferguson et al., 2005). Les données récentes suggèrent d'ailleurs que Cdc25A jouerait un rôle dans l'entrée en phase M en plus de son rôle en G1/S (Lindqvist et al., 2005). Cdc25C est néanmoins toujours considérée comme la phosphatase essentielle pour le déclenchement de la phase M (pour revue : (Boutros et al., 2006)). La concentration de



D'après Margolis et al., 2006 (a et b)

Figure 5 : La régulation de Cdc25C au cours du cycle cellulaire

En interphase, la phosphatase Cdc25C est maintenue dans le cytoplasme grâce à sa liaison à 14-3-3 qui dépend de la phosphorylation du résidu Ser287 (Ser216 chez l'Homme) et de la déphosphorylation par la PP2A de la Thr138. A la transition G2/M, Cdc25 est déphosphorylée par PP1 sur la Ser287, et hyperphosphorylée ce qui permet son activation et sa translocation dans le noyau où elle pourra activer le MPF.

Cdc25C est constante tout au long du cycle, alors que celles de Cdc25A et -B varient (Millar et al., 1991a; Millar et al., 1991b; Girard et al., 1992; Millar and Russell 1992; Jinno et al., 1994).

La localisation des trois isoformes varie au cours du cycle cellulaire. Leur localisation est en partie dépendante de la liaison aux protéines de la famille 14-3-3, ainsi que de la présence de signaux d'export nucléaire, NES (Nuclear Export Signal) et de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localisation Sequences). Cdc25A, par exemple, transite en permanence entre le noyau et le cytoplasme (Kallstrom et al., 2005).

La régulation de Cdc25C au cours de la transition G2/M a plus particulièrement été étudiée. Cdc25C inactive est localisée dans le cytoplasme pendant l'interphase grâce à sa liaison avec les protéines 14-3-3 facilitée par la phosphorylation du résidu Ser216 de Cdc25C chez l'Homme (Ser287 chez le Xénope) (Kumagai et al., 1998; Kumagai and Dunphy 1999) (Figure 5). Il a été proposé que la phosphorylation du résidu Ser216 joue un rôle essentiel dans la transition G2/M en contrôlant à la fois l'activité catalytique de Cdc25 (inhibition) et sa localisation cellulaire (dans le cytoplasme, hors de contact avec son substrat Cdc2). La phosphorylation de ce résidu contribuerait donc au maintien de la cellule en G2. Il a été proposé que plusieurs kinases soient responsables de la phosphorylation de ce résidu : CHK1, CHK2, c-TAK-1, PKA, p38 et MAPKAP kinase-2 (Peng et al., 1998; Furnari et al., 1999; Duckworth et al., 2002; Manke et al., 2005). Il est important de noter que la kinase CHK1 assure donc la coordination entre phase S (c'est l'une des kinases du checkpoint G2/M) et l'entrée en phase M (via l'inhibition qu'elle exerce sur Cdc25). Lors de la transition G2/M, la Ser216 est déphosphorylée par la Sérine/Thréonine phosphatase PP1, Cdc25C se dissocie de 14-3-3 ce qui lui permettrait d'une part d'être activée, et d'autre part d'être importée dans le noyau, où elle pourra activer le complexe Cdc2/Cycline B (Kumagai and Dunphy 1999; Margolis et al., 2003; Margolis and Kornbluth 2004; Margolis et al., 2006b). La liaison de 14-3-3 avec Cdc25 empêcherait donc la translocation de Cdc25 dans le noyau (Kumagai et al., 1998; Yang et al., 1999). Bien que le rôle de cette liaison dans la régulation de l'activité catalytique de Cdc25 soit controversé, 14-3-3 masque une séquence de localisation nucléaire. Notons que ce modèle est encore hypothétique et que seules des expériences permettant d'appréhender la localisation dynamique de ces différents acteurs au niveau de la cellule pourront le valider.

En mitose, Cdc25 est hyperphosphorylé (Izumi et al., 1992). Cette hyperphosphorylation a été attribuée à plusieurs kinases dont Cdc2/Cycline B, créant ainsi une boucle d'auto-amplification (Kumagai and Dunphy 1992; Hoffmann et al., 1993). Une

autre kinase responsable des phosphorylations activatrices de Cdc25 est la kinase Polo (polo chez la drosophile, Plk1 chez l'homme, Plx1 chez le Xénope). Chez le Xénope, il a été montré *in vitro* que Plx1 lie l'extrémité N-terminale régulatrice et phosphoryle Cdc25C sur un motif consensus D/E-X-S/T, ce qui l'active (Kumagai and Dunphy 1996; Nakajima et al., 2003). Parallèlement, sa déplétion dans des extraits de Xénope supprime l'hyperphosphorylation de Cdc25C (Karaïskou et al., 1998; Karaïskou et al., 1999). Chez l'Homme, Plk1 est activée simultanément à Cdc2/Cycline B. Plk1 régule Cdc25C en le phosphorylant sur la Ser198 présente dans la séquence NLS (Nuclear Localization Signal) située en N-Terminal, ce qui permettrait le transport de Cdc25C dans le noyau en début de prophase, lorsque l'enveloppe nucléaire est encore intacte (Toyoshima-Morimoto et al., 2002). De plus, il a été montré que la Thr130 (Thr138 chez le Xénope) servait de site de liaison pour le domaine « Polo-Box » de Plk1 (Elia et al., 2003a; Elia et al., 2003b). Cependant, l'activation de Polo n'est pas encore comprise, et serait sous la dépendance de Cdc2/Cycline B (voir chapitre III-2) (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 2004). Une phosphatase sensible à l'acide okadaïque, PP2A, est importante dans ce mécanisme chez le Xénope, puisqu'elle joue un rôle antagoniste de la kinase Polo. Dans les cellules de mammifères, PP2A (liée à la sous-unité B56 β) est activée en réponse aux checkpoints de dommage de l'ADN et lie Cdc25 en interphase. Cette liaison permet la déphosphorylation de la Thr138 et la liaison de 14-3-3, ce qui inactive Cdc25 (Margolis et al., 2006a). Cependant, le mécanisme par lequel la boucle d'auto-amplification entre Cdc25 et Cdc2/Cycline B est amorcée n'est pas encore connu.

De plus, en l'absence de Cdc2 actif et en inhibant une phosphatase sensible à l'acide okadaïque, Cdc25 est toujours phosphorylée et activée (Izumi et al., 1992). Ces observations indiquent qu'une ou plusieurs autres kinases sont impliquées dans l'activation de Cdc25 à la transition G2/M. Des résultats récents montrent que, dans des extraits d'œufs de Xénope, la MAPK phosphoryle Cdc25 sur la thréonine 48, la thréonine 138 et la serine 205 (Wang et al., 2007). De plus, *in vivo* dans les ovocytes de Xénope, la MAPK participe aux phosphorylations activatrices de Cdc25 sur Thr48 et Thr138, au moment de l'activation initiale d'une part (indépendamment de Cdc2) et dans la boucle d'auto-amplification d'autre part (en présence de Cdc2 actif) (Wang et al., 2007). Enfin, ces auteurs ont montré que dans les cellules somatiques de mammifère, les kinases ERKs participent également au système de régulation de Cdc25 pendant la mitose.

- **Wee1/Myt1**

Les kinases de la famille Wee1 ont d'abord été mises en évidence chez la levure *S. pombe* par des études génétiques visant à comprendre le contrôle exercé par la taille de la cellule sur la progression du cycle cellulaire. Elles ont ensuite été clonées chez de nombreux organismes (Levure, Drosophile, Xénope, Souris, Homme) et certains d'entre eux expriment deux formes de Wee1 très proches l'une de l'autre, appelées Wee1A et Wee1B (Russell and Nurse 1987; Igarashi et al., 1991; Mueller et al., 1995a). En plus de Swe1 (appellation de Wee1 chez la levure), la levure exprime une kinase appelée Mik1, dont le rôle n'est pas éclairci, mais qui est activée par les points de contrôle de dommage de l'ADN, et qui pourrait coopérer ou agir de manière redondante avec Wee1 (Lundgren et al., 1991; Furuya and Carr 2003).

Wee1 phosphoryle Cdc2 sur la Tyr15 (Mueller et al., 1995a). Les eucaryotes supérieurs possèdent également une kinase appelée Myt1 capable comme Wee1 de phosphoryler Cdc2 sur Tyr15, mais aussi sur Thr14. Bien qu'aucun homologue de Myt1 n'ait été cloné chez la levure *S. pombe*, la Thr14 est conservée, et la phosphorylation sur Thr14 peut être observée sous certaines circonstances (Den Haese et al., 1995). Wee1 est cytoplasmique tandis que Myt1 est localisée au niveau des membranes intracellulaires (Kornbluth et al., 1994; Baldin and Ducommun 1995; Mueller et al., 1995b).

Wee1 et Myt1 sont régulées par phosphorylation à l'entrée en phase M, mais contrairement à Cdc25, l'hyperphosphorylation de Wee1 et de Myt1 est inactivante (Harvey and Kellogg 2003; Harvey et al., 2005).

Wee1 est régulée en partie par Cdc2. En effet, *in vitro*, il a été montré que Cdc2 pouvait lier et phosphoryler Wee1, et que Wee1 isolée à partir d'extraits mitotiques présentait une faible activité (Tang et al., 1993; Mueller et al., 1995a). Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle il existerait une boucle d'activation où Cdc2 hyperphosphoryle et inactive directement Wee1, un processus augmentant ainsi rapidement l'activité de Cdc2 pour l'entrée en mitose. Chez la Levure *S. cerevisiae*, il a été montré qu'en début de mitose, le complexe Clb2/Cdc28, homologue de Cdc2/Cycline B, lie et phosphoryle Swe1 *in vitro* et *in vivo*. La phosphorylation de Swe1 induirait son inhibition et son décrochage du complexe Clb2/Cdc28 (Harvey et al., 2005). Cependant, la question de l'initiation de la boucle d'auto-amplification reste posée, comme elle l'était pour Cdc25 : comment Cdc2 pourrait-il être actif et phosphoryler Wee1 (ou Cdc25) dans une situation où Wee1 est active (et inhibe donc Cdc2) et Cdc25 est inactif (et n'active donc pas Cdc2) ? Dans des extraits de Xénope déplétés en Cdc2, Wee1 peut être phosphorylée, ce qui montre qu'il doit exister au moins une autre

kinase responsable de cette phosphorylation (Mueller et al., 1995a) et susceptible de lancer la boucle.

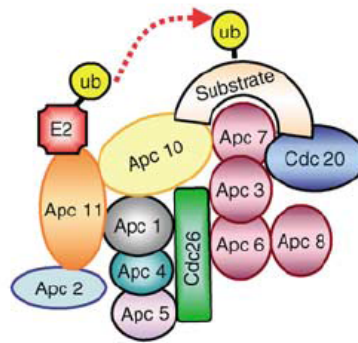
De plus, le niveau des protéines de la famille des Wee varie au cours du cycle cellulaire. Leur niveau augmente pendant les phases S et G2 grâce à une synthèse active, probablement due à une forte augmentation de la transcription. L'activité de Swe1, l'homologue de Wee1 chez la levure, est régulée au niveau protéique chez *S. cerevisiae* tandis qu'elle est principalement régulée par phosphorylation chez *S. pombe* (Coleman et al., 1993; Parker et al., 1993; Tang et al., 1993). La dégradation de Swe1 est dépendante de l'ubiquitine ligase SCF, et se fait par l'intermédiaire de la protéine Met30p (Kaiser et al., 1998). Il a été montré que dans les cellules somatiques, en début de mitose, la phosphorylation de Wee1A par Cdc2 et Plk1 crée un signal de dégradation (ou phospho-dégron) reconnu par le complexe ubiquitine ligase SCF^{βTrCP}. Wee1A est alors ubiquitinée et adressée au protéasome qui assure sa destruction (Watanabe et al., 1995; Harvey and Kellogg 2003; Watanabe et al., 2004; Watanabe et al., 2005). Dans des extraits d'œufs de Xénope, il a également été montré que Wee1A est dégradé de façon SCF-dépendante à l'entrée en mitose (Ayad et al., 2003). Cependant, il semble que Wee1B de Xénope soit stable pendant la phase M (Mueller et al., 1995a; Okamoto et al., 2002).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation de Myt1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope, et les résultats seront présentés au chapitre IV.

e) La sortie de phase M : Dégradation des Cyclines et APC/C

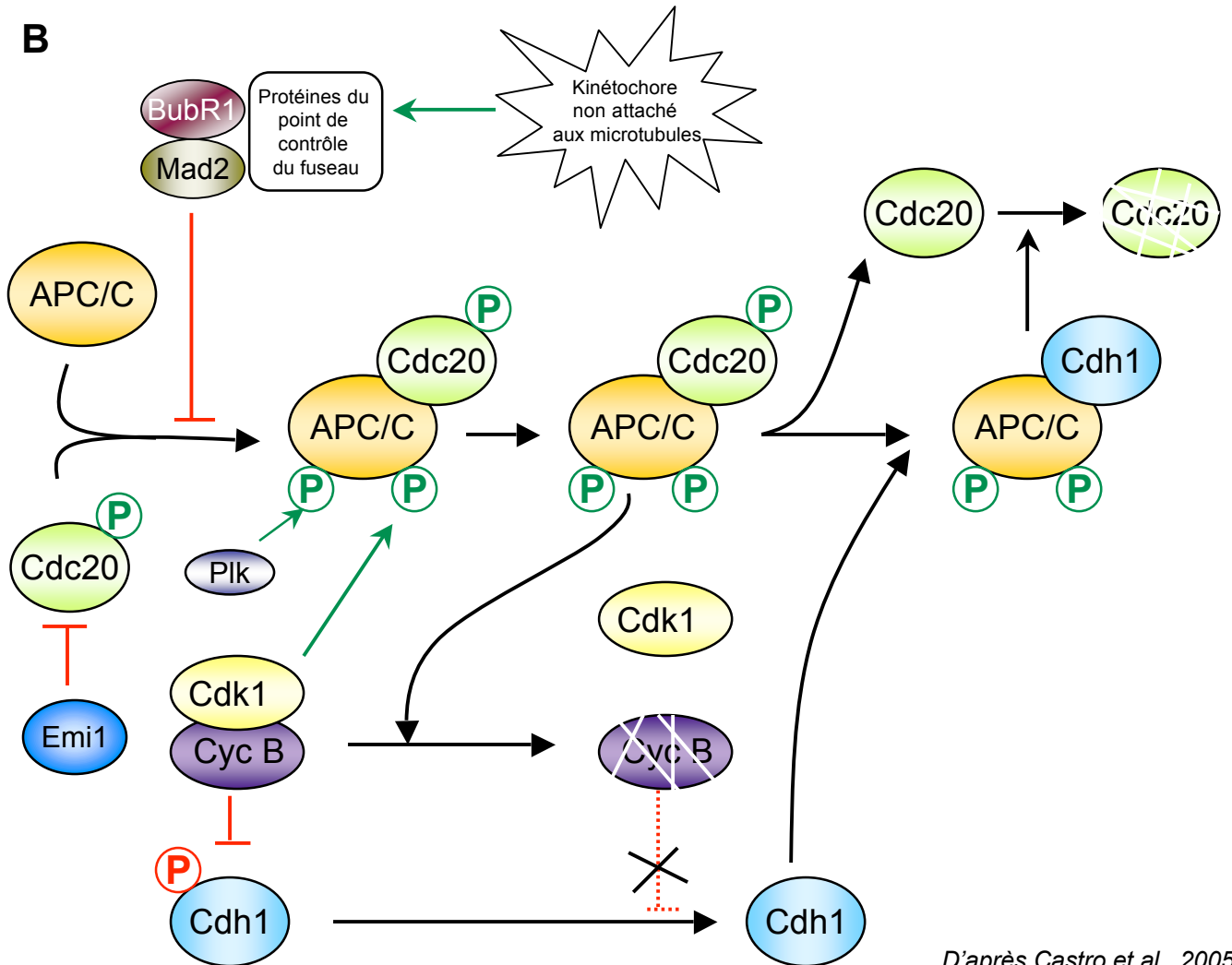
Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité de Cdc2 est régulée par des phosphorylations activatrices et inhibitrices, et par des variations de la quantité de son partenaire, la Cycline. En anaphase, les Cyclines sont poly-ubiquitinées par l'Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) ce qui les adresse au protéasome qui assure leur dégradation (Figure 6). Cette destruction des Cyclines conduit à l'inactivation de Cdc2 et autorise la sortie de mitose. L'APC/C est une ubiquitine ligase (ou enzyme « E3 »), composée d'une douzaine de sous-unités, qui catalyse le transfert de chaînes d'ubiquitine sur des protéines cibles, avec l'aide de deux enzymes, E1 (enzyme d'activation), et E2 (enzyme de conjugaison). L'APC/C est régulée par des phosphorylations de ses sous-unités, effectuées notamment par le MPF, et par son interaction avec diverses protéines telles que Cdc20/Fizzy ou Cdh1/Fizzy-related (Figure 6) (Peters 2002), qui lui confèrent une spécificité vis-à-vis de certains de ses substrats au cours du cycle. Les séquences primaires des protéines cibles de

A



D'après Castro et al., 2005

B



D'après Castro et al., 2005

G2/Prophase	Métaphase	Anaphase-Télophase	G1
-------------	-----------	--------------------	----

Figure 6 : Structure et régulation de l'APC/C

A : L'APC/C est une E3 ligase, composée d'une douzaine de sous-unités Apc. Elle catalyse le transfert de molécules d'ubiquitine sur des substrats spécifiques avec l'enzyme E2.

B : L'APC/C est régulée au cours du cycle par son association à Cdc20 puis Cdh1. En prophase et métaphase, l'APC/C est associée à Cdc20. En fin de métaphase, Cdc20 est remplacée par Cdh1 et dégradée par l'APC/C^{Cdh1}.

l'APC/C possèdent soit une boîte de destruction (D-Box, RxxLxxxN) soit une séquence KEN-Box (Glutzer et al., 1991; Pflieger and Kirschner 2000). Les protéines qui possèdent une D-box seraient détruites avant celles qui contiennent une KEN-box. Les Cyclines possèdent une D-Box, et sont la cible de l'APC/C^{Cdc20}, actif dès la prométaphase (Yamano et al., 1998). La dégradation de la Cycline A précède celle de la Cycline B. L'ubiquitination de la Cycline B pourrait conduire dans un premier temps à son décrochage de Cdc2, et à une chute immédiate de l'activité MPF avant même la dégradation de la Cycline B (Nishiyama et al., 2000). L'inhibition du MPF marque la sortie de la phase M. En anaphase, l'APC/C^{Cdh1} est activé, et conduit à la dégradation de Cdc20 et de Plk1. Il reste actif jusqu'en fin de phase G1 (Figure 6).

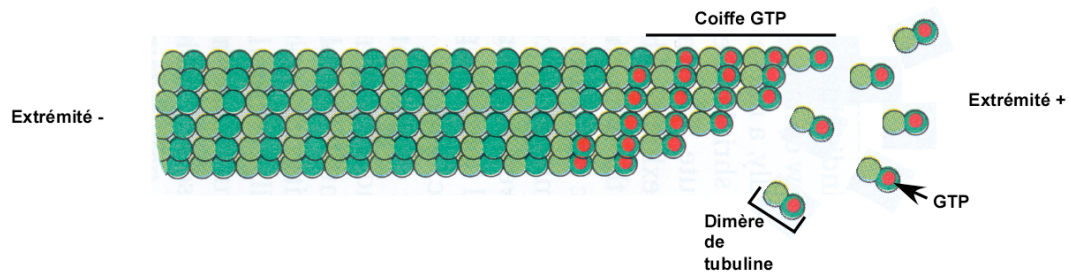
4) Organisation d'une division contrôlée

a) Organisation du fuseau de division

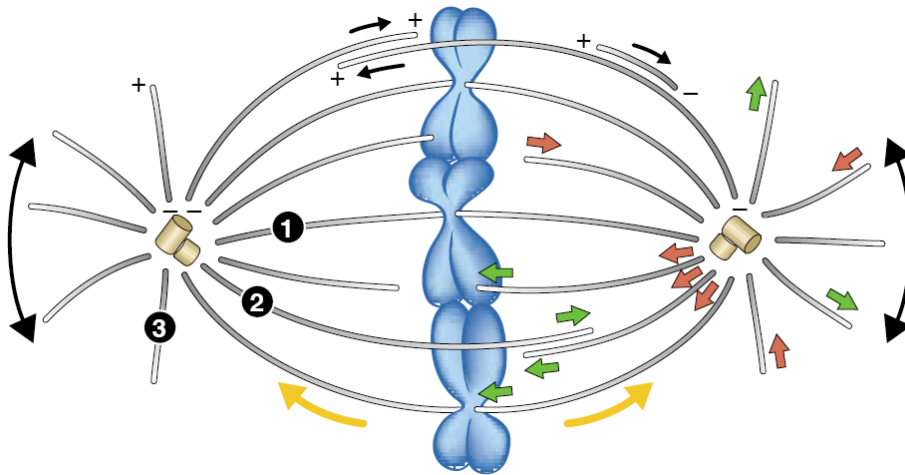
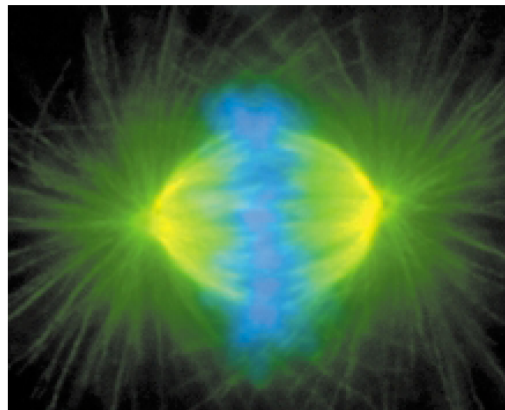
Les événements qui ont lieu au cours de la division, et notamment la séparation des chromatides sœurs, requièrent des éléments dynamiques du cytosquelette. Le fuseau mitotique est l'un des éléments centraux dans le processus. Son assemblage ordonné et dynamique fait intervenir les microtubules et leurs protéines associées.

Les microtubules constituent une cible importante du MPF, puisqu'il a été montré que l'ajout de MPF dans un système *in vitro* de microtubules interphasiques issus d'extraits d'ovocytes de Xénope, provoque sa conversion en un fuseau bipolaire mitotique (Verde et al., 1990; Verde et al., 1991). Cependant, d'autres kinases, certaines d'entre elles sous le contrôle du MPF, participent aussi à l'édification du fuseau, comme les kinases Polo, Aurora, Nek, etc...(Malumbres and Barbacid 2007).

Les microtubules sont des polymères formés de dimères de tubuline (α et β) qui sont orientés : les extrémités « moins » sont ancrées au centrosome et présentent une faible activité de nucléation, tandis que les extrémités « plus » libres ont une forte activité de nucléation (Figure 7). Leur longueur dépend donc de la balance entre les activités de polymérisation et de dépolymérisation de l'extrémité « + ». Les microtubules sont très dynamiques et peuvent passer brutalement d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation. Cette propriété, appelée « instabilité dynamique » (Mitchison and Kirschner 1984), est liée à la capacité de la tubuline à lier le GTP. Seuls les monomères de tubuline liés au GTP peuvent s'ajouter à l'extrémité « + ». Le GTP est ensuite hydrolysé en GDP, de telle sorte qu'un microtubule est

A

D'après Molecular Biology of the Cell, 4ème édition, Garlandscience

B**C**

D'après Wittmann et al., 2001

Figure 7 : Structure du fuseau de division

A : Dynamique de polymérisation des microtubules.

B : Le fuseau de division. 1) Microtubule kinétochorien, 2) Microtubule interpolaire, 3) Microtubule astral. Flèches vertes et rouges : polymérisation et dépolymérisation d'un microtubule respectivement. Flèches jaunes : tension du fuseau.

C : Immunofluorescence d'une cellule en métaphase. Bleu : ADN, Vert : Microtubules, Rouge : TPX2, une protéine du fuseau mitotique, superposition en jaune : microtubules kinétochoriens (marqués à la fois par TPX2 et la tubuline).

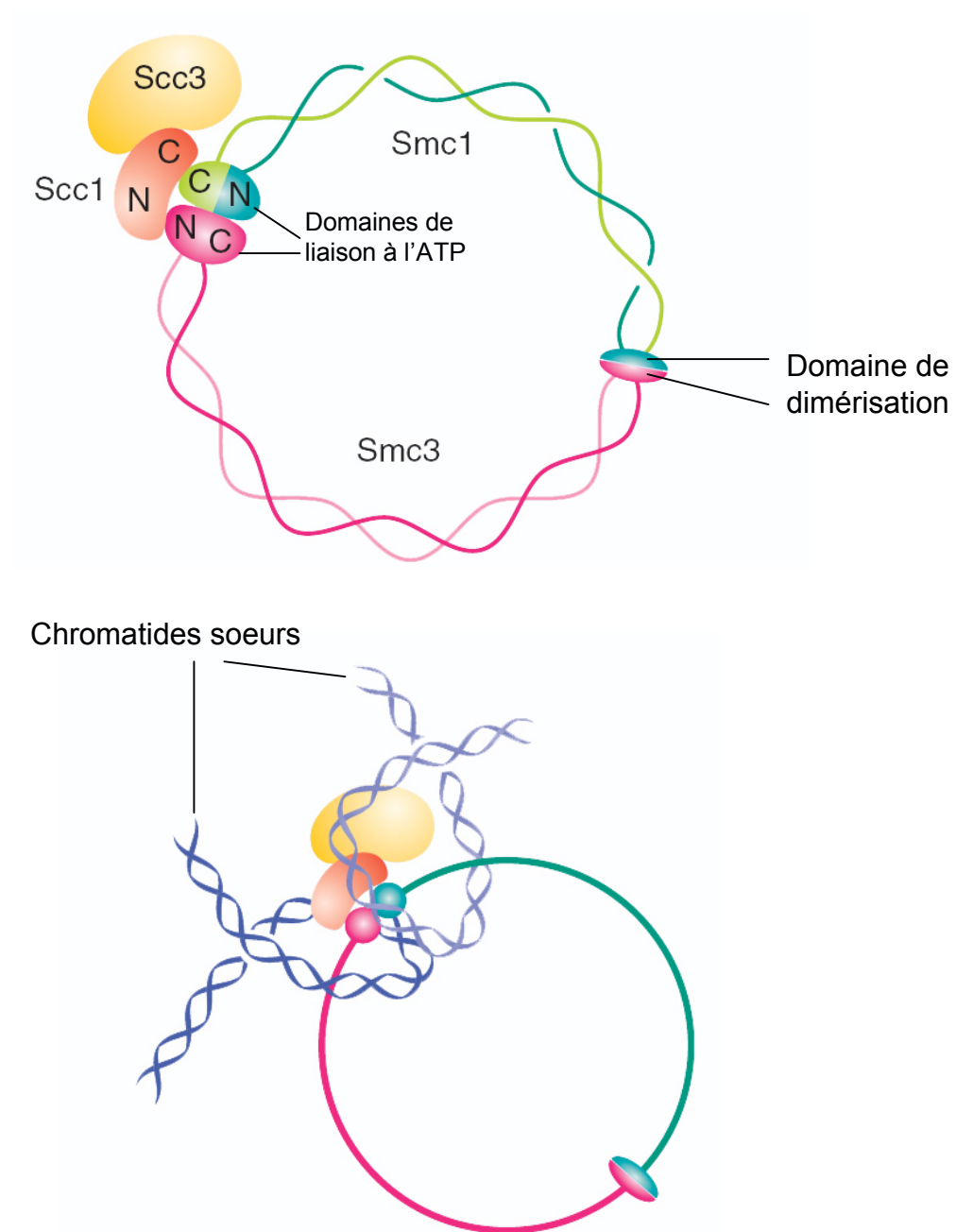
composé de tubuline-GDP sauf à l'extrémité en croissance (coiffe GTP). Si la coiffe GTP se réduit en dessous d'une longueur critique (faible taux de polymérisation), le microtubule peut se dépolymériser brutalement.

Le centrosome est le centre organisateur des microtubules dans la plupart des cellules animales. Il est composé d'une paire de centrioles entouré d'un matériel péricentriolaire opaque aux électrons appelé MTOC (pour Microtubule Organisation Center). Il est dupliqué en phase S et les deux centrosomes se séparent en début de mitose. Le début de la phase M s'accompagne d'une augmentation de la dynamique de polymérisation des microtubules qui deviennent très instables, et se réorganisent pour former le fuseau de division. Les deux centrosomes nucléent des microtubules. Certains d'entre eux, orientés vers la périphérie de la cellule, entrent en contact avec le cortex cellulaire. Ce sont les futurs microtubules astériens, qui resteront courts et permettront l'ancrage des pôles du fuseau au cortex cellulaire. D'autres, situés en vis-à-vis de l'autre centrosome, entrent en contact avec les microtubules issus du centrosome opposé. Ce sont les futurs microtubules polaires qui stabilisent le fuseau et lui confèrent sa bipolarité. Après la rupture de l'enveloppe nucléaire, certains microtubules entrent en contact avec les kinétochores des chromosomes : ce sont les microtubules kinétochoriens. Le fuseau est donc formé de trois types de microtubules (Figure 7) : les microtubules astériens, qui proviennent des pôles et s'étendent vers la périphérie de la cellule, les microtubules interpolaires, qui s'étendent d'un pôle du fuseau à l'autre, et enfin les microtubules kinétochoriens qui proviennent des pôles et qui interagissent à leur extrémité « + » avec le kinétochore. Récemment, il a été proposé que dans certains cas, les microtubules kinétochoriens soient générés par une polymérisation issue des kinétochores (pour revue Karsenti and Vernos 2001).

b) Séparation des chromatides sœurs en anaphase

Il est fondamental pour le maintien de l'intégrité du génome que les chromatides sœurs soient correctement ségrégués dans les cellules filles. En effet, des défauts de ségrégation des chromatides sœurs pendant la mitose sont à l'origine d'aneuploidies.

Après la phase S, les chromatides sœurs nouvellement synthétisées sont maintenues liées l'une à l'autre grâce à un complexe multiprotéique conservé de la Levure à l'Homme : les cohésines (pour revue Nasmyth et al., 2000; Nasmyth 2001). Le cœur de ce complexe est formé de quatre cohésines : Smc1 et Smc3, Scc1 et Scc3 (Figure 8). Les protéines Smc (pour Structural Maintenance of Chromosome) possèdent un domaine coiled-coiled connecté à une extrémité à une tête globulaire de liaison à l'ATP et à activité ATPasique (ABC pour ATP



D'après Uhlmann, 2003

Figure 8 : Le complexe cohésine

Les protéines Smc1 (vert) et Smc3 (rose) sont connectées entre elles, et lient Scc1/3 (jaune et orange) au niveau de leur domaine globulaire de liaison à l'ATP. Ce complexe maintient la cohésion entre les chromatides sœurs jusqu'en anaphase.

Binding Cassette), et à l'autre extrémité à un domaine de dimérisation (Figure 8). Le domaine ABC lie la protéine Scc1, qui elle-même lie Scc3, le tout formant un anneau entourant les chromatides sœurs (Haering et al., 2002).

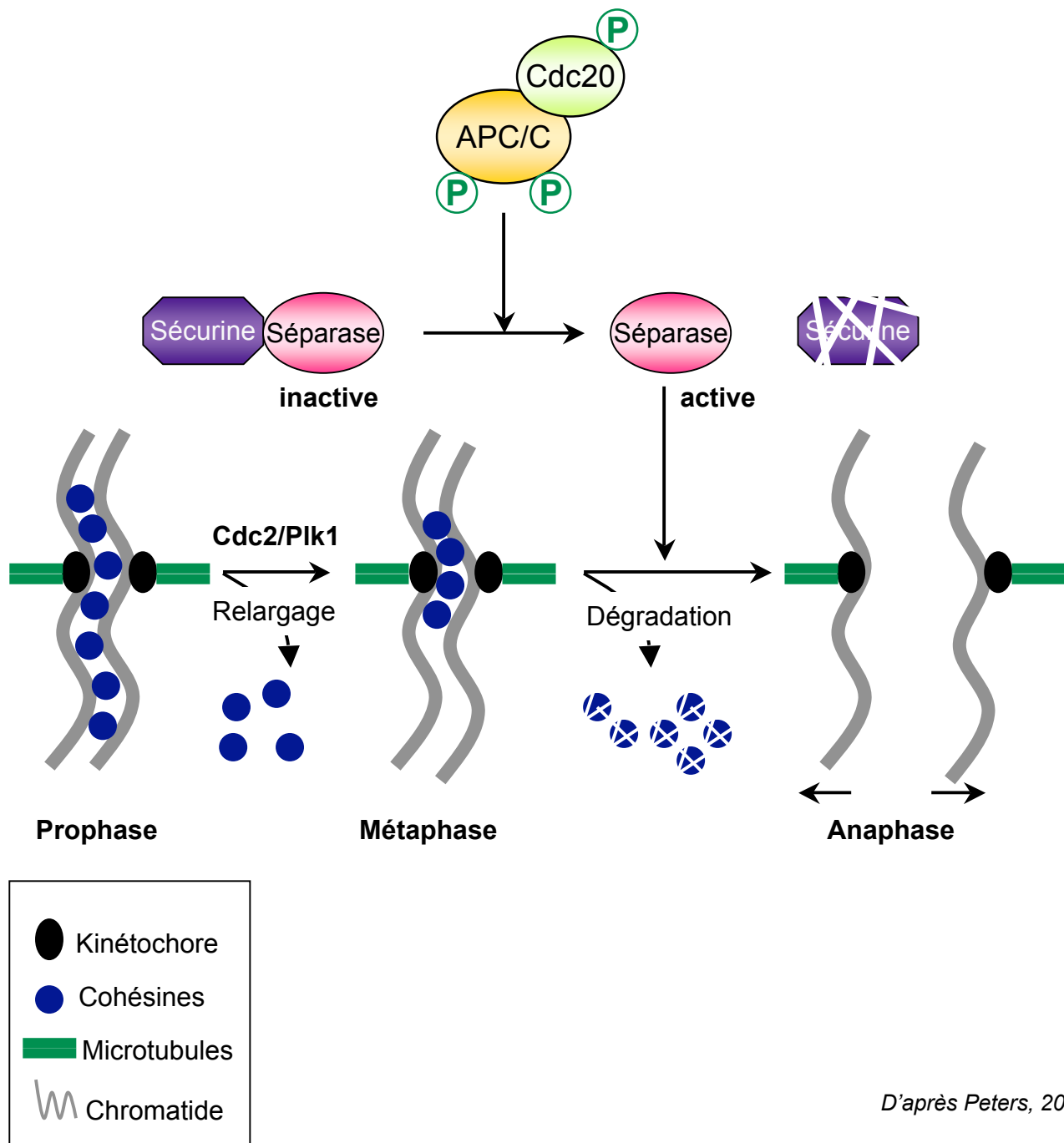
En prophase, les chromosomes se condensent et s'individualisent. Parallèlement, la phosphorylation des protéines Scc1 et Scc3 par Cdc2 et Plk1 (Losada et al., 2000; Sumara et al., 2002), entraîne la dissociation de la majorité des cohésines des bras des chromosomes. Seules les cohésines localisées au niveau des centromères (chromatine hyper-condensée) sont maintenues. En métaphase, la liaison entre les chromatides sœurs est donc assurée uniquement au niveau des centromères (Figure 9).

Une fois que tous chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique et attachés de façon bipolaire aux microtubules kinétochoriens, la cellule peut entrer en anaphase. La dégradation de la cohésine Scc1 par une protéase, la séparase, provoque la libération des cohésines localisées au niveau des centromères (Figure 9). En métaphase, l'activité de la séparase est inhibée grâce à sa liaison avec une protéine appelée Sécurine. En fin de métaphase, l'APC/C ubiquitine la sécurine et la cible au protéasome qui assure sa dégradation. La séparase est alors libérée et provoque le clivage des cohésines centromériques et la séparation des chromatides sœurs qui migrent vers les pôles opposés de la cellule.

c) Les points de contrôle du fuseau

Chaque paire de chromatides sœurs est attachée au fuseau de division via son kinétochore dès la prométaphase. Pendant cette période, un point de contrôle ou « checkpoint » (spindle checkpoint) vérifie la qualité de cet attachement. Il est actif tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur la plaque métaphasique et attachés de façon bipolaire au fuseau de division par leur kinétochore. Si des défauts d'attachement ou de tension de part et d'autre du kinétochore sont détectés, le checkpoint est activé, lance une voie de signalisation qui bloque le passage en anaphase, et laisse ainsi le temps à la cellule de réparer ses défauts. Les protéines du « spindle checkpoint » sont Mad1, Mad2, Mad3 (BubR1 chez les eucaryotes supérieurs), Bub1, Bub3, et Mps1 (Figure 10). Les protéines Mad et Bub ont tout d'abord été identifiées chez la levure par des cribles génétiques de recherche de mutants incapables d'arrêter la progression dans le cycle lorsque le fuseau mitotique est détruit (Alexandru et al., 1999) puis retrouvées chez tous les eucaryotes.

Le point de contrôle a pour cible l'APC/C^{Cdc20}. Lorsqu'il est activé, une cascade de signalisation se met en place entre les différentes protéines Bub et Mad, cascade encore mal connue, mais vraisemblablement initiée par la kinase Mps1 et aboutissant à l'activation de



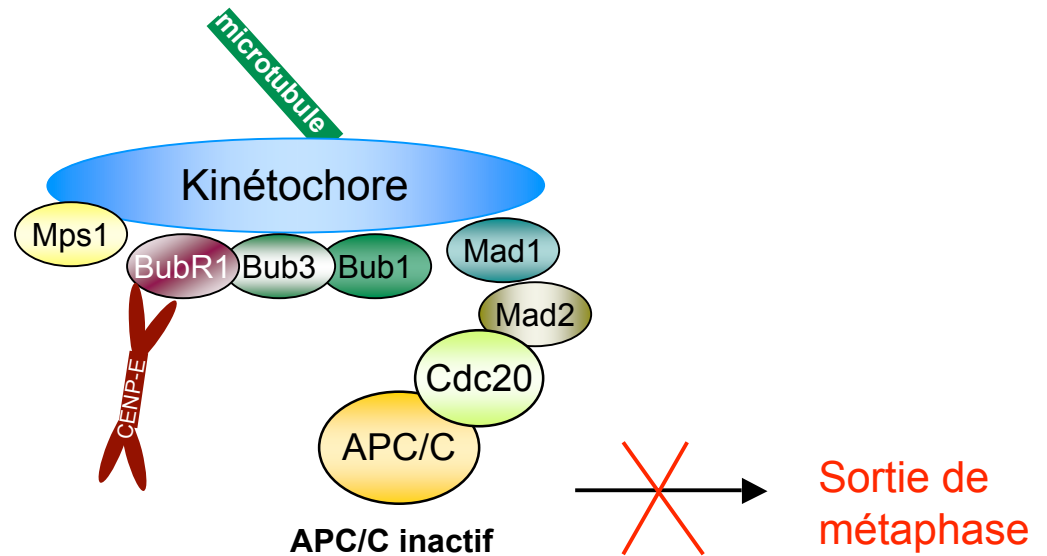
D'après Peters, 2002

Figure 9 : La séparation des chromatides sœurs en anaphase

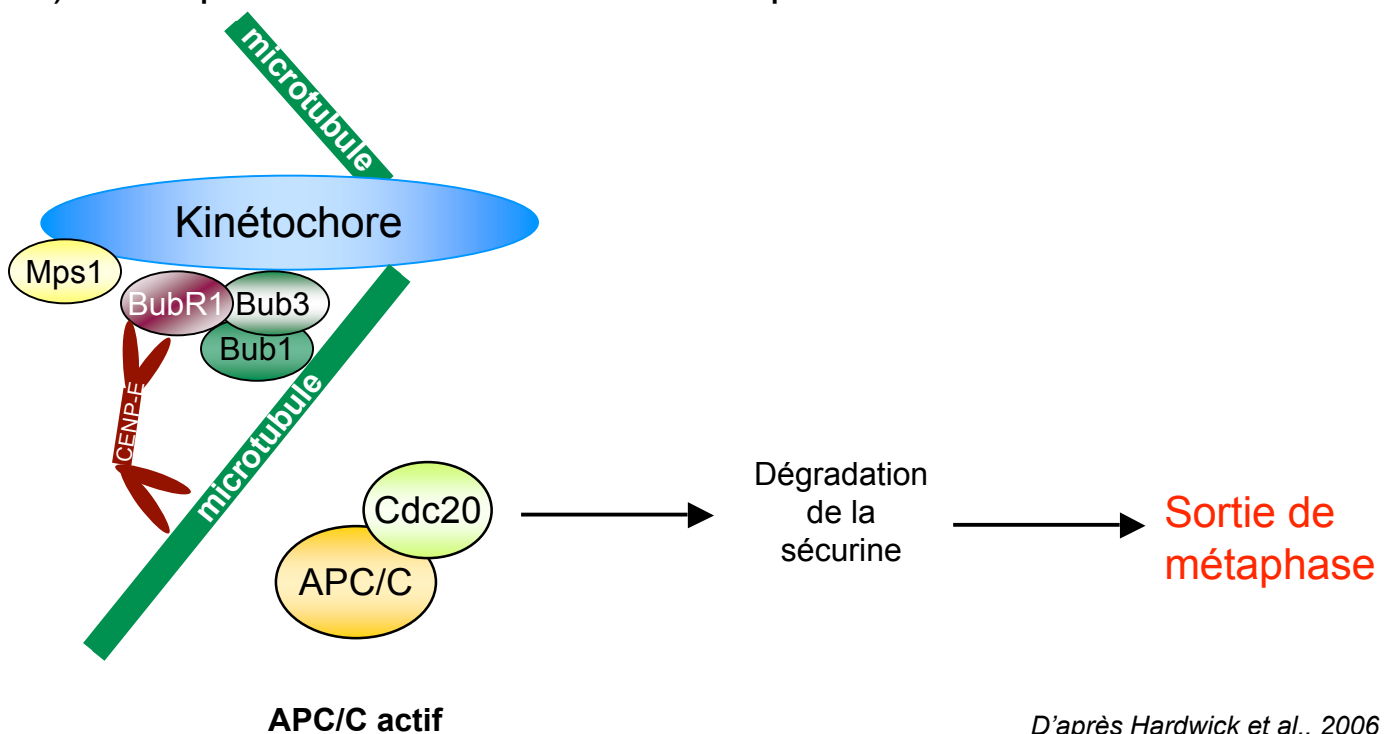
En fin de prophase, les protéines Scc1/3 sont phosphorylées par Plk et Cdc2 ce qui entraîne la dissociation des cohésines des bras des chromosomes. En métaphase, seules les cohésines centromériques maintiennent les deux chromatides sœurs attachées. En fin de métaphase, l'APC^{Cdc20} dégrade la sécurine, la séparase clive alors les cohésines permettant l'entrée en anaphase. En anaphase, les deux chromatides sœurs migrent à chaque pôle du fuseau.

Mad2. Cette dernière protéine se lie à l'APC/C^{Cdc20} et l'inhibe (Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998) : la dégradation de la sécurine n'a donc pas lieu, ce qui empêche les chromatides sœurs d'être séparées, et celle de la Cycline est également bloquée, ce qui prévient toute sortie de mitose. Bien que Mad2 soit un inhibiteur de l'APC/C *in vitro*, l'interaction entre Mad2 et Cdc20 ne semble pas suffisante pour inhiber l'APC/C *in vivo*. Lorsque tous les chromosomes sont attachés de façon bipolaire au fuseau de microtubules, le point de contrôle est inhibé et l'APC/C^{Cdc20} peut dégrader la sécurine puis la Cycline. Ces destructions permettent la libération de la séparase qui peut à son tour dégrader les cohésines, et l'inactivation de Cdc2 qui commande le retour en interphase (Figure 10) (Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998).

1) Checkpoint activé : Présence d'un kinétochore non attaché aux microtubules



2) Checkpoint inactivé : Attachement bipolaire



D'après Hardwick et al., 2006

Figure 10 : Le point de contrôle du fuseau

1) Lorsqu'un kinétochore n'est pas attaché aux microtubules, le point de contrôle du fuseau est activé. Il permet de maintenir l'APC/C inactif et empêche la sortie de la métaphase.

2) Lorsque tous les chromosomes sont attachés au fuseau de manière bipolaire, le point de contrôle est inactivé. L'APC/C n'est plus inhibé et catalyse la dégradation de la sécurine ce qui permet la sortie de la métaphase.

CHAPITRE II

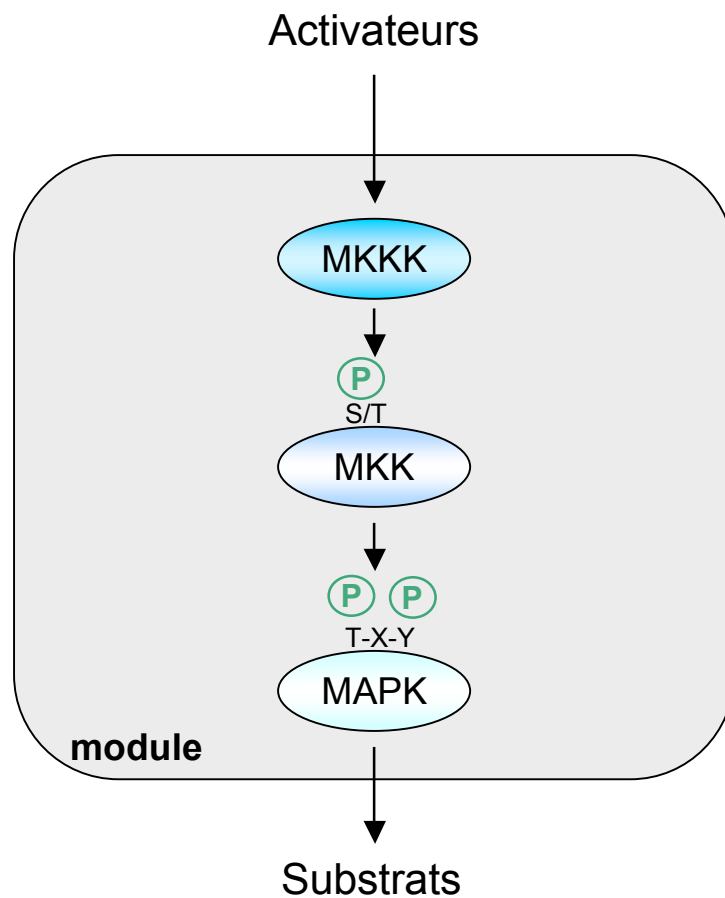
LES MAPK

1) Présentation générale

Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) constituent une famille de protéines kinases dont les fonctions sont conservées au cours de l'évolution, et qui régulent un grand nombre de processus cellulaires physiologiques comme la prolifération, la différenciation, la réponse immunitaire, la réponse aux stress, et l'apoptose (Davis 2000; Chang and Karin 2001; Johnson and Lapadat 2002; Weston and Davis 2002). Des stimuli présents dans le milieu extracellulaire, en particulier plusieurs facteurs de croissance, induisent une séquence de phosphorylations qui aboutit à l'activation des MAPKs. Celles-ci activent alors des effecteurs spécifiques tels que des facteurs de transcription, des phospholipases, d'autres protéines kinases ou des protéines du cytosquelette, ce qui permet à la cellule de répondre aux conditions environnementales par une adaptation adéquate. Les eucaryotes supérieurs possèdent quatre groupes de MAPKs : les p42/p44MAPKs ou ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases), les JUN N-terminal Kinases (JNK1, JNK2 et JNK3), les p38MAPKs (α , β , γ , δ), et ERK5 (Whitmarsh and Davis 1998; Chang and Karin 2001; Pearson et al., 2001).

Les MAPKs sont activées par des MAPK Kinases (MKK, MAPKK ou MEK) par phosphorylation sur une séquence Thr-X-Tyr, très conservée, située dans la T-Loop proche du domaine catalytique. Les MAPKK sont donc des kinases à double spécificité (Thr/Tyr). Les MAPKKs sont elles-mêmes activées par des MAPKK kinases (MAPKKK, MAPKKK ou MEKK) (Marshall 1994). Chaque MAPKK peut être activée par plusieurs MKKK, augmentant ainsi la diversité et la complexité de la signalisation de la voie des MAPK (Figure 11). A l'opposé, les MAPKs sont inhibées par des phosphatases à double spécificité (Thr/Tyr) (Keyse 2000).

Les MAPKs possèdent dans leur séquence des motifs spécifiques qui leur servent de sites de liaison avec d'autres kinases de la voie ou avec des effecteurs moléculaires (Whitmarsh and Davis 1998; Sharrocks et al., 2000; Enslen and Davis 2001). Deux types majeurs de motifs ont été décrits : le premier est un cluster d'acides aminés basiques suivis de la séquence LxL et/ou d'un triplet hydrophobe, le deuxième est un petit peptide contenant la séquence FxF situé en aval de la séquence phosphorylée Ser/Thr-Pro (Yang et al., 2003a). Récemment, d'autres types de domaines de liaison ont été décrits (pour revue Tanoue et al., 2002). Chaque kinase en amont peut donc interagir physiquement avec la kinase en aval pour l'activer spécifiquement. Ceci a pour conséquence que les molécules de la voie colocalisent



D'après Widmann et al., 1999

Figure 11 : La voie canonique des MAPK

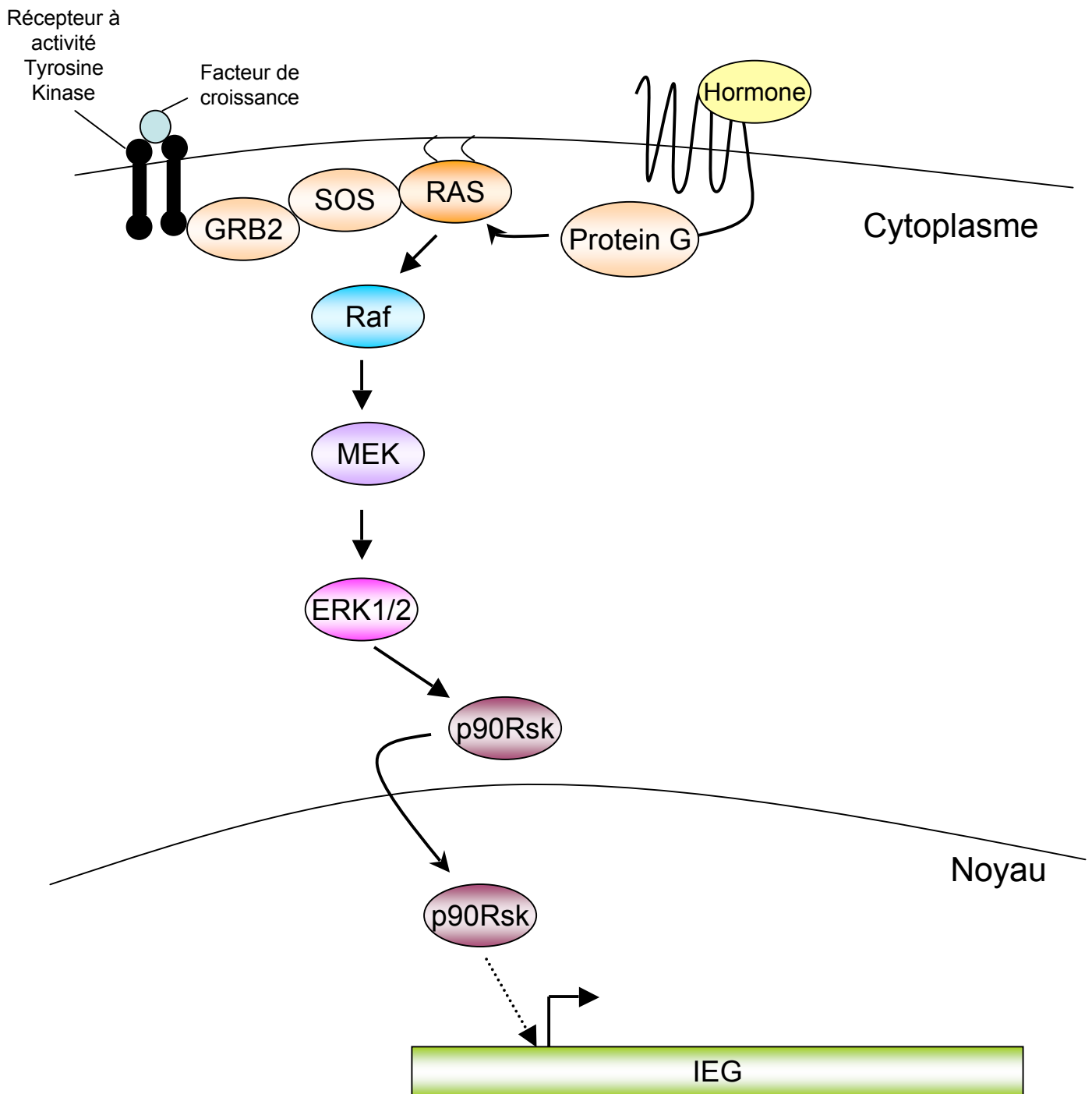
La voie canonique des MAPKs comprend un module composé de trois kinases. Les MAP Kinases (MAPK) sont activées par phosphorylation par les MAP Kinase Kinase (MKK), elles-mêmes activées par les MAPKK Kinases (MKKK). Les trois kinases peuvent s'associer entre elles, ou être rassemblées par des protéines « scaffold », un type d'organisation appelé « module ».

spatialement. Dans certains cas, des protéines « scaffold » peuvent également intervenir pour augmenter la spécificité et amplifier le signal (Garrington and Johnson 1999; Kolch 2005). Les protéines « scaffold » ont la propriété de lier divers composants de la voie, et de créer des complexes multi-enzymatiques qui permettent une activation plus efficace et plus rapide de la voie et la mise en place immédiate de rétrocontrôles. Chez la levure par exemple, la protéine STE5 peut interagir avec la MAPKKK (Ste11p), la MAPKK (Ste7p) et la MAPK (Fus3p/Kss1p) en réponse à un signal physiologique spécifique (Whitmarsh and Davis 1998). Chez les mammifères, plusieurs protéines scaffold ont été décrites : JIP-1 (pour JNK-Interacting Protein 1), qui lie spécifiquement diverses kinases de la voie JNK (Dickens et al., 1997), MP1 qui agirait en liant MAPKK1 et ERK1, MEKK1 (Whitmarsh and Davis 1998), et enfin KSR (Kinase Suppressor of Ras). KSR peut lier tous les membres de la voie ERK/MAPK et permet l'activation de ERK à la membrane plasmique (pour revue Kolch 2005; Claperon and Therrien 2007; pour revue McKay and Morrison 2007).

La conséquence la plus marquante de la mise en route de la signalisation des MAPKs en réponse aux stimuli extracellulaires est la régulation de l'expression de certains gènes (Treisman 1996; Yang et al., 2003a). Pour ce faire, la dernière kinase activée de la voie est transloquée dans le noyau et phosphoryle des facteurs de transcription pré-liés à l'ADN ce qui active la transcription de leur gènes cibles. Cependant, bien que la régulation de l'expression des gènes représente l'une des fonctions importantes de la voie des MAPKs, seulement une partie du pool actif des MAPKs peut se transloquer dans le noyau, la plus grande partie restant dans le cytoplasme ou dans des compartiments intra-cellulaires. Cette fraction des MAPKs agit selon un mécanisme post-transcriptionnel faisant intervenir des cibles situées dans le cytoplasme (par exemple : les protéines du cytosquelette, ou les protéines des voies apoptotiques).

2) ERK1/2

La famille des ERK1/2 intervient dans de très nombreux types cellulaires, et est impliquée dans la régulation de la méiose, de la mitose et de diverses fonctions post-mitotiques (Boulton et al., 1990; Boulton et al., 1991). La voie des ERK1/2 est activée par des stimuli extracellulaires, comme de nombreux facteurs de croissance, des cytokines, les infections virales, des agents transformants, des carcinogènes, ou des ligands de récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques.



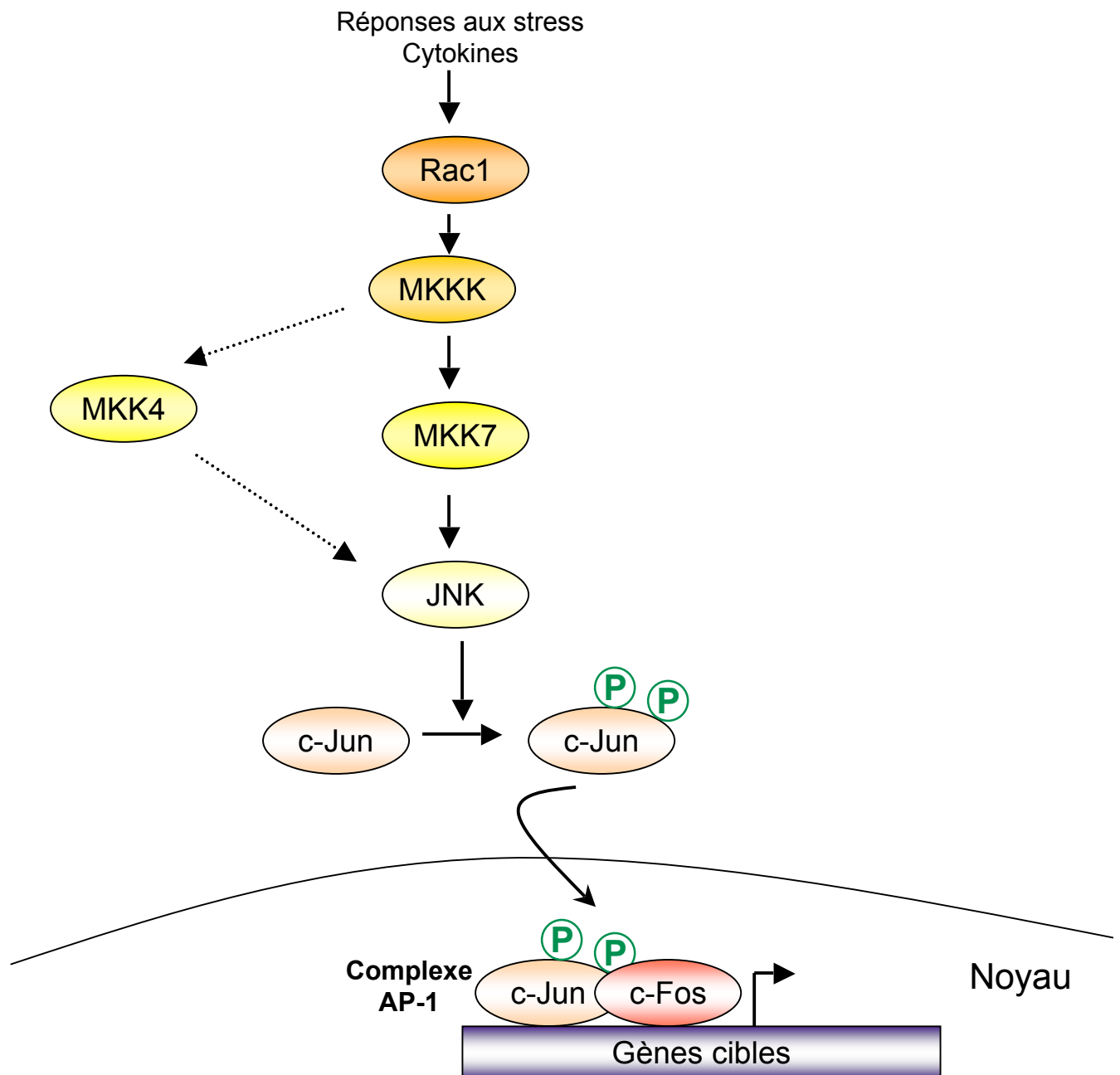
D'après Wellbrock et al., 2004

Figure 12 : La voie ERK

La voie ERK1/2 est impliquée dans la régulation de la division cellulaire et dans diverses fonctions post-mitotiques. Elle est activée en réponse à des stimuli extracellulaires agissant soit sur des récepteurs à activité Tyrosine Kinase, soit sur des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques. IEG: Immediate Early Genes

En ce qui concerne la voie déclenchée par les facteurs de croissance (cas le plus étudié), le scénario général est le suivant : les facteurs de croissance stimulent des récepteurs dont la partie intracellulaire possède une activité tyrosine kinase. La liaison du ligand au récepteur induit l'homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur et augmente son activité Tyrosine kinase. Le récepteur catalyse alors sa propre phosphorylation ou la phosphorylation de ses partenaires (Figure 12). Les motifs Tyrosine phosphorylés du récepteur sont reconnus par des protéines à domaine SH2 qui sont alors transloquées du cytoplasme au récepteur membranaire. Ces protéines à domaine SH2, une fois localisées à la membrane, peuvent interagir avec les protéines à domaine SH3. En particulier, le domaine SH3 de SOS (Son of Sevenless) interagit avec une région riche en proline de la protéine à domaine SH2 Grb2, conduisant à la formation d'un complexe stable. SOS possède une activité GEF (Guanine Exchange Factor) spécifique de la petite protéine G Ras. Son recrutement lui permet d'activer Ras. Sous forme GTP, Ras conduit alors à l'activation des MAPKKK C-Raf1, B-Raf, ou A-Raf (Howe et al., 1992; Kyriakis et al., 1992) sans que le mécanisme moléculaire de l'activation de Raf par Ras soit totalement compris. Les MAPKKK Raf conduisent alors à l'activation des MAPKK MEK1 et MEK2, ce qui résulte en l'activation de ERK1 et ERK2. Ces deux kinases ont pour cible majeure la protéine kinase p90Rsk (p90kD Ribosomal protein S6 Kinase). Dans la plupart des types cellulaires, p90Rsk est transloquée dans le noyau et active la transcription de IEGs (ImmEDIATE Early Genes). Dans les ovocytes de Xénopé, il a été proposé que p90Rsk pourrait induire la progression dans les divisions méiotiques en inhibant la kinase Myt1 (Palmer et al., 1998). De plus, dans ces mêmes cellules, p90Rsk induit l'arrêt en métaphase II en activant le CSF (Cytostatic Factor) (Bhatt and Ferrell 1999; Gross et al., 1999). Ces observations illustrent la diversité des cibles de la voie ERK1/2 selon le contexte où elles sont activées.

Des mutations oncogéniques de Ras ou de Raf ont été décrites dans de nombreuses tumeurs humaines (Davies et al., 2002). La version oncogénique de Ras peut activer la voie des ERK1/2 de manière constitutive et contribuer à l'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses (Wood et al., 1992). Des traitements anticancéreux faisant intervenir des inhibiteurs de cette voie, commencent à être utilisés en médecine humaine. Ils agissent en augmentant l'apoptose et/ou en limitant la prolifération des tumeurs.



D'après Weston et Davis, 2007

Figure 13 : La voie JNK

La voie des Jun Kinases est activée en réponse aux stress et à différentes cytokines. Les cibles ultimes de cette voie sont des protéines de liaison à l'ADN, qui agissent en régulant la transcription de gènes cibles.

3) JUN N-terminal Kinases

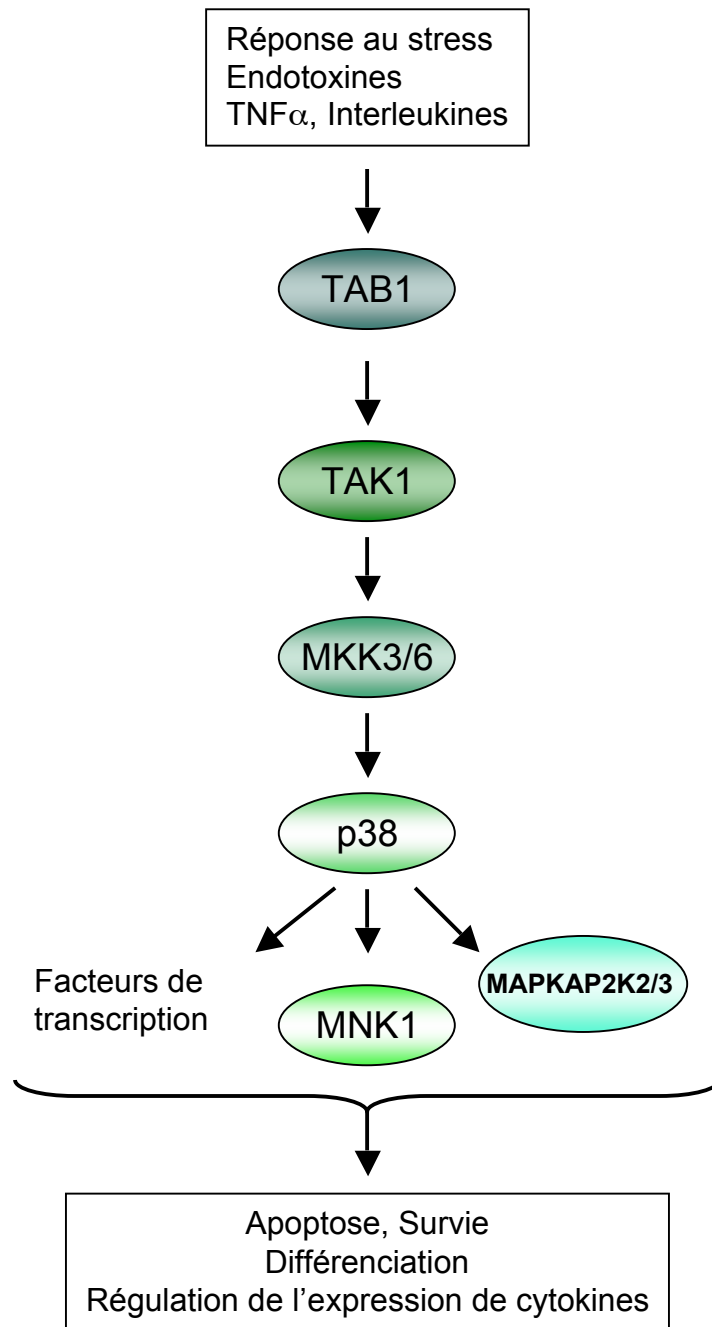
Les Jun kinases (JNK pour c-Jun N-terminal Kinase) sont activées en réponse à différents stress et à de nombreuses cytokines (Kyriakis et al., 1994). Elles peuvent lier et phosphoryler la protéine de liaison à l'ADN c-Jun (d'où leur nom) qui fait partie du complexe de transcription AP-1, et ainsi réguler la transcription de nombreux gènes.

La voie canonique des JNK est bien caractérisée. Les MAPKKKs peuvent être activées en réponse à divers stimuli (Figure 13) (Davis 2000; Bogoyevitch and Kobe 2006). Elles phosphorylent et activent à leur tour les MAPKKs, MKK4 et MKK7, qui phosphorylent JNK sur le motif Thr-Pro-Tyr et l'activent. MKK4 est activée par un stress environnemental, tandis que MKK7 est activée par des cytokines. La petite protéine G Rac1 est impliquée dans l'activation des MAPKKKs. Enfin, JNK phosphoryle c-Jun sur deux sites spécifiques, Ser-63 et Ser-73, et permet l'activation de la transcription des nombreux gènes sous le contrôle du complexe AP-1 (Davis 2000; Bogoyevitch and Kobe 2006; Weston and Davis 2007).

4) p38MAPKs

La famille des p38MAPKs possède quatre membres : α , β , δ , γ , qui partagent un haut degré d'homologie de séquence. Les p38MAPKs jouent un rôle dans la réponse aux stress environnementaux, comme l'hyperosmolarité, les UV, les chocs thermiques et l'inhibition de la synthèse protéique, mais elles sont aussi activées par les endotoxines, $\text{TNF}\alpha$ et les interleukines (Derijard et al., 1994; Wang et al., 1997; Mittelstadt et al., 2005; Cuenda and Rousseau 2007). La voie de signalisation des p38MAPKs est impliquée dans l'apoptose, la survie, la différenciation, la régulation de l'expression de nombreuses cytokines (Figure 14).

L'activation de p38MAPK dépend initialement d'une protéine qui n'est pas une MAPKKK : TAB1 (transforming growth factor β -activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein 1). TAB1 se lie à TAK1 et semble être une protéine « scaffold » ou un adaptateur sans activité catalytique. Les p38MAPKs sont activées par phosphorylation sur les résidus Tyrosine et Thréonine de leur motif Thr-Gly-Tyr principalement par les MAPKKs MKK3 et MKK6, et dans certains cas MKK4 (Brancho et al., 2003; Mittelstadt et al., 2005). Les cibles des p38MAPK sont nombreuses. Ce sont principalement des régulateurs impliqués dans la réponse au stress, des facteurs de transcription, et des kinases comme la MAPKAP2K2/3 (MAPK Activated Protein 2), MNK1/2 et MSK1/2 (Cuenda and Rousseau 2007).

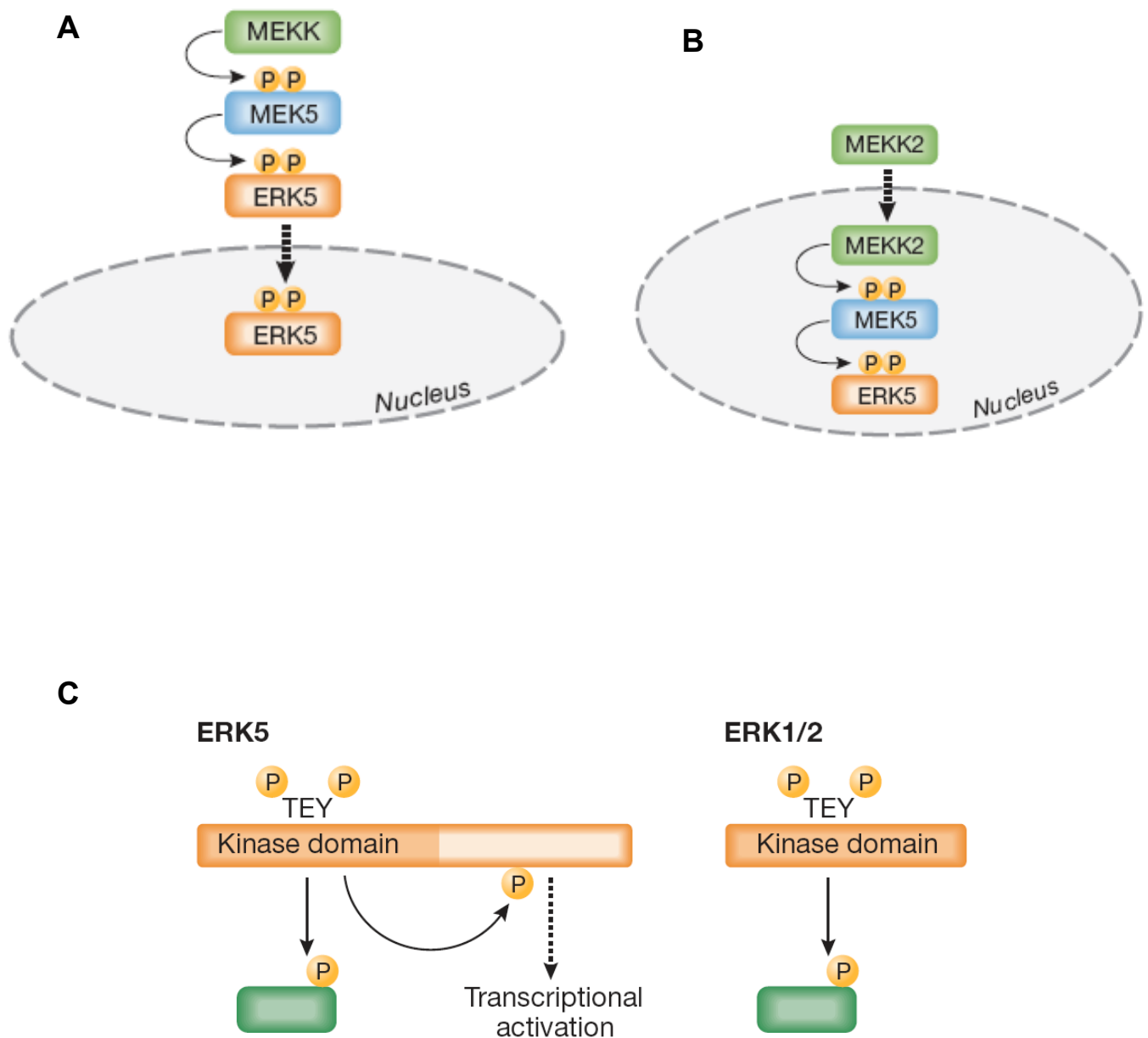


D'après Johnson et al., 2002

Figure 14 : La voie p38MAPK

5) ERK5

ERK5 est aussi connue sous le nom de BMK1 (Big MAP Kinase 1), ce nom venant du fait qu'elle est deux fois plus grosse que les autres MAPKs (Lee et al., 1995; Zhou et al., 1995; Nishimoto and Nishida 2006). La partie N-terminale de la protéine contient le domaine kinase, qui est similaire à ERK1/2 et la T-loop, alors que la partie C-terminale représente une extension originale et possède une propriété d'activation de la transcription (Figure 15). La voie ERK5 est activée par des stress environnementaux mais aussi certains facteurs de croissance comme NGF (Nerve Growth Factor) et a un rôle dans la prolifération cellulaire et la différenciation. Après stimulation, MEKK2 et MEKK3 activent MEK5, une MAPKK spécifique de ERK5. MEK5 active ERK5 qui peut phosphoryler des facteurs de transcription (c-jun, c-fos) et activer la transcription des IEGs, ou phosphoryler des substrats de la voie ERK1/2 (Figure 15). Il existe de nombreuses similarités entre les voies ERK1/2 et ERK5. Néanmoins les ERK1/2 ne possèdent pas une extrémité C-terminale analogue à celle des ERK5. Or il a été montré que cette région est requise pour une activation maximale des facteurs de transcription AP1, c-fos, Fra1, des PPAR γ 1, et de MEF2. Sa délétion conduit à une forte diminution de l'activité transcriptionnelle. Enfin, l'extrémité C-terminale seule a la capacité d'augmenter l'activité transcriptionnelle (Kasler et al., 2000; Nishimoto and Nishida 2006). Le mécanisme d'action d'ERK5 présenterait donc l'originalité de combiner les effets d'une kinase et d'un facteur de transcription, et est donc clairement distinct de celui de la voie ERK1/2.



D'après Nishimoto et Nishida, 2006

Figure 15 : La voie ERK5 ou BMK1

A et B : Deux mécanismes de transmission du signal du cytoplasme vers le noyau. ERK5, MEK5 et MEKK2 peuvent se transloquer du cytoplasme vers le noyau.

C : Comparaison entre les voies ERK1/2 et ERK5. L'originalité de la voie ERK5 est que cette protéine combine les effets d'une kinase et d'un facteur de transcription.

CHAPITRE III

MPF ET MAPK, DEUX KINASES AU CENTRE DE LA DIVISION MEIOTIQUE

La méiose femelle est l'étape finale de l'ovogenèse qui représente l'ensemble des processus qui vont conduire à l'obtention de gamètes haploïdes. La méiose est composée de deux divisions cellulaires successives sans phase S intermédiaire.

1) L'ovogenèse et la maturation méiotique

a) L'ovogenèse

Chez les vertébrés, l'ovogenèse est le processus aboutissant à la production d'un gamète haploïde fécondable, l'ovocyte, à partir d'une cellule germinale diploïde femelle. L'ovogenèse a lieu majoritairement dans les ovaires et commence dès l'embryogenèse (Figure 16). Les cellules germinales primordiales colonisent tout d'abord les gonades et se divisent alors activement par mitoses. Ces cellules qui prolifèrent par mitose dans l'ovaire sont appelées ovogonies. Après un certain nombre de cycles de divisions, les mitoses s'arrêtent, les ovogonies répliquent une dernière fois leur ADN lors d'une phase S très longue, appelée phase S pré-méiotique, et entament la méiose. Elles deviennent alors des ovocytes primaires (ovocytes I). Les ovocytes I contenant une quantité $4n$ d'ADN entrent en prophase de première division méiotique, effectuent les étapes leptotène, zygotène et pachytène et se bloquent au stade diplotène : la cellule est pourvue d'un noyau volumineux appelé vésicule germinative et contient des chromosomes partiellement décondensés, les homologues paternels et maternels étant associés au niveau des chiasmas qui ont permis les échanges d'ADN lors du pachytène. Ce blocage en prophase I est universel chez toutes les espèces animales, mais sa durée varie selon les espèces : quelques mois chez le Xénope, plusieurs années chez la femme.

Au cours de ce blocage en prophase, l'ovocyte synthétise et accumule une grande quantité de matériel nécessaire au développement futur de l'embryon : ARNm, protéines, et des réserves énergétiques sous forme de vitellus chez les ovipares, ce qui provoque une augmentation de la taille de la cellule. Chez le Xénope, l'ovocyte en début de vitellogenèse mesure $50\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, et atteint $1,2\text{mm}$ en fin de croissance, en corrélation avec la pigmentation d'une partie de l'ovocyte (hémisphère animal) (Figure 17). Ces critères de taille

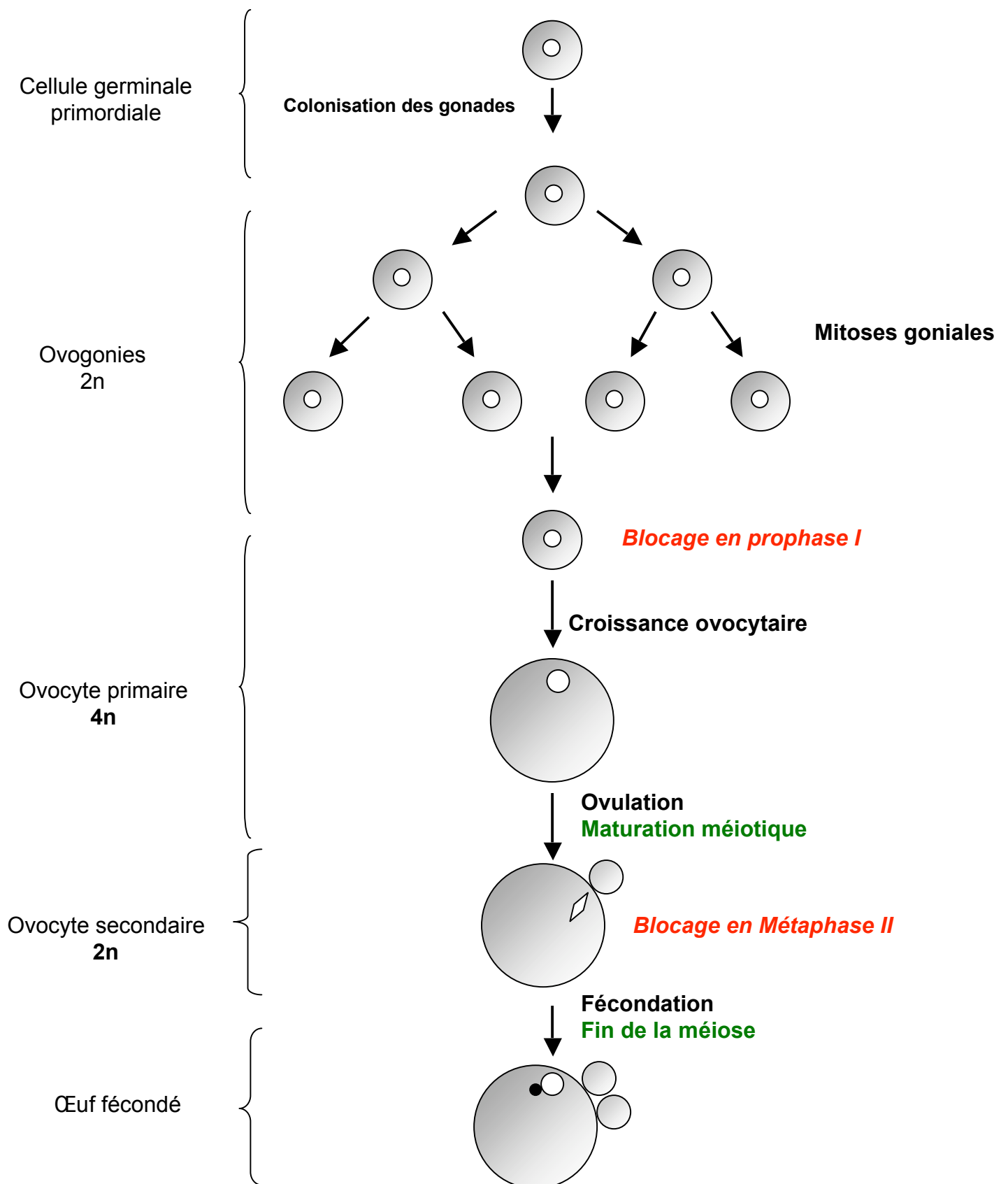
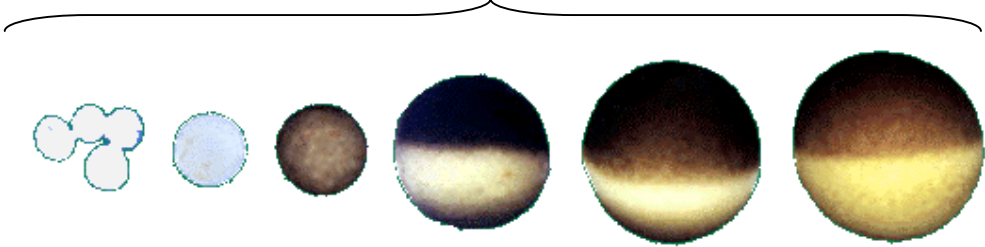
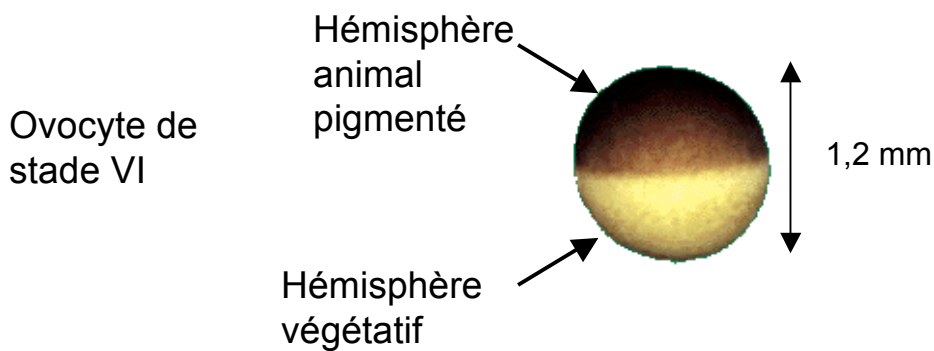


Figure 16 : L'ovogenèse chez les vertébrés

Blocage en prophase I

						
Stades de la vitellogenèse	I	II	III	IV	V	VI
Diamètre de la cellule	50-300µm	300-450µm	450-600µm	0,6-0,8 mm	1 mm	1,2 mm



D'après : [www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/xenooogen .htm](http://www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/xenooogen.htm)

Figure 17 : Les stades de la vitellogenèse chez le Xénope

et de pigmentation ont été utilisés pour définir six stades de croissance chez cette espèce (Dumont 1972). A partir du stade V, l'ovocyte devient compétent à reprendre la méiose sous l'effet de la stimulation hormonale déclenchant l'ovulation. Il a été montré que l'acquisition de la compétence dépend en partie de l'expression dès le stade V, d'une protéine essentielle à la boucle d'auto-amplification, la kinase Plx1 (Jesus and Ozon 2004; Karaïskou et al., 2004).

b) La maturation méiotique chez le Xénope

Les ovocytes de Xénope sont de grosses cellules naturellement arrêtées pendant tout le processus de la vitellogenèse en prophase de première division de méiose, assimilable à une phase G2 du cycle cellulaire. Ce sont les ovocytes de stade VI, ayant achevé leur croissance (1,2 mm de diamètre), compétents à répondre à la stimulation hormonale, qui vont effectuer la maturation méiotique. Ce phénomène débute avec la rupture de la vésicule germinative, appelée GVBD (pour Germinal Vesicle Breakdown), provoquant l'apparition d'une tache dépigmentée au pôle animal de l'ovocyte (Figure 17). Les chromosomes se condensent et un fuseau de métaphase I se forme. L'ovocyte se divise de manière asymétrique : une grosse cellule, l'ovocyte, et une petite cellule, le premier globule polaire, chacune contenant un lot de chromosomes homologues. Puis, sans phase S intermédiaire et sans reformation de noyau, l'ovocyte entre dans la deuxième division de méiose. Le fuseau de métaphase II se forme et l'ovocyte se bloque à nouveau à ce stade en attente de la fécondation.

c) Le profil d'activation du MPF au cours de la maturation méiotique

L'utilisation des ovocytes d'Amphibiens a permis l'identification du MPF par Masui et Markert en 1971, puis des mécanismes régulant son activité. En prophase, le MPF est maintenu sous une forme inactive par deux phosphorylations inhibitrices sur Thréonine 14 et Tyrosine 15 (Figure 18). En réponse à la stimulation hormonale, la phosphatase Cdc25 est activée et permet la déphosphorylation de ces deux résidus, et l'activation brutale du pool de pré-MPF en MPF actif, ce qui provoque GVBD, suivie de la formation du fuseau de métaphase I. Puis, suite à la dégradation des Cyclines, l'activité MPF chute au moment de l'expulsion du premier globule polaire (Figure 18). Cette activité ré-augmente progressivement, en parallèle à la néosynthèse des Cyclines, provoquant l'entrée en métaphase II, et reste à un niveau haut grâce à l'activité d'un autre facteur, le CSF (Cytostatique Factor), dont l'identité est encore mal connue. Cette stabilisation du MPF bloque la cellule en métaphase II et lui permet d'attendre la fécondation.

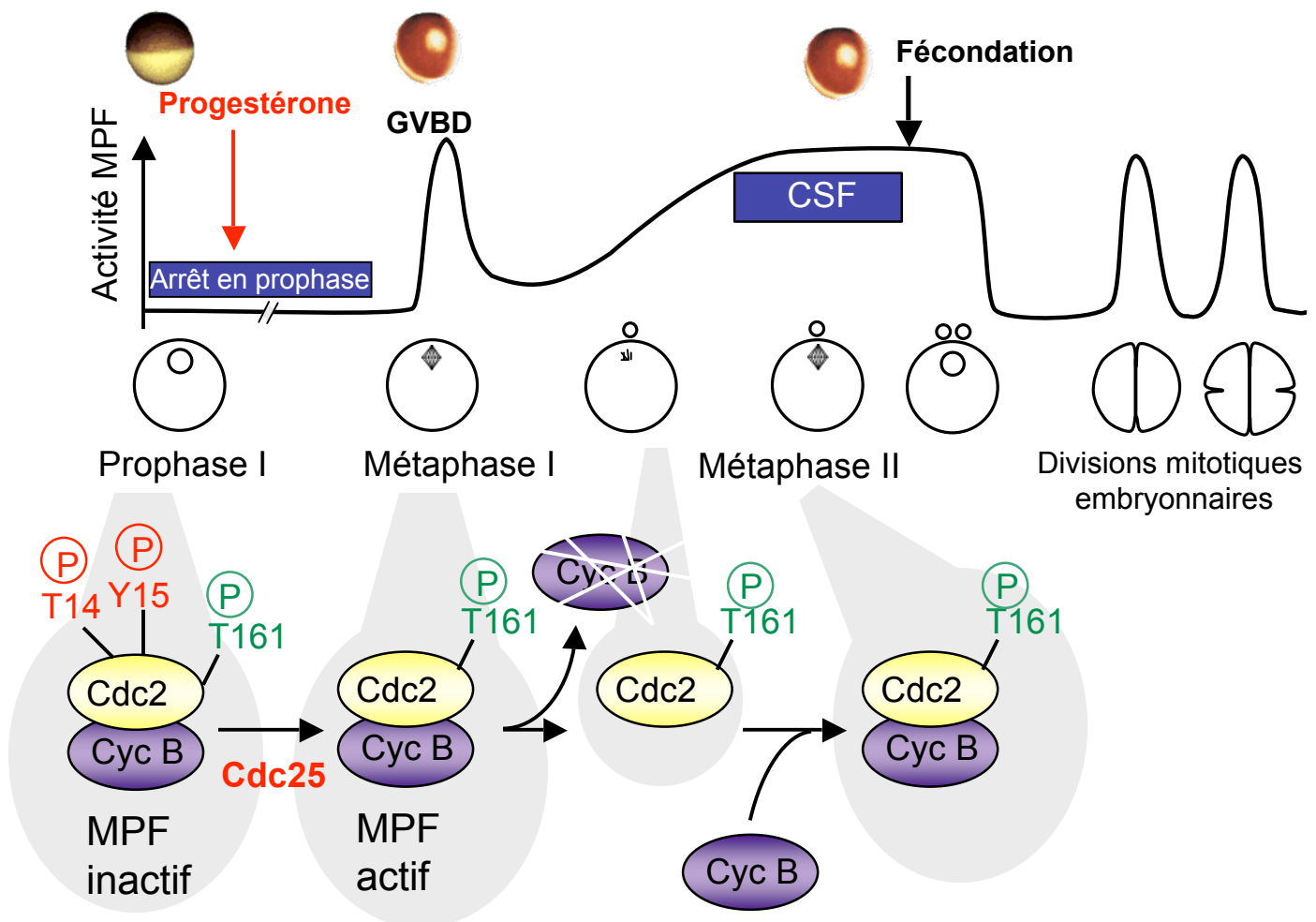


Figure 18 : Le profil d'activation du MPF au cours de la maturation méiotique

2) Voie de signalisation déclenchée par la progestérone

a) La stimulation hormonale

Chez le Xénope, l'inducteur physiologique de la maturation méiotique est la progestérone. C'est une hormone stéroïde sécrétée par les cellules folliculaires en réponse au pic de LH au moment de l'ovulation. Elle agit localement (action paracrine) en diffusant entre l'espace de quelques microns qui sépare les cellules folliculaires de la membrane plasmique de l'ovocyte. Elle induit une ou plusieurs voies de signalisations conduisant à l'activation du MPF et permettant la reprise de la méiose. Elle agit via un récepteur non conventionnel puisqu'il est membranaire et a un mode d'action non transcriptionnel (Maller 2001). En effet, l'injection de progestérone en solution lipidique provoque la reprise de la méiose (Tso et al., 1982), alors qu'injectée en solution aqueuse elle n'a aucun effet (Schorderet-slatkine 1972; Jacobelli et al., 1974), indiquant que le récepteur n'est pas cytosoluble mais localisé dans un compartiment membranaire. Lorsqu'elle est ajoutée dans le milieu extérieur mais couplée à des polymères de haut poids moléculaire qui l'empêchent de pénétrer dans la cellule, elle induit la reprise de la méiose (Ishikawa et al., 1977; Godeau et al., 1978). Cette expérience suggère que le récepteur serait localisé sur la membrane plasmique. Mais cette conclusion reste à confirmer dans la mesure où une quantité suffisante de progestérone libre, dissociée des polymères, pourrait pénétrer dans l'ovocyte et induire la reprise de la méiose.

Le récepteur conventionnel xPR/XPR1 à la progestérone a été cloné chez le Xénope (Bayaa et al., 2000; Tian et al., 2000), et il a été proposé qu'un faible pool membranaire de ce récepteur puisse être responsable de la reprise de la méiose. Mais l'expression du récepteur dans l'ovocyte est très faible, les expériences de perte de fonction sont peu convaincantes, et les résultats concluant à une intervention physiologique de ce récepteur dans la reprise de la méiose sont controversés.

Récemment, un récepteur à sept domaines transmembranaires capable de lier la progestérone, a été identifié chez différentes espèces (poisson, souris, Homme), et il a été proposé qu'il corresponde au récepteur recruté pour l'induction des divisions méiotiques chez le poisson (Zhu et al., 2003a; Zhu et al., 2003b; Tokumoto et al., 2006). Chez le Xénope, l'injection d'anticorps bloquant ce récepteur induit une inhibition de la maturation induite par la progestérone, tandis la surexpression du récepteur accélère la maturation (Josefsberg Ben-Yehoshua et al., 2007).

Il a également été suggéré que la progestérone ne soit pas le véritable inducteur physiologique de la maturation chez le Xénope. En effet, la LH modifie le métabolisme

stéroïdien de la cellule folliculaire, et de nombreux stéroïdes sont libérés, la progestérone ne représentant pas le plus abondant. *In vitro*, beaucoup de ces stéroïdes sont capables de provoquer la reprise de la méiose notamment les androgènes (Haccard and Jessus 2006a). Or, les androgènes sont massivement sécrétés par les cellules folliculaires en réponse à la LH, et leur récepteur, cloné chez le Xénope, est exprimé dans l'ovocyte et pourrait contribuer à la reprise de la méiose (Yang et al., 2003b). Il est finalement vraisemblable que plusieurs stéroïdes et plusieurs récepteurs puissent être impliqués physiologiquement dans la maturation méiotique.

Signalons aussi qu'*in vitro*, l'insuline et l'IGF-1 sont capables de déclencher la reprise de la méiose de l'ovocyte de Xénope, en agissant via le récepteur à l'IGF-1 exprimé à la membrane plasmique de la cellule (El-etr et al., 1979; Maller and Koontz 1981). On ignore encore si l'IGF-1 intervient dans l'ovaire, dans un contexte physiologique, pour participer à la reprise méiotique lors de l'ovulation, mais ce pourrait être effectivement le cas car les concentrations locales en IGF-1 au niveau folliculaire sont très élevées (Richards et al., 2002).

Il existe un temps de latence de quelques heures entre la stimulation hormonale et l'activation du MPF. Il résulte de la mise en place d'une voie de signalisation qui n'est pas encore totalement élucidée. La première étape connue est une chute de l'AMPc résultant en l'inhibition de l'activité de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Figure 19) (Mulner et al., 1979; Sadler and Maller 1981; Sadler and Maller 1983).

b) L'inhibition de l'activité de PKA

Dans un ovocyte en prophase, l'activité de l'adénylate cyclase (AC) est élevée. Elle permet la synthèse d'AMPc à partir d'ATP, ce qui maintient un haut niveau en AMPc. La PKA est la seule cible de l'AMPc présente dans l'ovocyte. Elle est constituée de quatre sous-unités : deux sous-unités régulatrices, PKA-R, qui lient l'AMPc, et deux sous-unités catalytiques, PKA-C (Figure 19). Lorsque R et C sont associées, l'activité enzymatique de C est inhibée. Lorsque R est lié à l'AMPc, il libère la sous-unité catalytique C qui est alors active.

En prophase, les sous-unités R et C de PKA sont totalement dissociées et l'activité PKA est maximale. La progestérone induit une inhibition de l'adénylate cyclase, ce qui a pour conséquence une chute de la concentration intracellulaire en AMPc, et l'inhibition de l'activité de sa cible, la PKA. C'est une des premières étapes connues de la maturation méiotique, qui a lieu dans les dix minutes qui suivent la stimulation hormonale, et quelques heures avant l'activation du MPF. La chute de la concentration en AMPc et l'inhibition de

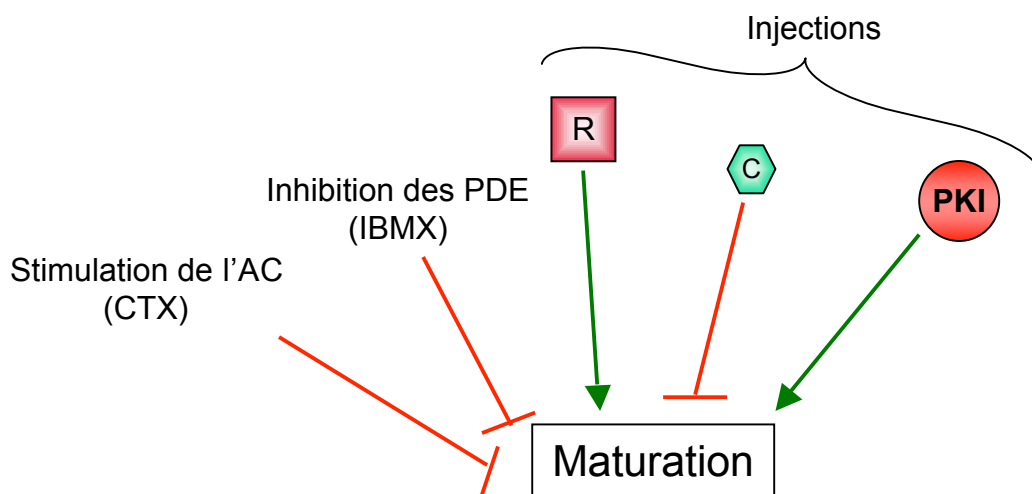
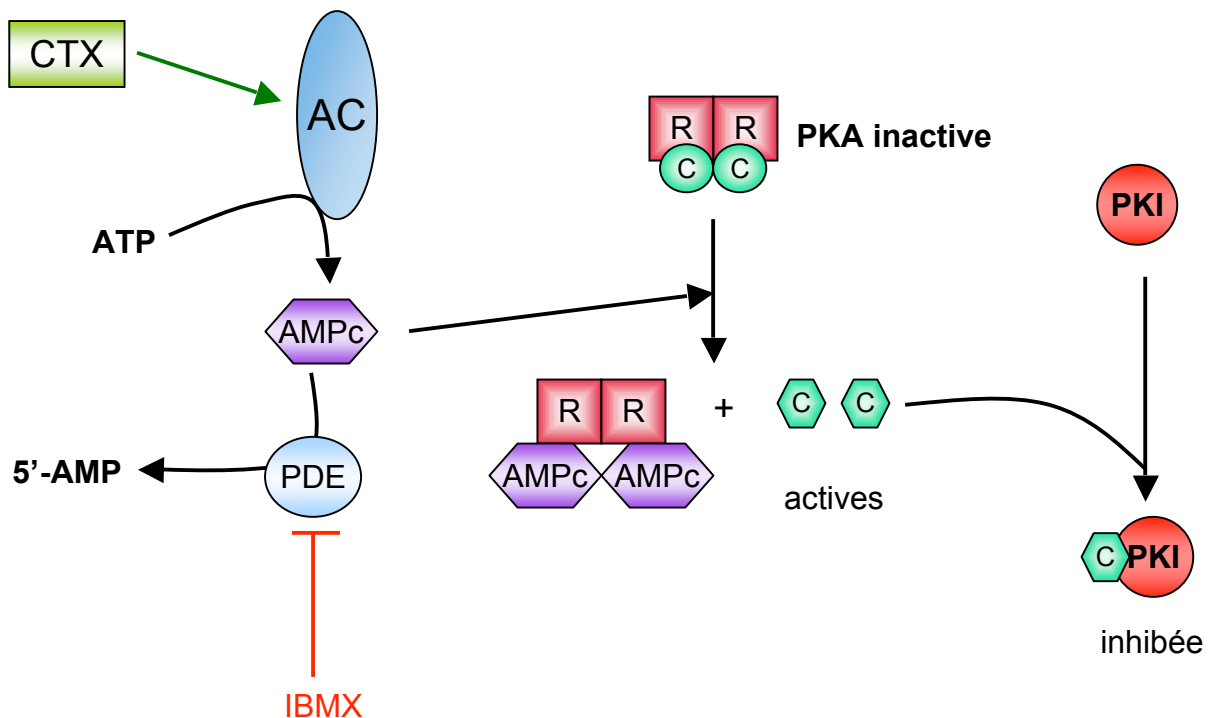


Figure 19 : La régulation de PKA

AC : Adénylate Cyclase, R et C : sous-unités régulatrices et catalytiques de PKA, PKI : PKA inhibiteur, CTX : Toxique Cholérique, IBMX : 3'-Isobutyl-Méthyl-Xantine

L'inhibition de PKA par injection dans un ovocyte en prophase de la sous unité R de PKA ou de son inhibiteur PKI, inhibe la maturation méiotique.

Le maintien d'un niveau haut en AMPc (ajout d'IBMX ou CTX) ou l'augmentation de l'activité de PKA par injection de la sous-unité C inhibent la reprise de la méiose induite par la progestérone.

PKA représentent une étape nécessaire et suffisante pour induire la rupture de l'enveloppe germinative et la reprise de la méiose (Maller et al., 1978; Huchon et al., 1981b). En effet, lorsque l'on maintient artificiellement un niveau haut en AMPc (ajout d'IBMX qui inhibe les phosphodiésterases ou de toxine cholérique qui stimule les adénylates cyclases) (Maller and Krebs 1978) ou que l'on augmente l'activité de PKA (micro-injection de PK-C) (Maller and Krebs 1977), on bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone. Inversement l'inhibition de l'activité de PKA par micro-injection de R ou de son inhibiteur PKI provoque l'activation du MPF et la reprise de la méiose indépendamment de la présence de progestérone (Huchon et al., 1981b) (Figure 19).

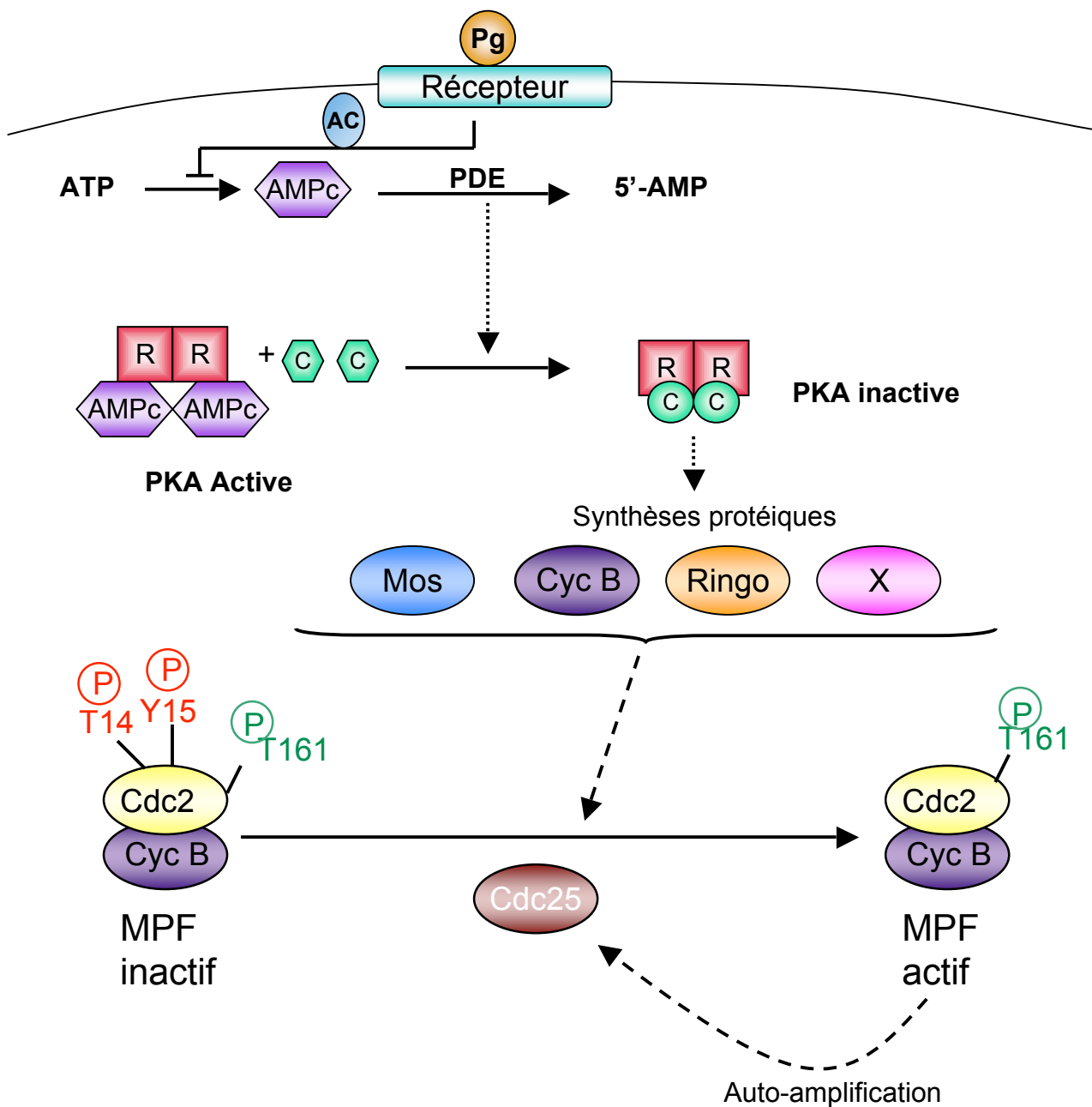
Le lien entre l'inhibition de PKA et l'activation du MPF n'a pas encore été élucidé. Comme pour la progestérone, il a été montré que la reprise de la méiose induite par la micro-injection de la sous-unité régulatrice PKA-R, ou de PKI, était dépendante de la synthèse protéique (Huchon et al., 1981b; Daar et al.) mais indépendante de la transcription. Ces observations montrent que l'inhibition de PKA doit contrôler la synthèse de certaines protéines clés à partir de leur ARNm cytoplasmique, protéines indispensables à l'activation du MPF.

c) Nécessité d'une néosynthèse protéique

L'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide bloque la maturation méiotique induite par la progestérone ou par l'injection de R ou de PKI (Huchon et al., 1981b; Kobayashi et al., 1991; Daar et al., 1993). L'inhibition de l'activité de PKA a donc pour conséquence la synthèse de nouvelles protéines à partir du stock d'ARN messagers cytoplasmique, protéines nécessaires à la reprise de la méiose. Les protéines nouvellement synthétisées qui sont nécessaires à l'activation du MPF ont fait l'objet de nombreuses recherches, et leur identité n'est pas encore connue avec certitude. Elles doivent répondre à deux critères : leur néosynthèse doit avoir lieu avant l'activation du MPF, et donc être indépendante de l'activité de Cdc2, et elle doit être contrôlée par la chute de l'activité de PKA. Plusieurs candidats ont été proposés : le proto-oncogène c-mos, activateur de la MAPK, et les partenaires de Cdc2 : les Cyclines et RINGO/Speedy (Figure 20).

• Mos

Mos est une protéine jouant un rôle clé dans la maturation méiotique des ovocytes chez toutes les espèces où elle a été étudiée (Sagata 1997). C'est une Sérine/Thréonine Kinase dont la synthèse est spécifique d'un type cellulaire et restreinte dans le temps : Mos est exprimée



D'après Karaïskou et al., 2001

Figure 20 : La voie de transduction induite par la progestérone

La progestérone induit une chute de la concentration intracellulaire en AMPc, ce qui a pour conséquence l'inhibition de PKA, et la synthèse de nouvelles protéines nécessaires à l'activation initiale du MPF. Parmi les candidats proposés, Mos et les Cyclines B jouent certainement un rôle prépondérant.

que dans les cellules de la lignée germinale, où elle n'agit que pendant le temps limité de la maturation méiotique des ovocytes. Certains travaux mentionnent son expression lors de la différenciation de différents tissus comme par exemple la voie de différenciation musculaire (Pelpel et al., 2000, Lenormand et al., 1997; Leibovitch et al., 1993), ou lors de contextes tumoraux (Kalejs et al., 2006). Elle a été originellement décrite chez la souris comme étant l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-mos*, codé par le virus murin de Moloney (Sagata et al., 1988) qui, lorsqu'il est exprimé de manière ectopique, peut induire la transformation de cellules somatiques en cellules cancéreuses (Oskarsson et al., 1980). Le substrat majeur, voire unique, de Mos est la kinase MEK, à l'origine de l'activation de la MAPK (ERK1/2) dans l'ovocyte. Dans ce type cellulaire particulier, la cascade des MAPKs n'est pas lancée par la kinase Raf, mais par Mos (Sagata et al., 1989a; Nebreda and Hunt 1993; Posada et al., 1993). Chez les vertébrés et l'étoile de mer, la protéine Mos est absente en prophase. Chez le Xénope, elle est synthétisée pendant la maturation méiotique, à partir de son ARN messenger stocké dans le cytoplasme, qui subit une polyadénylation (Sagata et al., 1989a; Roy et al., 1996). L'accumulation de Mos a lieu à GVBD lorsque Cdc2 est activé et dépend de l'inhibition de l'activité de PKA (Sagata et al., 1988; Matten et al., 1994). Mos est dégradée par protéolyse après la fécondation et n'est plus exprimée par la suite (Oskarsson et al., 1980; Sagata 1997; Tachibana et al., 2000). Bien que l'accumulation de Mos ne soit manifeste qu'à GVBD, cette protéine a néanmoins été proposée comme protéine candidate dont la synthèse est requise pour l'activation du MPF à GVBD.

En effet, l'injection de la protéine ou de l'ARNm codant Mos est suffisante pour induire la reprise de la méiose en absence de progestérone et l'effet de l'injection de la protéine est inhibée par l'utilisation du U0126, un inhibiteur pharmacologique de MEK. De plus, l'injection de formes constitutivement actives de MEK, MAPK, ou p90Rsk induit la reprise de la méiose (Haccard et al., 1995; Huang et al., 1995; Gross et al., 1999). Toutes ces observations montrent que Mos est suffisante pour induire la reprise de la méiose et qu'elle agit uniquement via l'activation de la voie MAPK. De plus, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de Mos inhibe la reprise de la méiose induite par la progestérone (Sagata et al., 1988). La synthèse de Mos semble donc non seulement suffisante mais aussi nécessaire pour l'activation du MPF chez le Xénope. Cependant, chez la Souris et l'étoile de mer, les deux autres systèmes modèles de la maturation méiotique, ni Mos ni la voie MAPK ne sont requises pour la reprise de la méiose (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996; Sadler and Ruderman 1998; Tachibana et al., 2000). Une série d'expériences plus récentes a remis en question les conclusions précédemment tirées sur le

rôle de Mos dans l'activation du MPF chez le Xénope. Il a d'abord été montré que le U0126, inhibiteur de MEK, ou la geldanamycine, inhibiteur de Mos, ne bloquent pas la reprise de la méiose induite par la progestérone chez le Xénope, mais retardent seulement la cinétique de maturation, montrant que la voie MAPK n'est pas nécessaire au processus (Fisher et al., 1999; Gross et al., 2000). Une autre série d'expériences basées sur l'utilisation de morpholinos antisens dirigés contre l'ARNm de Mos a étayé ces résultats. Les morpholinos antisens plus spécifiques et plus affins que les antisens, se lient sur l'ARNm cible, au niveau du codon d'initiation, et bloquent sa traduction. L'ARNm reste donc présent et intact dans la cellule, contrairement à l'utilisation d'oligonucléotides antisens, où l'ARNm est dégradé par la RNase H. Lorsque des morpholinos antisens dirigés contre l'ARNm de Mos sont injectés dans des ovocytes en prophase, ils ne bloquent pas la maturation induite par la progestérone et le MPF est activé en l'absence de Mos et d'activation de la voie MAPK (Dupré et al., 2002a). L'une des hypothèses expliquant les différences obtenues entre morpholinos et oligonucléotides est que ce ne soit pas la synthèse de la protéine Mos qui soit requise pour la reprise de la méiose en réponse à la progestérone, mais la présence de son ARNm dans l'ovocyte.

D'autres résultats appuient le fait que Mos n'est pas la protéine dont la synthèse est strictement requise pour l'activation de Cdc2 suite à l'inhibition de PKA dans la voie de transduction de la progestérone. En effet, l'accumulation de Mos induite par la progestérone est inhibée par l'injection d'une forme dominante négative de Cdc2, de la protéine p21^{Cip1} ou d'anticorps bloquant Cdc2, situant la synthèse de Mos en aval de l'activation de Cdc2 (Nebreda et al., 1995; Frank-Vaillant et al., 1999). De plus, il a été montré que la phosphorylation de Mos par Cdc2 est requise pour sa stabilisation à GVBD (Nishizawa et al., 1992; Castro et al., 2001). Non seulement Mos ne serait pas nécessaire à l'activation du MPF au moment de GVBD, mais sa synthèse et/ou sa stabilité serait même sous le contrôle du MPF.

- **Les partenaires de Cdc2 : Les Cyclines B et Ringo/Speedy**

Dans un ovocyte en prophase, une faible proportion de Cdc2 (10% à 20%) est déjà associée avec des Cyclines, principalement B2/B5 (Kobayashi et al., 1991; Hocheegger et al., 2001). Les molécules de Cdc2 de ces complexes sont phosphorylées sur la Thr161, et sur les deux résidus inhibiteurs Thr14 et Tyr15, formant ainsi le stock inactif de pré-MPF. Le reste des molécules de Cdc2 est libre (non associé à une Cycline) et inactif. Une certaine proportion de ces molécules non associée à des Cyclines est déjà phosphorylée sur Thr161 (De Smedt et al., 2002). Ces molécules de Cdc2 libres peuvent être recrutées par les Cyclines ou d'autres

partenaires néo-synthétisés. L'hypothèse a donc été faite que la progestérone stimule la synthèse de Cycline B ou d'autres partenaires activateurs de Cdc2, qui recrutent et activeraient les molécules de Cdc2 libre, formant ainsi une petite amorce de MPF actif capable de déclencher la boucle d'auto-amplification. Dans le cadre de cette hypothèse, l'identité des protéines dont la synthèse est nécessaire pour la reprise de la méiose est un partenaire activateur de Cdc2.

La protéine Ringo/Speedy est une protéine non apparentée à une Cycline, mais capable de lier Cdc2 et de l'activer dans les ovocytes de Xénope (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). Une étude récente a montré qu'elle est déjà présente en prophase, contredisant l'idée originale que cette protéine était accumulée à GVBD (Gutierrez et al., 2006). Pourtant, son injection induit la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale. Cependant, l'injection d'oligonucléotides antisens, dirigés contre l'ARNm de Ringo/Speedy, retarde la maturation induite par la progestérone, mais ne l'inhibe pas (Lenormand et al., 1999). En outre, le partenaire préférentiel de Ringo/Speedy semble être Cdk2 et non pas Cdc2 (Karaïskou et al., 2001). Enfin, une publication récente suggère que Ringo/Speedy jouerait un rôle lors de la transition métaphase I - métaphase II plutôt que dans les étapes précoces de la maturation méiotique (Gutierrez et al., 2006). Ringo/Speedy ne semble donc pas correspondre à la protéine dont la synthèse déclenche l'activation du MPF.

Les Cyclines B sont d'excellents candidats comme protéines dont la synthèse est requise pour l'activation du MPF. Il existe quatre types de Cyclines B qui interviennent dans la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope : les Cyclines B1, B2, B4, et B5 (Hocheegger et al., 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, les Cyclines B2 et B5 sont déjà présentes en prophase et associées à Cdc2 pour former le pré-MPF (Kobayashi et al., 1991; Taieb et al., 1997). Les Cyclines B1 et B4 quant à elles commencent à s'accumuler juste avant GVBD (Kobayashi et al., 1991; Hocheegger et al., 2001). La synthèse de Cycline B1 est dépendante de la chute de l'activité de PKA mais indépendante de l'activation initiale de Cdc2 puisqu'elle a lieu même en présence de l'inhibiteur de Cdc2, p21^{Cip1} (Frank-Vaillant et al., 1999). Enfin, l'injection de Cyclines A ou B dans des ovocytes en prophase est suffisante pour induire la reprise de la méiose indépendamment de toute synthèse protéique (pour revue: Roy et al., 1991; Huchon et al., 1993; pour revue: Taieb et al., 1997). L'ensemble de ces données conduisent à l'hypothèse que la progestérone pourrait stimuler la traduction de Cyclines de type B1 et B4 qui, en s'associant aux molécules libres de Cdc2 déjà phosphorylées sur Thr161, pourraient générer des complexes actifs induisant l'activation du stock de pré-MPF. Les Cyclines B1/B4 correspondraient aux protéines dont la synthèse, lancée par l'inhibition

de PKA, permet l'activation du MPF. Cependant, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ensemble des ARNm des Cyclines B1, B2, B4 et B5, ne bloque pas l'activation du MPF en réponse à la stimulation hormonale (bien qu'elle la retarde) (Minshull et al., 1991; Hocheegger et al., 2001; Haccard and Jessus 2006b). Ces derniers résultats montrent que la néosynthèse de ces Cyclines est suffisante mais pas nécessaire à l'activation initiale du MPF.

Il apparaît donc que ni la synthèse de Ringo/Speedy, ni celle de Mos, ni celle des Cyclines B1, B2, B4 et B5 ne serait requise pour la reprise de la méiose induite par la progestérone. Le débat sur l'identité de la protéine dont la synthèse est nécessaire pour l'activation initiale du MPF reste donc ouvert. Récemment, il a été montré que l'inhibition conjuguée de la synthèse des Cyclines et de Mos par une stratégie antisens bloquait la reprise de la méiose induite par la progestérone (Haccard and Jessus 2006b). Il semble donc que dans l'ovocyte de Xénope, ces deux voies soient redondantes, et que si l'une des deux est inhibée, l'autre puisse prendre le relais pour conduire à l'activation du MPF. Selon cette hypothèse, les Cyclines seraient suffisantes et correspondraient aux meilleurs candidats. Elles seraient appuyées par Mos qui doit être accumulé dès les premières molécules de MPF activées. Si la synthèse de Cyclines est perturbée, le système est assez robuste pour jouer de la redondance de ces voies et démarrer avec la voie Mos/MAPK.

d) L'activation initiale du MPF

Comme nous l'avons vu précédemment, dans un ovocyte en prophase, 10 à 20% de Cdc2 est associé à la Cycline B et forme le pré-MPF, (Gautier et al., 1988; Lohka et al., 1988; Gautier et al., 1990; Hocheegger et al., 2001), le reste étant monomérique ou présent dans des complexes dépourvus de Cycline (Figure 21). Une certaine partie est phosphorylée sur Thr161 et donc prête à être activée directement par liaison à une Cycline. Il existe en théorie deux façons d'obtenir du MPF actif et d'activer la boucle d'auto-amplification : à partir du pré-MPF (par déphosphorylation de la Thr14 et de la Tyr15 de Cdc2 par Cdc25), ou par association entre des Cyclines néosynthétisées et les molécules de Cdc2 monomériques déjà phosphorylées sur Thr161. Ces deux processus ne sont pas exclusifs (Figures 21 et 22).

- **Démarrer avec une néo-synthèse de Cyclines**

La première hypothèse repose sur le fait que dans un ovocyte en prophase, une partie du Cdc2 monomérique est déjà phosphorylée sur Thr161 par la CAK (Cdk Activating Kinase) (De Smedt et al., 2002), mais reste inactive puisqu'elle n'est pas associée à un partenaire de type Cycline (Norbury et al., 1991). En réponse à la stimulation hormonale, les Cyclines

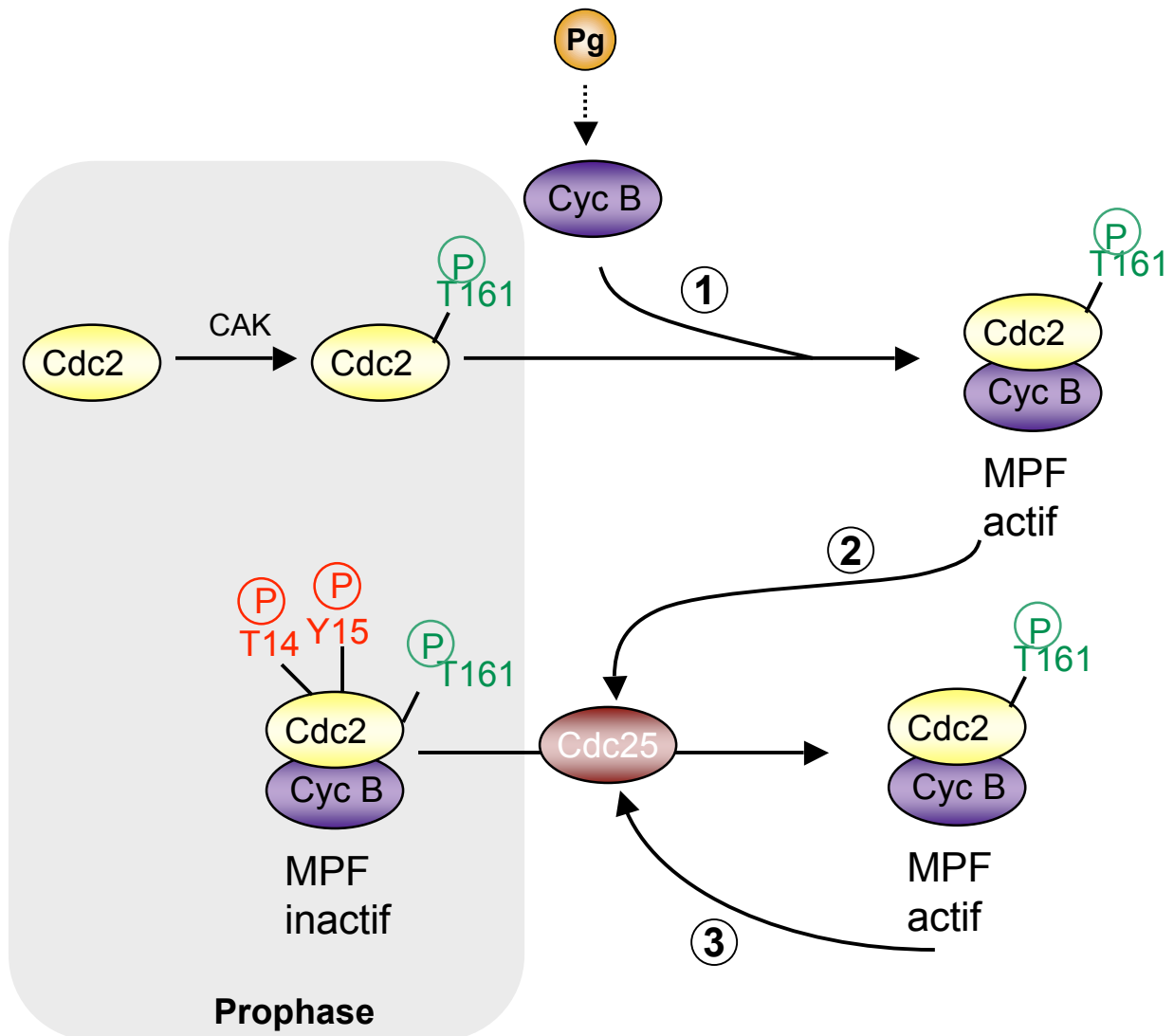


Figure 21 : Mécanisme d'activation initiale du MPF à partir du Cdc2 monomérique

L'ovocyte en prophase comporte trois formes de Cdc2 : sous forme de pré-MPF associée à une Cycline, sous forme libre non phosphorylée sur Thr161 et sous forme libre et phosphorylée. La progestérone lancerait la synthèse de Cycline B qui, en s'associant aux molécules de Cdc2 libres phosphorylées sur Thr161, formerait une amorce de MPF actif (étape 1). Cette amorce permet de lancer l'activation des premières molécules de MPF à partir du pré-MPF (étape 2). La boucle d'auto-amplification permet ensuite aux nouvelles molécules de MPF d'accélérer la conversion de pré-MPF en MPF (étape 3).

B1/B4 s'accumulent. Elles peuvent s'associer au Cdc2 libre déjà phosphorylé sur Thr161 et fournir à la cellule une amorce de MPF actif et l'activer. Ces néo-complexes actifs échapperaient à la phosphorylation inhibitrice par Myt1 (Figure 21)

- **Démarrer en modifiant la balance Myt1/Cdc25**

- *Inhibition de Myt1 et/ou activation de Cdc25*

Une hypothèse alternative repose sur la formation d'une amorce de MPF actif à partir du stock de pré-MPF inactif : soit en inhibant la kinase Myt1 soit en activant la phosphatase Cdc25. Ce mécanisme mettrait donc en jeu les activités de Myt1 et Cdc25 de manière indépendant de l'activité Cdc2. En prophase, le pré-MPF est maintenu inactif par deux phosphorylations inhibitrices sur Thr14 et Tyr15 contrôlées par l'activité de la kinase Myt1 (Mueller et al., 1995b). Myt1 et Cdc25 sont toutes les deux hypophosphorylées en prophase ce qui maintient Myt1 à l'état actif et Cdc25 à l'état inactif. Leur niveau de phosphorylation est en partie contrôlé par la phosphatase 2A (PP2A) (Figure 22).

Il n'a pas encore été établi qui de Myt1 ou de Cdc25 était inactivée ou activée en premier pour conduire à une amorce de MPF active. Il n'a d'ailleurs pas été démontré que leur régulation résultait de la voie d'activation de la progestérone et était indépendante de l'activité de Cdc2, ce scénario de genèse d'une amorce de MPF à partir du pré-MPF restant une hypothèse. En réponse à la progestérone, la kinase Myt1 pourrait être régulée négativement soit par phosphorylation par des kinases (Mos/MAPK/p90Rsk, Plx1), soit par l'inhibition d'une phosphatase.

L'injection d'acide okadaïque (OA), un inhibiteur des Ser/Thr phosphatases PP1 et PP2A, dans des ovocytes en prophase, induit GVBD, avec une cinétique beaucoup plus rapide que la progestérone et indépendamment de la synthèse protéique (Goris et al., 1989; Rime et al., 1990; Jesus et al., 1991). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la PP2A pourrait servir de starter pour inverser la balance Myt1/Cdc25 et conduire à la formation de l'amorce de MPF actif à partir de pré-MPF (Figure 22). Notons que parmi les deux cibles de l'acide okadaïque, il est probable que ce soit la PP2A qui soit impliquée physiologiquement dans le contrôle du MPF (Maton et al., 2005). Cependant, aucune étude n'a encore mis en évidence une baisse de l'activité de PP2A (ou de PP1) en réponse à la progestérone.

Une fois Myt1 inhibée, les phosphorylations sur Thr14 et Tyr15 de Cdc2 ne pourraient plus être maintenues, et les complexes Cycline B/Cdc2 formés à partir de la néo-synthèse de Cycline B, échapperaient à la phosphorylation par Myt1, permettant l'activation de l'amorce de MPF. Une hypothèse alternative reposerait sur l'activation de Cdc25, qui aurait alors une

activité plus importante que celle de la kinase Myt1, ce qui inverserait la balance Myt1/Cdc25, et conduirait à la formation de l'amorce en permettant la déphosphorylation des molécules de pré-MPF directement par Cdc25. Enfin, on ne peut exclure que des kinases responsables de la phosphorylation de Myt1 et de Cdc25 soient activées en parallèle à une inhibition de PP2A/PP1, et/ou sous le contrôle de ces phosphatases, de manière à inverser la balance Myt1/Cdc25.

La régulation négative de Myt1 en réponse à la progestérone sera présentée en détail dans le chapitre VI, je ne traiterai ici que de l'activation de Cdc25.

➤ *Activation de Cdc25*

Une activation de Cdc25 pourrait conduire à la formation de l'amorce de MPF actif, en permettant la déphosphorylation des molécules de pré-MPF. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de Cdc25 impliquerait la déphosphorylation du résidu Ser287, parallèlement à la phosphorylation de nombreux sites activateurs. Dans l'ovocyte, il a été proposé que PKA soit responsable du maintien de la phosphorylation de la Serine 287 en prophase, et que la chute de son activité contribue à l'activation du MPF via la déphosphorylation activatrice de la Ser287 de Cdc25 (Duckworth et al., 2002). Ceci reste à vérifier, car la cinétique de déphosphorylation du résidu Ser287 de Cdc25 (au moment de GVBD), ne correspond pas à la chute d'activité de PKA (10 minutes post-progestérone) et n'explique pas pourquoi le contrôle de l'activation du MPF par PKA dépend de la synthèse protéique. Il a été également proposé que la phosphatase PP1 soit responsable de cette déphosphorylation activatrice de Cdc25 dans l'ovocyte (Margolis et al., 2003; Margolis et al., 2006b). Ce résultat paraît contradictoire avec le fait que l'acide okadaïque, qui inhibe PP1, soit capable d'activer le MPF. Enfin, aucune étude ne démontre que dans l'ovocyte, la déphosphorylation de la Ser287 représente un pré-requis à l'activation de Cdc25, et non une conséquence secondaire à son activation.

En ce qui concerne les phosphorylations activatrices de Cdc25, la kinase Plx1, capable de phosphoryler et d'activer Cdc25, a été proposée comme étant la molécule qui régulerait positivement Cdc25 en réponse à la progestérone (Kumagai and Dunphy 1996; Qian et al., 1998a; Qian et al., 1998b). L'action de Plx1 est antagoniste à une phosphatase sensible à l'OA, vraisemblablement PP2A (Figure 22) (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1999; Maton et al., 2005). L'injection d'une forme constitutivement active de Plx1, dans des ovocytes en prophase, induit GVBD, montrant que Plx1 est un bon candidat pour amorcer le système. Néanmoins dans cette étude, il n'a pas été montré si cette injection était capable de

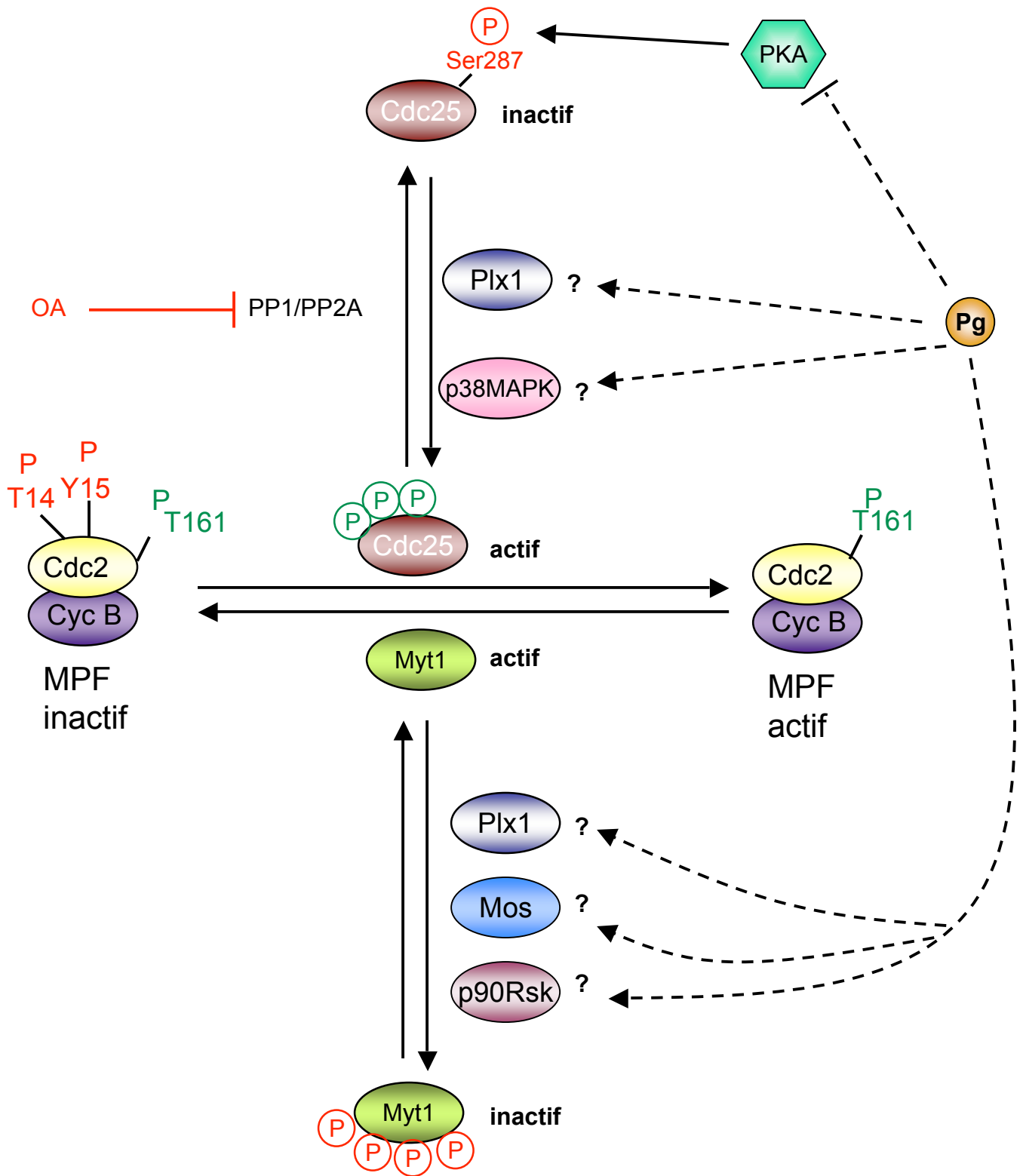


Figure 22 : Formation de l'amorce de MPF actif à partir du pré-MPF

Les premières molécules de MPF pourraient être générées à partir du stock de pré-MPF par une régulation de la balance Myt1/Cdc25. Plusieurs enzymes joueraient un rôle, comme la PP2A, la PP1, les kinase Plx1, p38MAPK, et la voie Mos/MAPK/p90RSK

conduire à l'inhibition de Cdc25 en l'absence d'activité kinasique de Cdc2 (Qian et al., 1998a). Mais l'injection d'anticorps bloquants dirigés contre Plx1 dans des ovocytes en prophase n'inhibe pas la maturation induite par la progestérone (Qian et al., 1998b), montrant que Plx1 n'est pas nécessaire pour activer le MPF. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, son activation dépend de celle de Cdc2 dans les extraits (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1999). Ces résultats suggèrent fortement que puisque Plx1 est sous le contrôle de Cdc2 et qu'elle n'est pas nécessaire à son activation, elle ne serait pas requise pour la formation de l'amorce de MPF actif, mais serait plutôt impliquée dans la boucle auto-amplification. Cette conclusion est fortement supportée par une publication récente montrant que la kinase activatrice de Plx1, Plkk1, est elle-même sous le contrôle de Cdc2 (Erikson et al., 2004).

Récemment il a été suggéré que la p38MAPK/SAPK3 pouvait phosphoryler Cdc25 sur la Ser205 créant un site de liaison avec Plx1 (Elia et al., 2003a), ce qui contribuerait à la reprise de la méiose (Perdiguero et al., 2003), une hypothèse qui reste à vérifier.

Enfin, des travaux plus récents ont montré que la MAPK phosphorylait Cdc25 sur les résidus Thr48, Thr138 et Ser205 (Wang et al., 2007). La phosphorylation sur la Thr138 permettrait la liaison de Plx1, et l'activation totale de Cdc25. Ces auteurs observent un faible niveau de MAPK phosphorylée avant GVBD (grâce à un anticorps anti-MAPK phosphorylée) et proposent que la MAPK soit responsable de l'activation initiale de Cdc25. Cependant, chez le Xénope, il a été montré que l'activation de la MAPK est sous le contrôle de Cdc2 (Nebreda et al., 1995; Frank-Vaillant et al., 2001).

En conclusion, il est vraisemblable que l'amorce de MPF qui initie la boucle d'auto-amplification a la potentialité dans l'ovocyte, d'être générée par deux voies redondantes, la synthèse des Cyclines B1/B4 et le contrôle de la balance Cdc25/Myt1, cette seconde voie étant elle-même contrôlée par un réseau complexe de kinases et phosphatases (PP2A, Mos/MAPK/p90Rsk, Plx1, p38MAPK...) indépendamment de l'activation du MPF.

e) La boucle d'auto-amplification du MPF

L'existence d'une boucle d'auto-amplification du MPF a été mise en évidence par des expériences de transfert de cytoplasme réalisées par Masui et Markert (Masui and Markert 1971) sur des ovocytes de *Rana pipiens*. Les auteurs ont montré que l'injection de cytoplasme issu d'ovocytes bloqués en métaphase II dans des ovocytes en prophase induisait la reprise de la méiose (Figure 23). Ce processus de transfert peut être répété indéfiniment en présence de

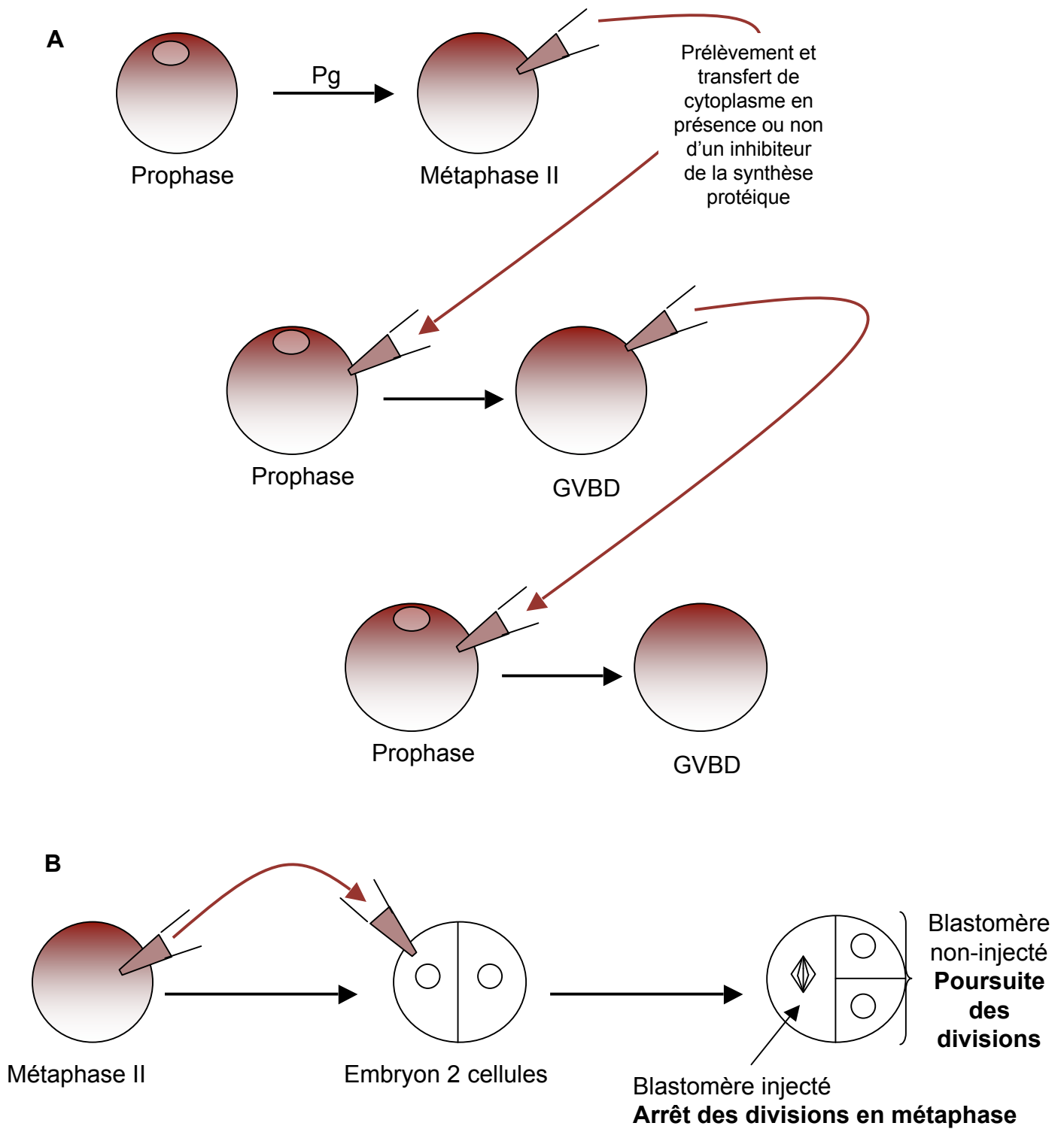
cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique, l'ovocyte receveur devenant l'ovocyte donneur, montrant que le facteur identifié, le MPF, était capable de s'auto-amplifier en absence de synthèse protéique (Wasserman and Masui 1975). Quels sont les mécanismes à l'origine de cette auto-amplification ?

Il est maintenant communément admis que la protéine kinase Plx1 est impliquée dans la boucle d'auto-amplification du MPF. Dans des petits ovocytes de stade IV, qui ne sont pas compétents pour la reprise de la méiose, la progestérone induit une chute de la concentration intracellulaire en AMPc, montrant que le récepteur est présent et actif (Mulner et al., 1983; Sadler and Maller 1983), mais n'active pas le MPF. Dans ces ovocytes, il a été montré que la protéine Plx1 était absente, et que sa surexpression suffisait à restaurer la boucle d'auto-amplification (Karaïskou et al., 2004).

L'injection d'une forme constitutivement active de Plx1 dans un ovocyte de stade VI en prophase, induit la reprise de la méiose. Inversement, l'injection d'anticorps bloquants Plx1 ou d'une forme kinase inactive supposée agir comme un dominant négatif, ralentit ou inhibe la maturation induite par la progestérone (Qian et al., 1998a; Qian et al., 1999). Des expériences *in vitro* dans des extraits d'ovocytes ou d'œufs de Xénope ont montré que l'activation de Plk1 et de Plx1 était sous le contrôle de Cdc2 et que la phosphorylation de Cdc25 par Cdc2-Cycline B était un pré-requis pour sa phosphorylation et son activation par Plx1 (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1999).

L'activation de Plx1 étant sous le contrôle de Cdc2, la boucle doit donc être lancée au préalable par une amorce de MPF actif. Cette amorce de MPF actif agit comme un catalyseur et permet l'activation de Plx1. Elle phosphoryle aussi certains sites activateurs de Cdc25 de manière directe (Izumi et al., 1992), sur des motifs différents de ceux phosphorylés par Plx1 (Figure 24). Ensemble, Cdc2 et Plx1 activent Cdc25 par phosphorylation. En retour, par un mécanisme de rétro-contrôle positif, Cdc25 déphosphoryle le stock de pré-MPF sur les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 et l'active. Par conséquent plus Plx1 et Cdc25 sont actifs, plus les molécules de MPF sont activées. Le système de l'auto-amplification est donc un mécanisme post-traductionnel qui permet une activation rapide et efficace du MPF, et assure de manière brutale et irréversible l'entrée en méiose.

Enfin, Greatwall, une nouvelle kinase a récemment été identifiée. Elle a tout d'abord été mise en évidence chez la Drosophile, dont les cellules invalidées pour le gène codant Greatwall ont une transition G2/M anormalement longue. La séquence de cette protéine est très conservée chez les vertébrés. Des expériences à partir d'extraits cyclants de Xénope ont permis de mettre en évidence que son activation est sous le contrôle direct de l'activation de



D'après Masui et Markert, 1971

Figure 23 : Expériences de transfert de cytoplasme

A : Découverte du MPF et de son auto-amplification

B : Mise en évidence de l'activité CSF

Cdc2 et que sa déplétion ralentit l'activation du MPF. Elle participerait donc à la boucle d'auto-amplification, et maintiendrait l'activité MPF suffisamment élevée pour permettre la mitose, soit en régulant négativement Myt1, soit en régulant positivement Cdc25.

La kinase Myt1 pourrait être régulée en miroir de Cdc25 par Plx1 et Cdc2, et possiblement par la voie MAPK/Rsk (Palmer et al., 1998; Peter et al., 2002). Son inhibition contribuerait, comme l'activation de Cdc25, à l'auto-amplification du MPF.

3) Etablissement du fuseau de métaphase I et transition métaphase I/métaphase II

Une fois activé, le MPF déclenche les événements structuraux caractéristiques de la première division de méiose : condensation des chromosomes, rupture de l'enveloppe nucléaire, formation du fuseau de métaphase I et ségrégation des chromosomes homologues lors de l'anaphase I, s'achevant par l'expulsion du premier globule polaire. Cette première division n'est pas suivie d'une phase S : il n'y a ni reformation de noyau, ni réplication de l'ADN. Un fuseau de métaphase II se reforme immédiatement autour du lot restant de chromosomes condensés. Il s'oriente d'abord parallèlement au cortex de l'ovocyte, puis effectue une rotation de 90° l'amenant dans une situation perpendiculaire au cortex de l'ovocyte, où il s'ancre par l'un de ses pôles (Huchon et al., 1981a; Gard 1992) (Figure 18). L'ovocyte reste bloqué en métaphase II jusqu'à la fécondation, grâce à l'activité d'un facteur, le CSF (Cytostatic factor). Tous ces événements sont contrôlés par les fluctuations de l'activité du MPF qui chute lors de la première division, cependant sans rejoindre le niveau de base de prophase, et remonte rapidement en méiose II, où il reste à un niveau haut qui permet l'arrêt en métaphase II (Figure 18).

a) L'activité MPF au cours de la transition MI/MII

Une fois activé, le MPF contrôle sa propre inactivation en activant l'APC/C, une ubiquitine ligase (E3), qui permet l'ubiquitination et la dégradation consécutive de protéines spécifiques en anaphase, notamment les Cyclines et la sécurine. En mitose, la dégradation de la sécurine, comme nous l'avons vu au chapitre 1, permet la séparation des chromatides sœurs en assurant la libération de la séparase qui clive les cohésines. Après la métaphase I de l'ovocyte, les Cyclines (B1, B2, B4 et B5) sont elles aussi ubiquitinées par l'APC/C et dégradées par le protéasome (Glutzer et al., 1991; Kobayashi et al., 1991; Hocheegger et al., 2001; Peter et al., 2001; Taieb et al., 2001) ce qui entraîne une chute de l'activité MPF.

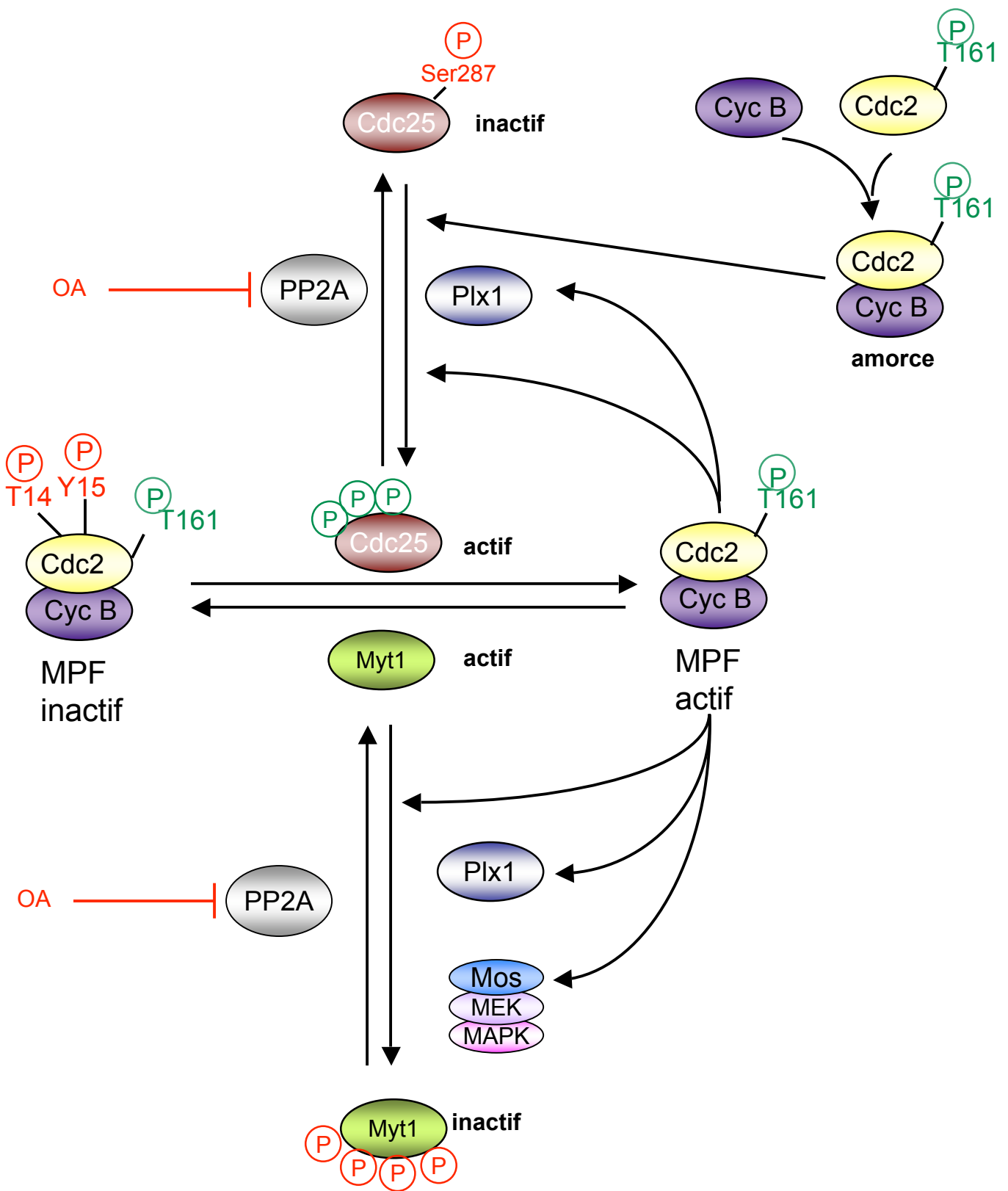


Figure 24 : L'auto-amplification du MPF

Toutefois cette activité ne s'annule pas (Figure 25A). Un faible niveau reste détectable, attribué à une partie de Cdc2 qui reste associé à des Cyclines non dégradées ou nouvellement synthétisées. Après cette phase de destruction, dès l'anaphase I, l'activité MPF remonte rapidement en raison de la synthèse des Cyclines B1, B2, B4 et B5 (Kobayashi et al., 1991; Hochegger et al., 2001) qui s'amorce alors que la totalité du pool de Cycline B n'a pas été détruit. La réactivation prématurée du MPF permet l'entrée de l'ovocyte en deuxième division de méiose, sans reformation de l'enveloppe nucléaire, décondensation des chromosomes et réplication de l'ADN. La synthèse et/ou la stabilisation des Cyclines B, et l'activité kinasique du MPF sont essentielles pour assurer l'absence d'interphase entre les deux divisions et la transition MI/MII caractéristique de la méiose (Gross et al., 2000). L'utilisation de cycloheximide pour bloquer toute synthèse protéique juste après GVBD conduit à la disparition rapide des Cyclines dans l'ovocyte, à l'inactivation totale du MPF et au retour de la cellule en interphase avec formation d'un noyau répliquant (Figure 25A) (Huchon et al., 1993; Furuno et al., 1994; Hochegger et al., 2001). Plus spécifiquement, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre les quatre types de Cyclines B empêche la réactivation du MPF et la formation du fuseau de métaphase II (Hochegger et al., 2001). Ces résultats montrent que la resynthèse de Cyclines est nécessaire pour la transition MI/MII (Figure 25B). De plus l'injection d'une forme kinase dead de Cdc2 au moment de GVBD bloque l'entrée en méiose II et suffit à induire la réplication de l'ADN (Furuno et al., 1994). Enfin, un certain niveau d'activité kinasique du MPF est requis pour maintenir inactive la protéine Wee1 nouvellement synthétisée (Iwabuchi et al., 2000; Nakajo et al., 2000). L'ensemble de ces résultats montre que le résidu d'activité MPF subsistant entre la MI et la MII est essentiel pour empêcher un retour en interphase répliquative, et que la remontée d'activité MPF due à la synthèse de Cyclines assure l'entrée de la cellule dans une seconde phase M (Figure 25).

La voie Mos/MAPK contribue aussi à la réussite de cette transition entre les deux divisions. La suppression de la protéine Mos par une stratégie antisens, ou l'inhibition de la MAPK par le U0126, juste après GVBD, conduisent à un retour en interphase, avec formation d'un noyau répliquant (Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a).

Il est cependant difficile de dissocier les rôles respectifs de la voie Mos/MAPK et du MPF dans l'inhibition du retour en interphase. En effet, ces deux voies sont interdépendantes, et l'inhibition de l'une conduit à l'inactivation de l'autre (Frank-Vaillant et al., 2001; Hochegger et al., 2001). Des expériences de suppression spécifique de l'une en

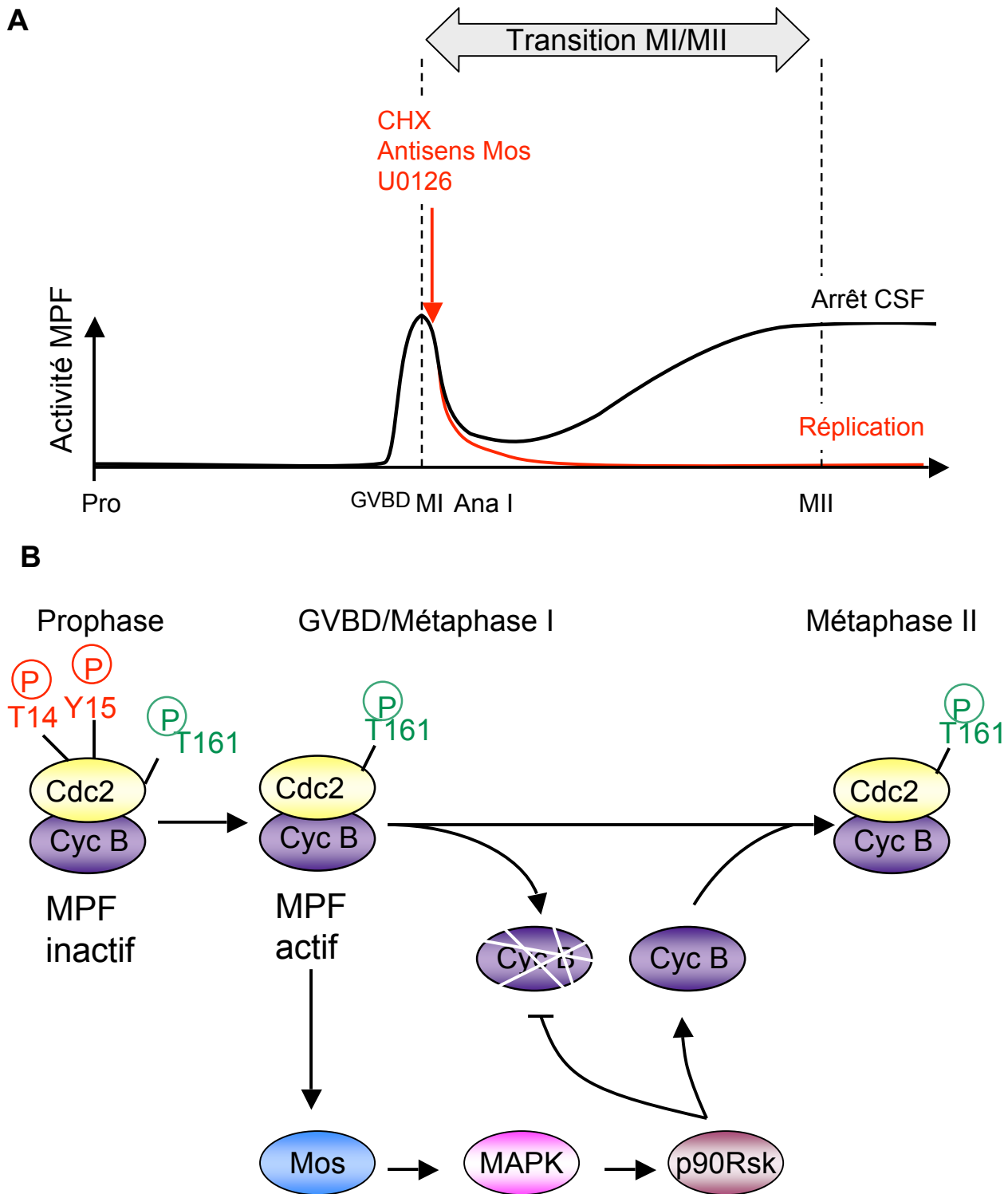


Figure 25 : La transition métaphase I/métaphase II

Le MPF est inactivé par dégradation des Cyclines juste après la métaphase I. Son activité ne s'annule cependant pas et le résidu d'activité restant doit être important pour éviter un retour en interphase répllicative. L'activité de la voie Mos/MAPK est elle aussi essentielle pour éviter ce retour en interphase. L'activité MPF remonte rapidement, permettant l'entrée en métaphase II.

présence d'un maintien artificiel de l'activité de l'autre sont requises pour comprendre les rôles respectifs de ces voies dans le contrôle de la transition MI-MII.

Les ovocytes subissent ensuite un nouveau blocage assuré par l'activité du CSF (Cytostatic factor) dont la composition sera étudiée par la suite. Le CSF assure le maintien d'une activité MPF élevée grâce à la stabilisation des Cyclines, et donc l'arrêt en métaphase II.

b) Absence de phase S : inhibition des pré-RCs

J.B. Gurdon a été le premier à étudier, en 1967, l'acquisition de la compétence d'un ovocyte à répliquer l'ADN génomique pendant la méiose (Gurdon 1967). Rapidement, il a été proposé que l'absence de réplication dans un ovocyte immature était liée à l'étape d'initiation de la réplication (Laskey et al., 1983), bien que l'ovocyte possède une polymérase fonctionnelle. Chez les eucaryotes, l'initiation de la réplication requiert l'assemblage d'un complexe de pré-réplication (Pré-RCs) sur la chromatine, contenant les protéines Orc, Cdc6, Cdt1 et des hélicases Mcm (Diffley 2001) (Figure 26). Ces complexes sont activés par les kinases Cdc7 et Cdk2, ce qui permet le recrutement de Cdc45, nécessaire au positionnement de la polymérase. Toutes ces protéines, à l'exception de Cdc6, sont exprimées dans un ovocyte de stade VI bloqué en prophase. La protéine Cdc6 est donc le facteur limitant, suffisant pour expliquer l'absence de réplication pendant la longue période de prophase (mois ou années) de l'ovocyte. La localisation et l'état de phosphorylation des protéines des pré-RCs représentent également des paramètres importants pour un assemblage correct du complexe. Dans un ovocyte de Xénope immature, Cdt1, Mcm et Cdc45 sont principalement nucléaires, alors que les Orc et Cdc7 sont majoritairement cytoplasmiques (Lemaitre et al., 2002; Whitmire et al., 2002), et ne peuvent donc pas s'associer aux Pré-RCs. Cdt1, Mcm, Orc, et Cdc7 ne sont phosphorylées qu'à GVBD et le restent jusqu'en métaphase II. L'expression de Cdc6 débute peu après GVBD et augmente considérablement en métaphase II (Lemaitre et al., 2002; Whitmire et al., 2002). L'ajout de cycloheximide (CHX) 30 à 60 minutes après GVBD, après que Cdc6 a commencé à s'accumuler, empêche la réactivation du MPF et la progression dans la méiose, et entraîne la formation de noyaux qui répliquent leur ADN. Par contre, l'ajout de CHX à GVBD, avant la synthèse de Cdc6 entraîne la formation de noyaux non répliquants (Furuno et al., 1994; Lemaitre et al., 2002; Whitmire et al., 2002), ce qui s'explique par l'absence de Cdc6, dont la synthèse a été inhibée par la CHX. L'injection de Cdc6 dans des ovocytes à GVBD et traités à la CHX, induit la réplication de l'ADN, montrant que cette protéine est à la fois nécessaire et suffisante dans ce processus (Lemaitre et

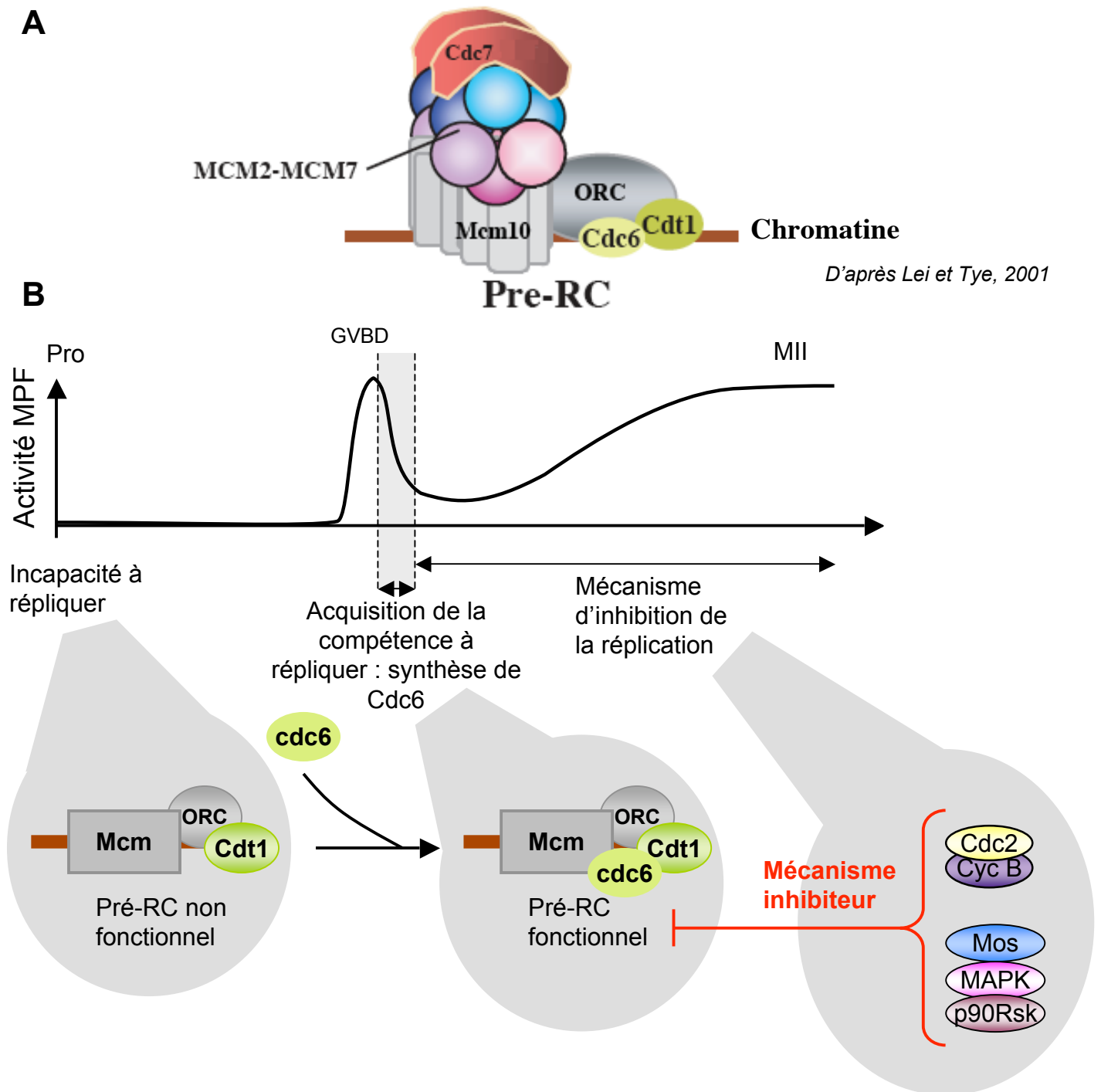


Figure 26 : Le complexe Pré-RC

A: Chez les eucaryotes, l'initiation de la réplication requiert l'assemblage d'un complexe de pré-réplication sur la chromatine contenant les protéines Orc, cdc6, Cdt1, et les hélicases Mcm. Ces complexes sont activés par les kinases Cdc7 et Cdk2.

B : Acquisition de la compétence à répliquer dans l'ovocyte

al., 2002; Whitmire et al., 2002). Ces expériences montrent que l'acquisition de la compétence à répliquer l'ADN se fait pendant la première division de méiose, et dépend de la synthèse de Cdc6, au moment de GVBD (Furuno et al., 1994; Lemaitre et al., 2002; Whitmire et al., 2002). L'ovocyte devenant capable de répliquer l'ADN juste après GVBD, il doit donc exister un mécanisme inhibant la machinerie de réplication à la transition métaphase I et métaphase II et perdurant jusqu'à la fécondation. Il a été proposé que la réactivation prématurée du MPF avant la métaphase II et/ou la voie MAPK pouvaient jouer un rôle dans l'inactivation des pré-RCs et l'absence de réplication entre les deux divisions (Furuno et al., 1994). En effet, des ovocytes injectés avec des oligonucléotides antisens dirigés contre Mos ou traités avec du U0126, un inhibiteur de MEK, effectuent GVBD, mais ne progressent pas en deuxième division de méiose (Figure 25A) (Roy et al., 1996; Verlhac et al., 1996; Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a). Au contraire, leur chromatine se décondense et une synthèse d'ADN se met en place (Furuno et al., 1994; Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a). Comme nous l'avons vu précédemment, il est difficile de comprendre si c'est la voie Mos/MAPK, ou le MPF, ou les deux, qui agissent sur les composants des pré-RCs, car les deux sont inter-dépendantes. L'hypothèse la plus probable est que les deux voies se régulent positivement l'une l'autre, et que chacune agit négativement sur des cibles spécifiques des pré-RCs qui restent à identifier, de manière à inhiber la réplication.

4) L'arrêt en métaphase II

a) Caractéristiques de l'arrêt

En 1971, Masui et Markert ont mis en évidence l'activité CSF en parallèle à celle du MPF. Ils ont injecté un blastomère d'un embryon au stade deux cellules avec le cytoplasme d'un ovocyte mature non fécondé (Figure 23), et ils ont montré que le blastomère injecté arrête ses divisions et reste bloqué en métaphase. Par conséquent, il doit exister un facteur dans le cytoplasme de l'ovocyte en métaphase II qui permet l'arrêt de la division en phase M : le CSF pour Cytostatic Factor (Masui and Markert 1971). Cet arrêt est caractérisé par la présence d'un fuseau de métaphase et d'une activité MPF élevée, comme cela est le cas pour un ovocyte ayant achevé la maturation méiotique et bloqué en métaphase II. Contrairement au MPF, l'identité du ou des facteur(s) impliqué(s) dans l'arrêt CSF est longtemps restée inconnue. Néanmoins, les recherches concernant le CSF ont conduit à la définition de critères auxquels les molécules doivent répondre pour rendre compte d'une activité CSF : 1) elles doivent être synthétisées au cours de la maturation méiotique, 2) elles doivent être présentes et

fonctionnelles en métaphase II, et enfin 3) elles doivent être inactivées ou dégradées à la fécondation.

Chez le Xénope, la synthèse protéique est requise pour l'établissement de l'activité CSF, mais non pour son maintien. En effet, le traitement des ovocytes par la CHX peu de temps après GVBD conduit à la disparition de l'activité du MPF, et un retour en interphase alors que le traitement par la CHX d'ovocytes déjà bloqués en métaphase II n'induit qu'une chute partielle de l'activité de Cdc2, mais n'affecte pas le fuseau de métaphase (Thibier et al., 1997). Cette chute partielle de l'activité de Cdc2 est corrélée avec une dégradation partielle des Cyclines. Cependant les activités de Mos et de la MAPK ne sont pas affectées par la CHX. Ces résultats montrent qu'il existe donc un pool de Cyclines B qui est sujet à un turn-over rapide (Thibier et al., 1997). Le pool de Cyclines non sensible à la CHX est stabilisé, et assure donc la stabilisation du MPF et l'arrêt en métaphase II. Ceci indique que soit l'APC/C est inhibé en partie en métaphase II, soit que ce pool est protégé de l'APC/C. Il est probable que la situation physiologique corresponde à une combinaison de ces deux hypothèses. Le pool de Cycline B en turn-over est bien la cible de l'APC/C (Yamamoto et al., 2005), ce qui montre qu'une fraction de l'APC/C, peut-être localisée dans un compartiment particulier, est active dans un ovocyte en métaphase II. En revanche, l'APC/C est incapable de dégrader le reste du pool de Cycline B et doit être inactif. L'activité de l'APC/C est ensuite requise pour la sortie de la MII puisque son inhibition empêche l'activation ovocytaire induite par le calcium (Thibier et al., 1997; Peter et al., 2001). Ceci suggère que l'APC/C doit être inhibé au moins en partie pour assurer l'arrêt en MII, mais on ne doit pas négliger un niveau parallèle de régulation portant sur la compartimentation de ces différents acteurs. Le facteur CSF a donc très probablement pour cible l'APC/C.

b) Mos et les composants de la voie MAPK

Sagata et al. ont proposé que le proto-oncogène Mos est l'un des éléments responsables de l'arrêt CSF (Sagata et al., 1989b). En effet, l'injection de l'ARNm de Mos dans un blastomère d'un embryon au stade deux cellules conduit à l'arrêt des divisions en phase M, tandis que l'immunodépletion de Mos dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II supprime leur capacité à induire un arrêt CSF lorsqu'ils sont injectés dans un blastomère (Sagata et al., 1989b). *In vivo*, l'inhibition de la synthèse de Mos par des morpholinos antisens conduit après GVBD à une activation périodique du MPF entrecoupée par des phases de réplication de l'ADN (Dupré et al., 2002a). Ces résultats indiquent que Mos est nécessaire à la mise en place de l'arrêt CSF. Par la suite, les différents membres de la voie initiée par Mos

ont été caractérisés. L'ensemble de ces membres, MEK, MAPK et p90Rsk, injectés dans un blastomère, induisent eux aussi l'arrêt des divisions en phase M (Haccard et al., 1993; Bhatt and Ferrell 1999; Gross et al., 1999). De manière générale, l'activation de la MAPK dans un blastomère d'embryon au stade deux cellules, même par des protéines qui ne la contrôlent pas dans l'ovocyte, comme Ras ou Raf, conduit à un arrêt CSF. Enfin, l'invalidation de Mos par KO chez la Souris ou par anti-sens chez l'Etoile de Mer, conduit à une absence d'arrêt de la méiose ovocytaire et à des embryons parthénogénétiques (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996; Tachibana et al., 2000). Il est donc clair que la voie Mos/MAPK est essentielle à l'arrêt de la méiose en métaphase II chez les vertébrés, chez toutes les espèces où cela a été étudié. Notons que Mos est dégradé après la fécondation et que la voie MAPK n'est pas réactivée pendant l'embryogénèse précoce. Ceci est cohérent avec une disparition de l'activité CSF, autorisant les cycles de divisions embryonnaires. En revanche, la cinétique d'inactivation de Mos (90 min) n'explique pas la dégradation des Cyclines (10 min) qui a lieu lors de l'activation. Le calcium doit donc avoir une cible distincte de Mos induisant l'activation de l'APC/C. La question essentielle concernant l'arrêt CSF est de savoir comment la MAPK et p90Rsk assurent l'inhibition de l'APC/C.

c) Intervention des points de contrôle du fuseau

L'arrêt CSF dépend de l'inhibition de l'APC/C. Il a été proposé que cette inhibition soit due à l'activation de composants du point de contrôle du fuseau (Lorca et al., 1998; Vorlauffer and Peters 1998; Tunquist and Maller 2003). Bien que les fuseaux des ovocytes soient normaux, un système original à l'ovocyte, comme la voie Mos/MAPK, pourrait activer le point de contrôle du fuseau, connu pour conduire à l'inhibition de l'APC/C. En effet, la déplétion de certaines protéines du point de contrôle du fuseau est capable de supprimer la mise en place de l'arrêt CSF induit par Mos, indiquant qu'elles sont nécessaires à l'action de Mos (Tunquist et al., 2002; Tunquist and Maller 2003). Cependant elles ne semblent pas nécessaires au maintien de l'activité CSF établi par Mos puisque l'immunodéplétion des protéines Bub1 et Mad2 dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II n'entraîne pas la perte de l'activité CSF (Tunquist et al., 2002; Tunquist and Maller 2003). Un système différent doit donc assurer le maintien de l'arrêt en métaphase II.

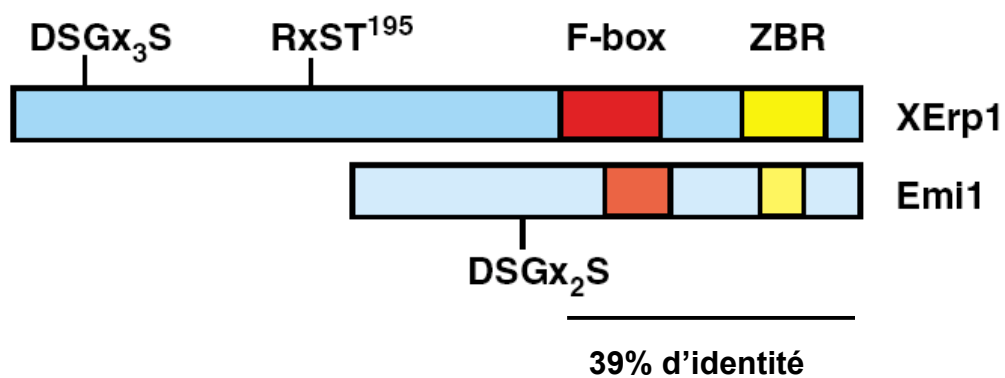
d) Cdk2/Cycline E

Un autre candidat proposé est la protéine kinase Cdk2. Cdk2 associée à la Cycline E agit principalement en G1/S dans les cellules somatiques pour permettre l'initiation de la

réplication, puis, en association avec la Cycline A, contrôle la progression de la phase S. Dans les ovocytes de Xénope en prophase, Cdk2 et son partenaire, la Cycline E, sont présents à des niveaux très faibles, et augmentent fortement en méiose II (Rempel et al., 1995). L'inhibition de la synthèse de Cdk2 par des oligonucléotides antisens conduit à la levée de l'arrêt CSF (Gabrielli et al., 1993). L'arrêt CSF peut être restauré en injectant dans ces mêmes ovocytes la protéine Cdk2 recombinante. Cependant, il est difficile de comprendre comment le complexe Cycline E/Cdk2, actif pendant toute l'embryogénèse précoce, perd son activité CSF et ne stoppe pas les divisions embryonnaires. En outre, ces résultats ont été remis en question par Furuno et al., puisque l'injection d'un inhibiteur spécifique des Cdk, p21^{Cip1}, n'affecte pas l'arrêt en métaphase II, suggérant que Cdk2/Cycline E n'est pas requis pour l'arrêt CSF (Furuno et al., 1997). Récemment des expériences en extraits ont permis d'expliquer en partie ce résultat. En effet, dans des extraits cyclants, l'une de ces deux voies, MAPK ou Cycline E/Cdk2, est suffisante pour induire l'arrêt en métaphase (Tunquist et al., 2003). La voie MAPK pourrait donc prendre le relais du complexe Cdk2/Cycline E dans les ovocytes injectés avec p21^{Cip1} pour conduire à l'arrêt en MII. Ces deux voies pourraient donc coopérer dans l'ovocyte pour conduire à l'arrêt CSF. Néanmoins, la voie Mos/MAPK étant nécessaire à l'arrêt CSF, contrairement à Cdk2/Cycline E, elle joue clairement un rôle prédominant.

e) Emi/Erp

Récemment, une nouvelle catégorie de protéines inhibitrices de l'APC/C a été mise en évidence : la famille Erp/Emi (Reimann et al., 2001; Schmidt et al., 2006). Cette famille de deux protéines (Emi1 et Emi2/Erp1) a été identifiée par un crible ciblant des protéines contenant une F-Box (Figure 27). Les protéines contenant une F-Box sont connues pour appartenir au complexe Skp1/Cullin/F-box (SCF), une protéine ubiquitine ligase de la famille E3, comme l'APC/C. Les protéines Erp1 et Emi1 ne sont néanmoins pas des membres de SCF et possèdent la propriété d'inhiber l'APC/C. Elles contiennent également un domaine de liaison au Zinc, essentiel pour leur activité inhibitrice de l'APC/C (Reimann et al., 2001; Schmidt et al., 2006). Lors d'un cycle mitotique, l'activité MPF augmente et permet l'entrée en mitose. Cependant, cette augmentation de l'activité de Cdk1 a également pour conséquence l'activation de l'APC/C qui pourrait dégrader prématurément la sécurine et les Cyclines. Il existe donc un mécanisme inhibant l'APC/C pour empêcher cette dégradation avant l'anaphase. Il a été proposé qu'Emi1 assure ce rôle inhibiteur. En effet, l'expression de Emi1 est maximale en phase S, et la protéine est dégradée en mitose selon un mécanisme dépendant du protéasome mais n'impliquant pas l'APC/C (Reimann et al., 2001).



D'après Schmidt et al., 2006

Figure 27 : La structure des Emi

XErp1/Emi2 et XEmi1 présentent 39% d'identité de séquence dans leur partie C-terminale. Cette extrémité contient la F-box et la région de liaison au zinc (ZBR).

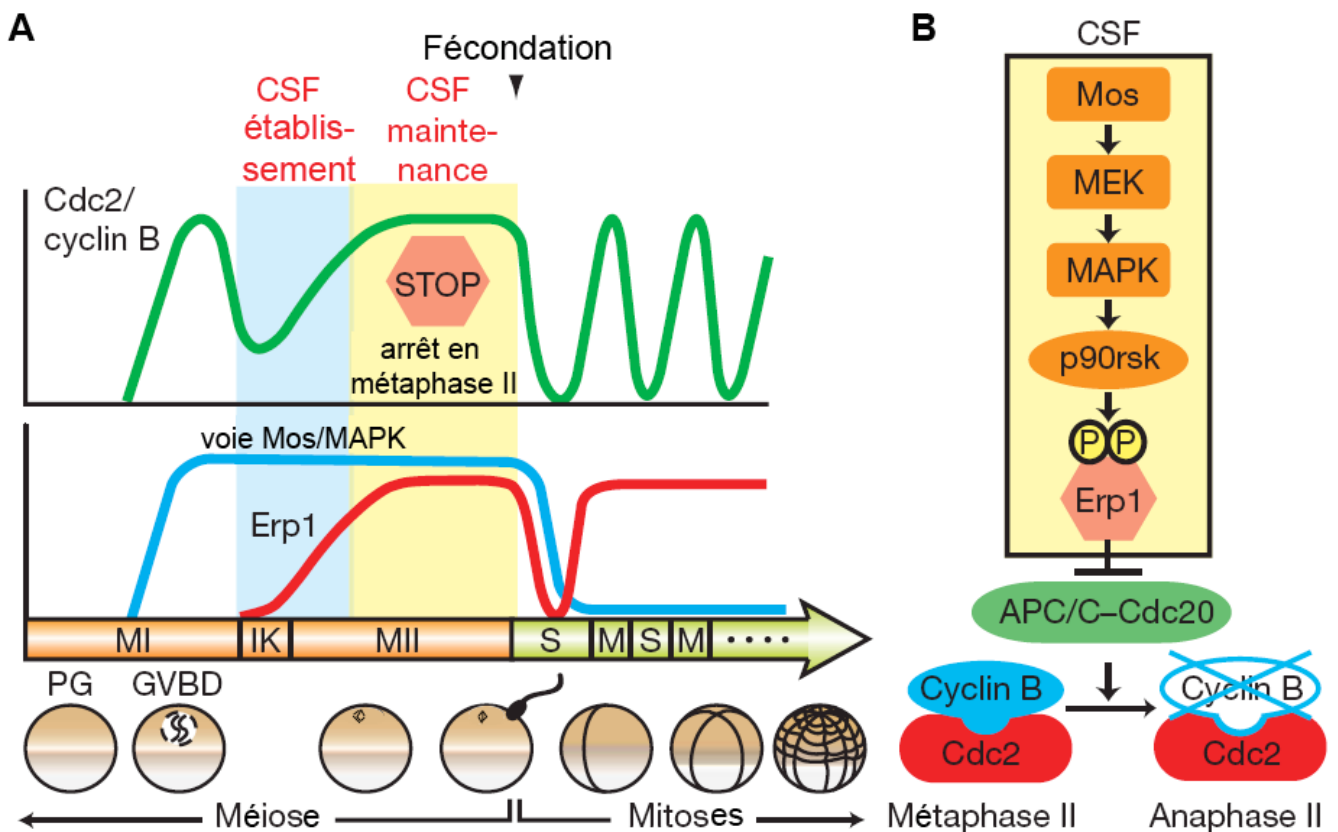
Les motifs DSGx₂S et DSGx₃S correspondent à des « dégrons » contrôlant la stabilité de la protéine.

Le motif RxST¹⁹⁵ de Xerp1 est phosphorylé par la CAMKII.

Emi1 apparaissait comme un bon candidat pour assurer l'arrêt CSF. Effectivement, l'injection de XEmi1 dans un blastomère d'un embryon au stade deux cellules induit l'arrêt des divisions dans la cellule injectée, et la déplétion de la protéine dans des extraits CSF induit une activation prématurée de l'APC/C, renforçant l'hypothèse qu'Emi1 puisse assurer l'arrêt CSF (Reimann et al., 2001; Reimann and Jackson 2002).

Emi1 serait présent dans l'ovocyte en prophase et son expression augmenterait en réponse à la stimulation hormonale. Cependant, une importante controverse s'est développée au sujet de l'implication de cette protéine dans l'arrêt CSF. Tout d'abord, l'anticorps utilisé dans les expériences d'immunodéplétion était dirigé contre l'extrémité N-terminale de Emi1, qui s'est avérée être commune avec l'autre protéine de la famille, Emi2. De plus, l'addition de Emi1 dans des extraits de Xénope bloqués en métaphase II, bloque la dégradation des Cyclines A et B (Reimann et al., 2001), ce qui diffère de l'arrêt CSF induit par Mos où seule la Cycline B est stabilisée (Tunquist et al., 2003). Enfin et surtout, Ohsumi et al. ont montré que, contrairement à Reimann et al., la protéine Emi1 endogène n'était pas détectable dans les ovocytes bloqués en MII, que la protéine exogène n'était pas stable au cours de la maturation méiotique et dans des extraits CSF, qu'une forme non dégradable de Emi1 bloquait la progression dans la méiose et que l'arrêt induit par Emi1 était indépendant de la voie MAPK (Ohsumi et al., 2004). Parmi ce nombre élevé d'éléments en défaveur d'un rôle de Emi1 dans le CSF, il est clair que l'absence de Emi1 dans l'ovocyte n'est pas compatible avec son rôle présumé dans l'arrêt CSF.

Dans un second temps, une autre protéine apparentée à Emi1 a été caractérisée : Emi2 ou XErp1 (Schmidt et al., 2005). Comme Emi1, c'est un inhibiteur de l'APC/C. Emi2/XErp1 apparaît être essentiel pour l'activité CSF. En effet, l'immunodéplétion de Emi2/XErp1 dans des extraits CSF conduit à la levée de l'arrêt CSF. De plus, dans ces extraits, Emi2/XErp1 est dégradée en réponse à l'addition de calcium. Des expériences d'inactivation d'Emi2/XErp1 menées dans l'ovocyte de Souris suggèrent également que cette protéine contrôle l'arrêt en MII chez cette espèce (Amanai et al., 2006). Emi2/XErp1 est présente à l'état de traces dans les ovocytes en prophase et est fortement accumulée après la méiose I. Ceci explique qu'il n'y ait pas d'arrêt en MI, période pendant laquelle Emi2/XErp1 n'est exprimée qu'à un très faible niveau, mais seulement en métaphase II où elle est fortement accumulée (Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007). Elle subit par ailleurs des modifications post-traductionnelles de type phosphorylations, à la transition méiose I/méiose II (Schmidt et al., 2005), ce qui est en corrélation avec son activation en méiose II, pendant l'arrêt CSF (Figure 28).



D'après Inoue et al., 2007

Figure 28 : Le rôle de Erp1/Emi2 dans l'arrêt CSF chez le Xénope

A : Niveaux d'activité de la voie Mos/MAPK, de Erp1, et du MPF au cours de la maturation méiotique et des premières divisions embryonnaires.

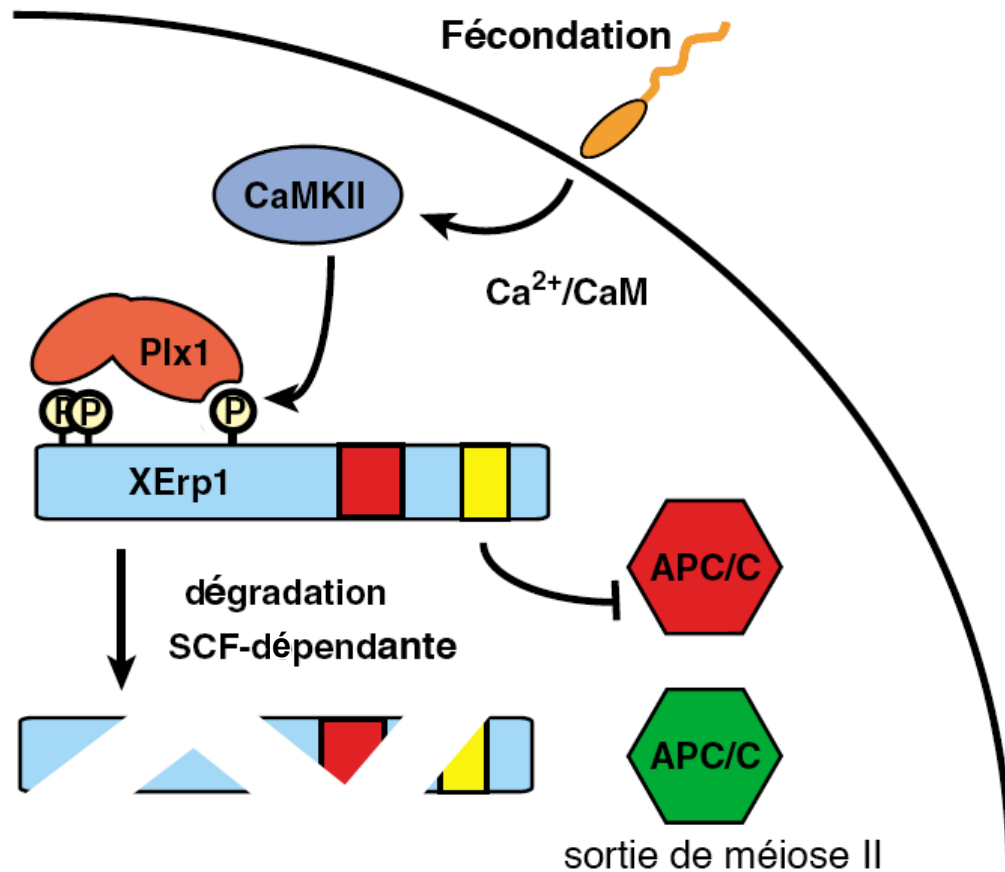
B : La phosphorylation de Erp1 par p90Rsk (cible de la voie MAPK), lui confère la capacité à arrêter la cellule en métaphase II via l'inhibition de l'APC/C.

Comment relier le rôle de la voie Mos/MAPK, et celui de cette protéine dans l'arrêt CSF ? Deux articles récemment publiés (Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007) répondent à cette question. Ils montrent que Emi2/XErp1 est l'objet d'une phosphorylation originale à l'arrêt en MII, effectuée par la kinase p90Rsk, cible de la voie Mos/MAPK. Cette phosphorylation confère à Emi2/XErp1 sa capacité à arrêter la cellule en métaphase, via l'inhibition de l'APC/C. Ceci explique comment la voie Mos/MAPK est connectée à l'inhibition de l'APC/C : via la régulation par phosphorylation de la protéine Emi2/Xerp1 (Figure 28). Après fécondation, la protéine Emi2/Xerp1 subit une phase de dégradation puis est ré-exprimée et persiste dans l'embryon, mais l'absence de la voie Mos/MAPK/p90Rsk l'empêche d'exercer son rôle cytotatique.

Le CSF ne correspond donc pas à un facteur mais à une cascade d'éléments partant de Mos et s'achevant par l'inhibition de l'APC/C via Emi2/XErp1 (Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007).

5) Sortie de métaphase II : l'activation de l'ovocyte

La décharge calcique induite par le spermatozoïde est responsable de la dégradation des cyclines B et de la sortie de métaphase II. Il a été montré en 1991 que la cible du calcium est la calmoduline kinase II (CamKII), dont la cible était jusqu'à présent inconnue (Lorca et al., 1993). Une publication récente a montré que la CamKII phosphorylait la protéine Emi2/XErp1, créant un site d'accès pour Plx1 (Liu and Maller 2005). La phosphorylation d'Emi2/XErp1 par Plx1 entraîne alors rapidement sa dégradation par l'ubiquitine ligase SCF^{βTrCP}, ce qui lève l'inhibition exercée sur l'APC/C et entraîne la dégradation des Cyclines (Figure 29). Parallèlement à ce processus de dégradation, Emi2/XErp1 serait très rapidement déphosphorylée et inhibée par une phosphatase, activée par le calcium (Hansen et al., 2006). Comme nous l'avons vu, la protéine Emi2/XErp1 est ensuite ré-exprimée lors des cycles embryonnaires, mais elle n'est pas phosphorylée par p90Rsk, en raison de l'absence de la voie Mos/MAPK, et n'exerce donc pas ses propriétés CSF.



D'après Schmidt et al., 2006

Figure 29 : La sortie de métaphase II

La fécondation conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, ce qui a pour conséquence l'activation de la CAMKII. La cible de la CAMKII est la protéine XErp1. Sa phosphorylation par la CamKII lui permet d'être phosphorylée par la kinase Plx1, ce qui provoque sa dégradation par le biais de l'ubiquitine ligase SCF. L'APC/C n'est plus inhibé par XErp1, et la cellule peut sortir de la méiose.

CHAPITRE IV

LA VOIE MOS/MAPK ET LE MPF : UNE CONNEXION VIA MYT1 ?

1) La famille des kinases Wee1

a) Présentation générale

La famille des protéines kinases Wee1 comprend les kinases Wee1 et Myt1, qui sont responsables de la phosphorylation et de l'inhibition du complexe Cdc2/Cycline B en interphase. Wee1 et Myt1 catalysent toutes les deux la phosphorylation inhibitrice du résidu Tyr15 de Cdc2, mais Myt1 est également capable de phosphoryler la Thr14, qui est également inhibitrice sous sa forme phosphorylée (Parker and Piwnica-Worms 1992; Fattaey and Booher 1997). Le produit du gène *wee1* de *S. pombe*, Swe1, a été la première Cdc2-kinase identifiée (Parker et al., 1991). Puis la kinase Mik1, un homologue fonctionnel de Swe1, a été identifiée chez cette même espèce (Lundgren et al., 1991; Furuya and Carr 2003). Des homologues de Wee1 ont ensuite été découverts chez toutes les espèces étudiées de la levure *S. cerevisiae* à l'Homme (Igarashi et al., 1991; Parker and Piwnica-Worms 1992; Booher et al., 1993; Mueller et al., 1995b; Watanabe et al., 1995). Chez le Xénope et chez les mammifères, deux isoformes de Wee1 ont été identifiées. La première isoforme est exprimée dans l'ovocyte et chez l'embryon (Wee1A chez le Xénope, Wee1B chez les mammifères) et contrôle l'arrêt en prophase I de l'ovocyte ainsi que les premières divisions mitotiques embryonnaires (Murakami and Vande Woude 1998; Han et al., 2005). La deuxième est exprimée plus tardivement au cours du développement (Wee2 ou Wee1B chez le Xénope, et Wee1A chez les mammifères) et contrôle les cycles mitotiques somatiques après la transition mid-blastulénne (Leise and Mueller 2002; Okamoto et al., 2002). Wee1 est majoritairement nucléaire, et prévient l'accumulation de complexes Cdc2/Cycline B actifs dans le noyau pendant l'interphase (Heald et al., 1993; Baldin and Ducommun 1995).

Chez la levure, l'inhibition de Cdc2/CDC28 n'est contrôlée que par la phosphorylation de la Tyr15 alors que chez les eucaryotes supérieurs Cdc2 est également phosphorylé sur Thr14. L'existence d'une kinase responsable de cette phosphorylation a été mise en évidence dans les fractions membranaires d'extraits d'œufs de Xénope (Kornbluth et al., 1994; Mueller et al., 1995b), puis le cDNA de la kinase a été cloné et nommé Myt1 (Membrane-associated-tyrosine-and threonine specific, Cdc2 inhibitory kinase). Myt1 est donc associée aux

membranes intracellulaires et peut inhiber Cdc2 soit en le phosphorylant, soit en le séquestrant à la membrane (Liu et al., 1999; Wells et al., 1999). Un homologue de Myt1 a ensuite été identifié chez l'Homme à partir de cellules HeLa (Liu et al., 1999), puis plus récemment chez l'Etoile de Mer, la Drosophile, et le ver *C. elegans* (Wee-1.3) (Cornwell et al., 2002; Okumura et al., 2002; Burrows et al., 2006). Chez la souris, la présence de l'ARNm a été mise en évidence dans l'ovocyte. Chez le Xénope, Myt1 n'est exprimée et active que pendant l'ovogenèse et la méiose ovocytaire. Chez la Drosophile, Myt1 est impliquée dans les divisions mitotiques de la gamétogenèse mâle et femelle et pendant la méiose (Jin et al., 2005). Enfin, chez *C. elegans*, Myt1 est requise pour le bon déroulement de la maturation ovocytaire, contrôle l'entrée en phase M pendant les divisions mitotiques de la spermatogenèse et la transition G2/M de la méiose mâle (Burrows et al., 2006).

Myt1 est donc une kinase qui régule la transition G2/M, principalement exprimée dans les cellules germinales et dans des cellules en prolifération.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à la régulation de la kinase Myt1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope.

b) Structure et mode d'action de Myt1

Les membres de la famille Wee1 partagent un haut degré d'identité de séquence au niveau de leur domaine kinasique : 39% entre Myt1 et Wee1, et 64% entre Myt1 de Xénope et Myt1 Humain (Figure 30).

Myt1, contrairement à Wee1, possède un domaine transmembranaire situé en C-terminal du domaine catalytique, et constitué d'une séquence de 20 acides aminés hydrophobes ou non chargés, bornée par un résidu basique à chaque extrémité, formant une hélice alpha (Mueller et al., 1995b; Liu et al., 1997). Myt1 est donc une protéine associée aux membranes intracellulaires, Golgi et réticulum endoplasmique, avec son domaine catalytique et sa partie C-terminale situés du côté cytoplasmique (Figure 31) (Wells et al., 1999). La partie N-terminale de l'enzyme est une région de 70 à 90 acides aminés riche en prolines et contenant de nombreux sites potentiels de phosphorylation dont la Ser66 et la Ser76 qui pourraient intervenir dans l'autophosphorylation de Myt1 (Kristjansdottir et al., 2006). Wells et al. ont montré que dans des cellules humaines, la délétion de la partie C-terminale de Hu-Myt1 abolissait la phosphorylation par Cdk. Ils ont également montré que cette région contient de nombreux sites putatifs de phosphorylation par les Cdk et qu'elle interagirait avec les complexes Cdk/Cycline dans le cytoplasme ce qui permettrait à Myt1 de les inhiber en les séquestrant d'une part et en les phosphorylant d'autre part (Wells et al., 1999).



Figure 31 : Structure de Myt1

La partie N-terminale de l'enzyme est une région de 70 à 90 acides aminés riche en prolines et contenant de nombreux sites potentiels de phosphorylation dont la Ser66 et la Ser76 qui pourraient intervenir dans l'autophosphorylation de Myt1. La partie C-terminale, qui contient environ 150 acides aminés et de nombreux sites de phosphorylation, interagirait avec les complexes Cdk/Cycline. PBD: Polo Binding Domain, TR: Domaine Transmembranaire.

2) La régulation de Myt1

En prophase, le MPF est maintenu sous la forme de pré-MPF inactif par deux phosphorylations inhibitrices de Cdc2 sur Tyr15 et Thr14, catalysées par la kinase Myt1. L'activation du MPF repose sur la conversion du stock de pré-MPF inactif en stock de MPF actif, suite à la déphosphorylation activatrice de Cdc2 par la phosphatase Cdc25 (Dunphy and Kumagai 1991; Gautier et al., 1991; Kumagai and Dunphy 1991), et à l'inhibition de Myt1 (Mueller et al., 1995b). Chez le Xénope, Cdc25 est présente pendant toute la croissance cellulaire des ovocytes bloqués en prophase I. Wee1 est exprimée pendant la première partie de la vitellogenèse (stade I à stade IV) et assure l'accumulation du pré-MPF pendant cette période. A partir du stade IV, la kinase Wee1 n'est plus exprimée et le relais est pris par Myt1 qui est la seule kinase inhibitrice de Cdc2 exprimée du stade IV au stade VI, puis pendant la maturation méiotique. Ce n'est qu'en fin de maturation méiotique (lors de l'entrée en métaphase II) que Wee1 est ré-exprimée. Pendant la période que nous avons étudiée (fin de croissance ovocytaire et activation du MPF lors de la maturation méiotique), Myt1 est donc la seule kinase concernée par l'inhibition de Cdc2 sur Tyr15 et Thr14. Les niveaux protéiques de Cdc25 et Myt1 sont constants tout au long de la maturation méiotique (Nakajo et al., 2000; Okumura et al., 2002). Leur régulation est donc dépendante d'un mécanisme post-traductionnel. Cdc25 est hyperphosphorylée et activée à GVBD, au moment où le MPF est activé (Izumi et al., 1992), tandis que Myt1 est hyperphosphorylée et probablement inactivée (Palmer et al., 1998). Notons que les niveaux de phosphorylation de Myt1 et de Cdc25 sont évalués par leurs retards de migration sur gel d'électrophorèse. Les paramètres qui contrôlent la balance Myt1/Cdc25 en réponse à la progestérone au cours de la maturation méiotique restent une question clé qui n'a pas encore été résolue. Plus particulièrement, les informations concernant la régulation de l'activité de la kinase Myt1 sont limitées. L'activité de Myt1 dans l'ovocyte bloqué en prophase I n'a jamais été formellement mesurée. Dans les ovocytes de stade VI, les Cyclines B2/B5 sont synthétisées en continu, à un faible niveau, et les complexes formés avec les molécules de Cdc2 libre s'accumulent sous forme de pré-MPF phosphorylé sur Tyr15, montrant que la kinase Myt1 est active (Kobayashi et al., 1991; Hocheegger et al., 2001). Néanmoins, l'injection de Cycline B ou A dans un ovocyte de stade VI conduit à l'activation du MPF, montrant que l'activité de Myt1 n'est pas suffisante pour bloquer le système. La situation est très différente dans un petit ovocyte de stade IV, chez qui l'injection de Cycline B ou A conduit à l'accumulation de néo-complexes inactifs phosphorylés sur Tyr15 (Rime et al., 1991; Karaïskou et al., 2004). L'activité de Myt1, sa localisation, la

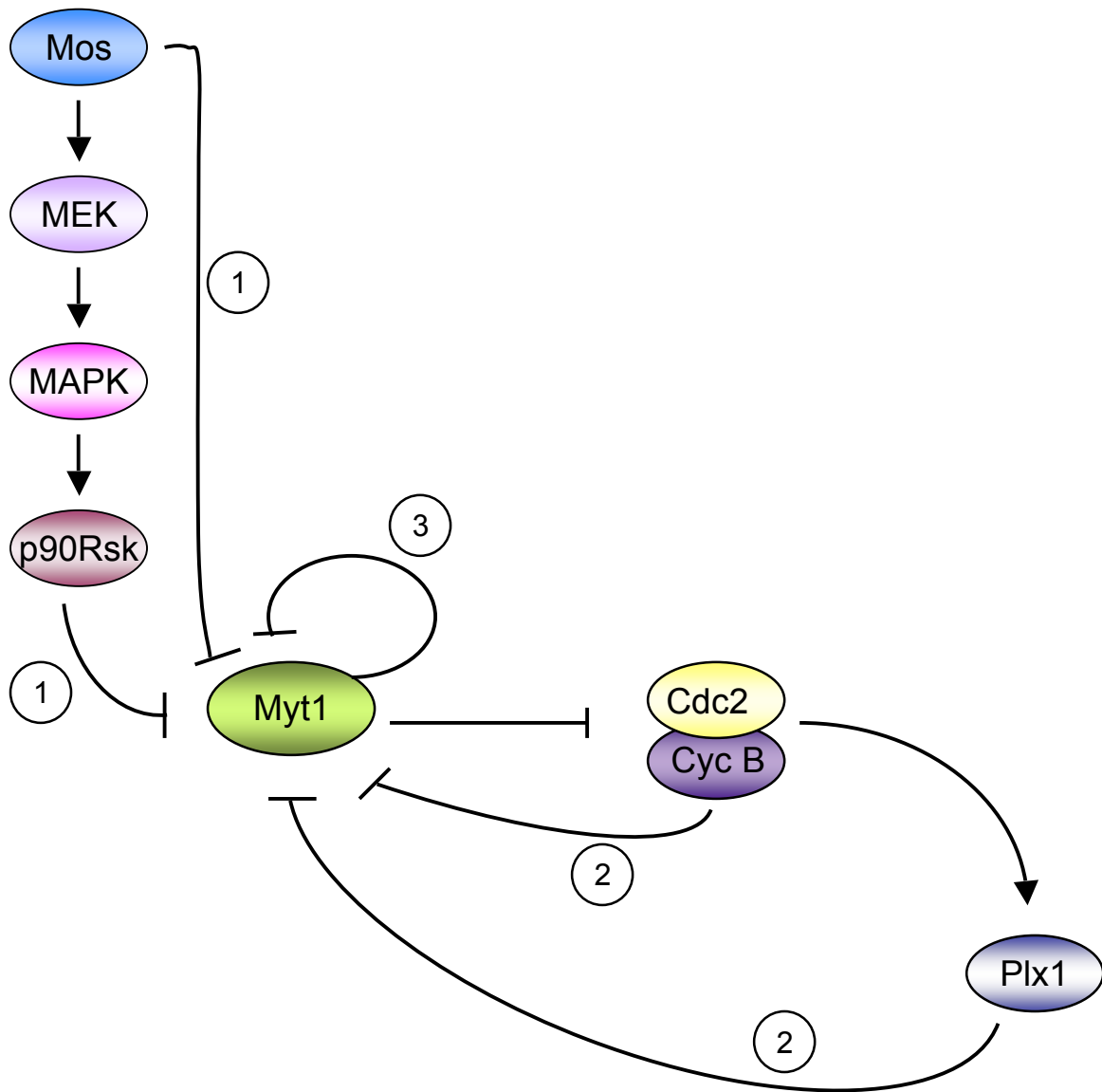


Figure 32 : La régulation de Myt1, hypothèses

- 1) Régulation par la voie Mos/MEK/MAPK/p90Rsk
- 2) Régulation par les kinases Cdc2 et Plx1
- 3) Autophosphorylation

balance Cdc25/Myt1, et/ou l'accessibilité des complexes Cdc2-Cycline B sont donc des éléments régulés de manière différente dans les petits ovocytes de stade IV et des gros ovocytes de stade VI, bien que ces deux catégories d'ovocytes soient toutes deux bloquées en prophase I.

En ce qui concerne la reprise de la méiose déclenchée par la progestérone dans l'ovocyte de stade VI, il n'a jamais été démontré que l'inhibition de Myt1 était nécessaire à l'activation initiale du MPF.

L'étude de la régulation de Myt1 dans les ovocytes de Xénope au cours de la maturation méiotique a donc fait l'objet d'une partie de ma thèse. Chez le Xénope, Myt1 est présente dans les ovocytes en prophase. Trois hypothèses concernant sa régulation négative à la transition G2/MI ont été proposées (Figure 32). La première reposerait sur la synthèse de Mos, l'activation de la cascade MEK/MAKP/p90Rsk et aboutirait à l'inhibition directe de Myt1 par p90Rsk et par Mos. La deuxième hypothèse repose sur une phosphorylation directe de Myt1 par le couple Cdc2/Plx1. Enfin, une troisième hypothèse impliquerait l'autophosphorylation de Myt1 qui serait un pré-requis pour son inactivation.

a) La régulation par la voie Mos/MAPK/p90Rsk

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'activation de la voie MAPK n'est pas requise pour l'entrée en méiose. En revanche, en l'absence d'activation de cette voie, l'activation de Cdc2 est retardée (Fisher et al., 1999; Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a). De plus, lorsque la synthèse de Cycline B est inhibée, la voie Mos/MAPK devient indispensable à l'activation du MPF (Haccard and Jessus 2006b). Ceci suggère qu'elle pourrait jouer un rôle facilitateur de l'activation de Cdc2, et plus particulièrement aider le MPF à lever un mécanisme inhibiteur de son activité. La voie MAPK pourrait donc réguler l'activité de Myt1, la kinase inhibitrice de Cdc2 dans les ovocytes en prophase.

Chez l'Etoile de Mer, Myt1 est hyperphosphorylée et inhibée, avant que l'activation de p90Rsk n'ait lieu (Okumura et al., 2002). Okumura et al. ont proposé que chez cette espèce, la cible de la voie PI3K, Akt, soit nécessaire et suffisante pour phosphoryler Myt1 à la transition G2/M, dans une région consensus de phosphorylation par Akt (RXRXXS/T), contenant la Sérine 75 (Okumura et al., 2002). Il est peu probable que ce soit la voie PI3K/Akt qui soit responsable chez le Xénope de la phosphorylation et de l'inhibition de Myt1 (voir chapitre V). Cependant, la séquence consensus de phosphorylation par Akt, et l'une des séquences consensus de phosphorylation par p90Rsk sur Myt1 se recouvrent (Leighton et al., 1995;

Vanhaesebroeck and Alessi 2000; Okumura et al., 2002). Il est donc envisageable que ce soit le même site qui soit phosphorylé par Akt chez l'Etoile de Mer et par p90Rsk chez le Xénope.

Palmer *et al.* ont montré par des expériences de pull-down à partir d'extraits d'œufs de Xénope que la kinase p90Rsk interagit avec un peptide correspondant à la partie C-terminale non catalytique de Myt et est responsable de la phosphorylation de ce domaine (Palmer et al., 1998). Il existe donc chez le Xénope au moins un site de phosphorylation par p90Rsk différent de celui décrit précédemment (situé en N-terminal et contenant la Serine 75). La kinase p90Rsk possède deux régions catalytiques distinctes : la région D1 (en N-terminal), qui est apparentée à PKA, et la région D2 (en C-terminal) qui est apparentée à la sous-unité γ de la phosphorylase kinase (Jones et al., 1988). L'interaction entre Myt1 et p90Rsk se fait par le biais d'une région distincte de ces deux domaines. En effet, Myt-Cter n'interagit avec p90Rsk que lorsque l'intégralité de la séquence de cette dernière est utilisée dans les expériences de GST pull-down. De plus, la pré-incubation de Myt1 avec la protéine p90Rsk active réduit considérablement la capacité de Myt1 à inhiber l'activité histone H1 kinase de Cdc2 *in vitro*. L'ensemble de ces résultats montrent que p90Rsk hyperphosphoryle l'extrémité C-terminale de Myt1 et régule ainsi négativement son activité ce qui contribuerait à l'activation de Cdc2. Cependant, la plupart de ces expériences ont été menées *in vitro* avec une forme active de p90Rsk, n'ont jamais été réalisées *in vivo* dans des ovocytes entiers et aucune étude cinétique, en particulier des événements déclenchés par la progestérone et se produisant avant l'activation du MPF, n'a été réalisée. Néanmoins, il a été montré par des expériences d'immunoprécipitation que ces deux kinases forment des complexes stables dans des ovocytes en métaphase II (Palmer et al., 1998; Inoue and Sagata 2005).

Cependant, dans les conditions physiologiques, la voie MAPK/p90Rsk est sous la dépendance de Cdc2 (Nebreda et al., 1995; Frank-Vaillant et al., 2001) et son activation n'est pas nécessaire pour l'activation du MPF (Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a). En conclusion, cette voie ne semble donc pas rendre compte de l'inhibition initiale de Myt1, mais pourrait être nécessaire au maintien de son inhibition pendant la maturation méiotique.

Il a aussi été suggéré que Mos pouvait être la kinase directement responsable de l'inhibition de Myt1 (Peter et al., 2002). Cependant, ces expériences ont été réalisées avec des oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de Mos, moins affins et ne reproduisant pas les mêmes conséquences que l'injection de Morpholinos (Dupré et al., 2002a; Baert et al., 2003). Nous avons ré-exploré cette possibilité et nos résultats seront présentés ultérieurement.

b) La régulation par les kinases Cdc2 et Plx1

La deuxième hypothèse concernant la régulation négative de Myt1 et son rôle dans l'activation initiale du MPF à GVBD, repose sur kinase Plx1.

Nakajima et al. ont montré que dans les cellules HeLa, la protéine Myt1 humaine contient dans sa partie C-terminale, des sites consensus de phosphorylation par Plk1 (Nakajima et al., 2003). Ils ont plus particulièrement décrit deux sites : la Sérine 426 et la Sérine 495. La séquence contenant le site de phosphorylation Ser495 contient également le site de liaison à Plk1 (PBD : Polo Binding Domain). Ces auteurs ont aussi montré que Myt1 est un substrat de Plk1. Cependant aucune mesure d'activité kinasique de Myt1 n'a été réalisée après phosphorylation par Plk1 dans cette publication. Chez le Xénope, le site équivalent à la Ser426 humaine existe : il s'agit de la Sérine 424 qui est également située dans une séquence contenant un site consensus de liaison à Plx1 (PBD, Figure 31) (Inoue and Sagata 2005). Inoue *et al*, (2005) ont montré pour la première fois chez le Xénope, par des expériences d'immunoprécipitation, que Plx1 interagit avec Myt1 pendant les mitoses embryonnaires mais pas pendant la maturation méiotique. Ils ont également montré que p90Rsk interagit avec Myt1 en métaphase II. Ils suggèrent que cette interaction avec p90Rsk pourrait soit directement soit indirectement empêcher Myt1 d'interagir avec Plx1 pendant la maturation méiotique (Inoue and Sagata 2005). Les associations Myt1-p90Rsk et Myt1-Plx1 seraient donc mutuellement exclusives. En effet, l'activation de la voie MAPK (injection de mRNA de Mos, ou d'une protéine p90Rsk active, ou d'une phosphatase inhibitrice de la MAPK) dans des d'œufs de Xénope activés empêche l'interaction entre Myt1 et Plx1 (Inoue and Sagata 2005). Plx1 phosphoryle Myt1 *in vitro* sur un site différent de la Ser424 et d'autres sites consensus de phosphorylation par Plx1 (S433, S487, T508, T546). La phosphorylation par Plx1 empêche Myt1 d'exercer son activité inhibitrice de Cdc2 (Inoue and Sagata 2005). Ces auteurs ont également montré que Cdc2 interagit avec Myt1 *in vitro* et *in vivo*, et qu'il phosphoryle Myt1 sur la Thr478 située dans un autre site consensus de liaison à Plx1 (PBD : S-pS/pT-P) pendant la maturation méiotique et pendant les divisions embryonnaires. Cependant, cette phosphorylation n'est pas requise pour le bon déroulement de la maturation méiotique. Ces résultats indiquent donc que Cdc2 et Plx1 sont toutes les deux impliquées dans la régulation de Myt1 à l'entrée en phase M. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, chez le Xénope, l'activation de Plx1 est sous le contrôle de Cdc2 pendant la maturation méiotique (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1999). Dans ces conditions, Plx1 ne peut à elle seule rendre compte de l'inhibition initiale de Myt1 puisque son activation et son activité dépendent de Cdc2.

La situation est donc confuse : les deux candidats inhibiteurs potentiels de Myt1, Plx1 et p90Rsk, ne semblent pas pouvoir rendre compte de l'inhibition initiale de Myt1 lancée par la progestérone, puisqu'ils sont eux-mêmes dépendants de l'activation du MPF.

c) La régulation par autophosphorylation

Récemment une troisième hypothèse qui pourrait expliquer l'inhibition de Myt1 avant l'activation du MPF à GVBD a été émise. Les auteurs de cette étude ont montré par spectrométrie de masse que Myt1 était l'objet d'une autophosphorylation sur les Sérines 66 et 76, ainsi que sur des Thréonines et Tyrosines qui n'ont pas été encore identifiées (Kristjansdottir et al., 2006). L'injection de mutants non phosphorylables sur les sites Ser66 et Ser76 dans des ovocytes de Xénope, retarde la maturation induite par la progestérone de manière dose dépendante. La phosphorylation du résidu Ser66 semble en particulier requise pour la régulation négative de Myt1. En effet, l'injection à forte concentration du mutant non phosphorylable sur ce site dans des ovocytes en prophase inhibe la maturation induite par la progestérone, alors que l'injection de l'ARNm codant la forme sauvage de Myt1, ne provoque qu'un retard. Cependant, la quantité injectée d'ARNm de ce mutant est très élevée (40ng), et l'injection de doses plus faibles (0,5-15 ng) n'induit qu'un léger retard de cinétique, si l'on compare avec l'injection de l'ARNm de la protéine Myt1 sauvage. De plus, aucune concentration exacte n'est donnée dans cette étude et les échelles de quantités injectées ne sont pas mises en relation avec la concentration effective de la protéine endogène. Enfin, il aurait été intéressant de pouvoir suivre la phosphorylation de la Ser66 de Myt1 *in vivo* au cours de la maturation méiotique.

Si les résultats présentés dans cette publication sont confirmés, ils montrent pour la première fois un lien direct entre l'autophosphorylation d'une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et un effet sur la reprise de la méiose. L'autophosphorylation sur la Sérine 66 pourrait donc être un pré-requis pour l'inactivation de Myt1 à GVBD, et pourrait servir de « starter » pour des phosphorylations inhibitrices par d'autres kinases (p90Rsk, Plx1, Cdc2). Il est difficile de comprendre actuellement comment l'autophosphorylation d'une kinase (témoignant donc de son activité catalytique) peut l'inhiber. Un événement régulateur inconnu pourrait empêcher Myt1 de s'auto-phosphoryler sur la Ser66 pendant la période d'arrêt en prophase I, et cette autophosphorylation serait démasquée par un régulateur dépendant de la progestérone. Là encore, l'étude de la cinétique de phosphorylation de Myt1 sur la Ser66 est indispensable pour obtenir des éléments de réponse.

La première partie de ma thèse a donc été consacrée à l'étude de la régulation par phosphorylation de Myt1 pendant la maturation méiotique : quelle est la cinétique de phosphorylation de la kinase, quelles sont les contributions respectives de Cdc2, de Plx1 et de la cascade Mos/MEK/MAPK/p90Rsk dans l'inhibition par phosphorylation de Myt1.

3) Résultats : Etude de la régulation de Myt1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope

Nos résultats sont rédigés sous la forme d'un manuscrit destiné à être prochainement soumis pour publication. Ils sont résumés en français ci-dessous. Les figures auxquelles il est fait référence sont celles de l'article.

a) La kinase Myt1 est hyperphosphorylée au cours de la maturation méiotique indépendamment de la voie Mos/MAPK/p90Rsk

Nous avons dans un premier temps analysé le profil de phosphorylation de Myt1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope. Nous avons montré que l'hyperphosphorylation de Myt1 débute rapidement, 30 à 60 minutes avant GVBD, et est totale au moment de GVBD. De manière intéressante, l'activation des deux candidats potentiels pour l'inhibition de Myt1 que nous avons présentés précédemment, les kinases p90Rsk et Plx1, a lieu en même temps que l'inhibition de Myt1 (Figure 1, article).

Il a été proposé que p90Rsk soit la kinase responsable de la phosphorylation de Myt1 au cours de la maturation méiotique (Palmer et al., 1998). Cependant, il a été montré que la progestérone induit l'activation du MPF et la reprise de la méiose indépendamment de la voie MAPK (Fisher et al., 1999; Gross et al., 2000; Dupré et al., 2002a). Ce résultat implique que soit la maturation et l'activation du MPF peuvent avoir lieu même en l'absence de phosphorylation inhibitrice de Myt1, si celle-ci est bien l'unique cible de p90Rsk, soit une autre kinase que p90Rsk régule Myt1. Afin de déterminer laquelle de ces deux hypothèses était valide, nous avons inhibé la voie MAPK à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126, et analysé le profil de phosphorylation de Myt1 après stimulation par la progestérone. Nous avons observé que bien que la cinétique de maturation soit ralentie en absence de la voie MEK/MAPK/p90Rsk, Myt1 est hyperphosphorylée et inhibée au moment de GVBD. Il est donc vraisemblable qu'une ou plusieurs autres kinases soient responsables de la régulation de Myt1 (Figure 1, article).

Cependant, il a été montré que l'inhibition de MEK par le U0126 n'empêche pas la synthèse de Mos induite par la progestérone. Or, Peter et al. ont proposé que Mos exerce un rôle direct sur la phosphorylation et l'inhibition de Myt1 (Peter et al., 2002). Nous avons testé cette possibilité en utilisant tout d'abord un système d'extraits d'ovocytes de stade VI qui permet l'activation du MPF *in vitro* en l'absence de toute synthèse protéique (Karaïskou et al., 1998). Ces extraits sont donc naturellement dépourvus de Mos et sont incapables de le synthétiser. Dans ces conditions, l'activation des molécules de pré-MPF peut se faire par l'ajout d'acide okadaïque, un inhibiteur de PP2A et de PP1, de Cyclines mitotiques, ou de Cdc25 (Nebreda et al., 1995; Karaïskou et al., 1998; Karaïskou et al., 1999). Nous avons activé le MPF dans ces extraits par addition de la protéine Cdc25A humaine, et montré qu'en l'absence de Mos et de l'activation de la voie MAPK (ajout de U0126), Myt1 est toujours capable de passer sous un état hyperphosphorylé (Figure 2, article). Dans ces conditions, Cdc2 et Plx1 sont actives et pourraient rendre compte de l'hyperphosphorylation de Myt1. Nous avons par la suite confirmé ces résultats *in vivo* grâce à l'injection d'oligonucléotides antisens morpholinos dirigés contre Mos (Dupré et al., 2002a). L'absence de Mos et d'activité MAPK n'empêche pas l'hyperphosphorylation de Myt1 au moment de GVBD (Figure 2, article). Cependant, p90Rsk est partiellement activé en réponse à la progestérone, même quand la voie Mos/MAPK est invalidée par des antisens anti-Mos. Nous avons donc inhibé la totalité de la voie Mos/MAPK/p90Rsk par l'utilisation simultanée de morpholinos anti-Mos et de U0126, ce qui nous a permis de montrer que cette voie n'est pas requise pour l'hyperphosphorylation de Myt1 induite par la progestérone dans l'ovocyte de Xénope (Figure 2, article).

Il est cependant important de noter que l'activation de Cdc25 est affectée par l'absence de la voie la voie Mos/MAPK/p90Rsk. En effet, nous n'avons jamais observé le shift total de Cdc25 sous ces conditions (Figure 2, article). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Wang et al. qui proposent que cette voie soit impliquée dans la régulation de Cdc25 (Wang et al., 2007).

En conclusion, nos résultats ne permettent pas d'exclure que la voie Mos/MEK/MAPK/p90Rsk participe à la phosphorylation de Myt1, mais ils montrent clairement que si cette voie est invalidée, l'hyperphosphorylation de Myt1 a lieu quand même. La progestérone recrute donc d'autres kinases en parallèle à la voie Mos/MAPK/p90Rsk, capables de conduire à l'inhibition de Myt1. En outre, dans l'ovocyte de Xénope, la voie MAPK est activée tardivement (à GVBD), et est sous le contrôle de l'activation du MPF (Dupré et al., 2002a), ce qui n'est pas compatible avec l'inhibition précoce de Myt1 avant

GVBD. Nos résultats appuient donc l'existence d'une ou plusieurs autres kinases qui seraient responsables de l'inhibition initiale de Myt1. Les deux candidats potentiels étant Plx1 et Cdc2.

b) Rôle de Plx1

Il a été montré que Myt1 est un substrat de la kinase Plx1 (Inoue et al., 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, un rôle joué par Plx1 à lui-seul sur l'inhibition de Myt1 est difficile à appréhender puisque son activation est dépendante de l'activité de Cdc2. Nous avons donc tiré parti d'un mutant de Plx1 constitutivement actif chez lequel la thréonine 201 est substituée par un acide aspartique (Plx1T201D). Qian et al. ont montré que l'activité de ce mutant était à peu près dix fois supérieure à celle de la protéine sauvage, lorsqu'il est injecté dans un ovocyte, en l'absence de progestérone (Qian et al., 1999). Nous avons injecté l'ARNm codant Plx1T201D, et nous avons montré que la protéine mutante exprimée à partir de cet ARNm accélère fortement la cinétique de maturation induite par la progestérone, ce qui indique que ce mutant est bien actif (Figure 3, article). Pour appréhender les effets propres de la protéine kinase Plx1T201D, indépendamment d'une contribution apportée par Cdc2, nous avons injecté son ARNm en présence de l'inhibiteur de Cdk, p21^{Cip1}. Cette protéine se lie à Cdc2 et l'inhibe spécifiquement dans l'ovocyte de Xénope (Frank-Vaillant et al., 1999). Dans ces conditions, la progestérone ne peut pas conduire à l'activation de Cdc2, bloqué par p21^{Cip1}, et la présence de Plx1T201D ne conduit pas à la phosphorylation de Myt1 (Figure 3, article). Cette observation est à mettre en rapport avec le fait que l'injection de l'ARNm de Plx1T201D en l'absence de progestérone ne conduit pas à l'activation de Cdc2 ni à GVBD (Figure 3, article). Ces expériences de gain de fonction suggèrent que sans l'activité kinasique de Cdc2, Plx1 ne conduit pas à la phosphorylation et l'inhibition de Myt1. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la phosphorylation de Myt1 par Cdc2 soit un pré-requis à l'action de Plx1, dans des conditions physiologiques de maturation induite par la progestérone.

Afin de tester l'importance de Plx1 sur la phosphorylation de Myt1, nous avons analysé si la phosphorylation de Myt1 pouvait avoir lieu en absence de Plx1. Pour cela, nous avons procédé à une immunodéplétion des extraits de stades VI en Plx1 et lancé l'activation du MPF dans ces extraits immunodéplétés par l'ajout de la phosphatase Cdc25. Nous avons montré que dans ces extraits, où Plx1 est absent, mais où Cdc2 et p90Rsk ont été activés en réponse à Cdc25, Myt1 est toujours hyperphosphorylée (Figure 4, article).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que Plx1 ne semble ni suffisante ni nécessaire pour conduire à l'inhibition de Myt1 en l'absence de Cdc2 actif. En absence de Plx1, d'autres

kinases, probablement Cdc2 et/ou p90Rsk sont capables de prendre le relais pour inhiber Myt1. Il nous faudra vérifier si, en l'absence de Plx1, la voie Mos/MAPK/p90Rsk est requise pour permettre l'hyperphosphorylation de Myt1 (ajout de U0126), ce qui montrerait qu'il s'agit bien de la voie alternative à Plx1 utilisée dans ce contexte pour assurer la régulation de Myt1. Cependant on ne peut exclure une régulation de Myt1 par Plx1 au cours de la maturation méiotique qui maintiendrait Myt1 sous un état inactif après que cette dernière ait été inhibée par une kinase initiatrice. Ce mécanisme a déjà été mis en évidence pour la régulation de Cdc25 par Cdc2 et Plx1, et semble représenter le mode d'action général des kinases Plk (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1998). Il sera important par la suite de pouvoir établir le rôle propre de Cdc2 par rapport à Plx1.

c) Rôle de la voie MAPK/p90Rsk

Enfin, nous avons étudié le rôle de la voie MAPK sur la phosphorylation de Myt1, indépendamment de Cdc2 et de Plx1. Nos premiers résultats ont montré que cette voie n'est pas nécessaire, ce qui signifie qu'une autre kinase peut prendre le relais. Mais dans des conditions physiologiques, cette voie pourrait être suffisante pour assurer l'inhibition de Myt1. Pour répondre à cette question, nous avons incubé des extraits acellulaires d'ovocytes de stade VI avec la protéine recombinante Mos. Dans ces conditions, l'activation de la voie MAPK/p90Rsk a lieu en absence de l'activation du MPF, et par conséquent, en l'absence de l'activation de la kinase Plx1. Dans ces extraits, nous avons montré que l'induction de la voie la voie MAPK/p90Rsk est capable de conduire à une phosphorylation partielle de Myt1 (Figure 5, article). Nous avons confirmé ce résultat *in vivo*, en injectant la protéine p21^{Cip1} préalablement à l'injection de la protéine Mos. Dans ces conditions, en absence d'activité Cdc2 (bloquée par p21^{Cip1}), la voie MAPK/p90Rsk induit un shift partiel de Myt1 (Figure 5, article).

Nous nous sommes demandés quelle était la conséquence de cette phosphorylation partielle de Myt1 sur son activité kinasique : en particulier, est-elle suffisante pour inhiber Myt1 ? L'activité kinasique de Myt1 sous son état partiellement phosphorylé a été mesurée *in ovo*. Dans des ovocytes préalablement injectés avec p21^{Cip1} (Cdc2 inhibé) puis avec la protéine Mos (voie MAPK lancée), conditions permettant d'induire le demi-shift de Myt1, nous avons injecté de la Cycline A recombinante. Les molécules de Cycline A s'associent aux molécules libres de Cdc2 et ces néo-complexes servent de substrat à Myt1. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la Tyrosine 15 de Cdc2, ce qui montre que Myt1, bien que phosphorylée partiellement, est toujours active, et capable de

phosphoryler les néo-complexes Cycline A/Cdc2 (Figure 5, article). Ces résultats suggèrent que la voie MAPK/p90Rsk n'est pas suffisante pour conduire à l'hyperphosphorylation inhibitrice de Myt1. Cependant, contrairement à Plx1, elle est capable de conduire à une phosphorylation partielle de Myt1, en l'absence de Cdc2 et de Plx1. Cette voie pourrait donc participer à la phosphorylation de Myt1, probablement dans la boucle d'auto-amplification, afin de maintenir le MPF sous sa forme active.

L'ensemble de nos résultats indiquent que les deux voies candidates pour l'inhibition de Myt1, Plx1 et p90Rsk, ne semblent pas pouvoir rendre compte à elles-seules de l'inhibition initiale de Myt1 induite par la progestérone, puisqu'elles sont toutes les deux dépendantes de l'activation de Cdc2 et incapables à elles-seules de reproduire la phosphorylation inhibitrice de Myt1. L'élément central est donc l'activation du MPF. Comment expliquer le fait que l'inhibition de Myt1 soit sous le contrôle de l'activation du MPF, puisque l'activation de ce dernier dépend de la déphosphorylation de deux de ses résidus inhibés par Myt1 ? Deux hypothèses sont envisageables. La première repose sur l'activation de Cdc25 directement par la voie de transduction lancée par la progestérone, indépendamment du MPF, qui contrebalancerait l'activité de Myt1, permettant ainsi l'obtention des premières molécules de MPF actif, l'activation de la boucle d'auto-amplification, et l'inhibition de Myt1. La deuxième hypothèse repose sur la néo-synthèse de Cycline B1, induite par la progestérone, qui en s'associant aux molécules de Cdc2 libres déjà phosphorylées sur la Thréonine 161, générerait des complexes Cdc2/Cycline B actifs permettant l'inhibition initiale de Myt1 et l'activation de la boucle d'auto-amplification. Il est intéressant de noter que Cdc2 agit très probablement en partenariat soit avec Plx1, soit avec la voie Mos/MAPK/p90Rsk, et qu'en l'absence de l'une des deux voies, l'autre prend probablement le relais. Des expériences de double invalidation de Plx1 et de la voie MAPK doivent venir étayer ou invalider cette hypothèse.

CHAPITRE V

ACTIVATION DE LA MAPK : UN ROLE POUR RAS ?

1) Présentation générale des petites protéines G

La super-famille des petites protéines GTPases, ou petites protéines G de type Ras, comprend plus de 150 membres chez l'homme, avec des orthologues conservés au cours de l'évolution chez les eucaryotes, de la Levure à l'Homme. Au sein de cette super-famille, les membres fondateurs, les proto-oncogènes Ras (Ras Sarcoma), comprennent 36 membres répartis en cinq grands groupes sur la base de similarités de séquences et de fonctions : Ras, Rho/Rac/Cdc42, Rab, Ran, et Arf.

Les protéines G Ras sont activées en réponse à divers stimuli extracellulaires et sous leur forme GTP, interagissent avec divers effecteurs, catalytiquement différents, qui régulent des voies de signalisations cytoplasmiques aboutissant à la régulation de l'expression de gènes et au final à une réponse cellulaire de type prolifération, différenciation ou survie/apoptose.

a) Structure des petites protéines G Ras

Bien que similaires aux protéines G hétérotrimériques dans leurs fonctions et leur activité GTPase, les protéines G de type Ras s'en distinguent fondamentalement par le fait qu'elles sont monomériques et que leur poids moléculaire varie entre 21 et 27 kDa. Il existe quatre types de protéines G du type Ras : H-, K-, N-Ras qui ont une homologie de séquence de 90%, et E-Ras plus récemment identifié dans les cellules ES de souris et chez l'Homme (Takahashi et al., 2003). Les séquences de H-, K- et N-Ras sont identiques dans les 85 premiers acides aminés comprenant notamment les résidus impliqués dans l'interaction avec les effecteurs et avec des facteurs d'échange (Switch I : résidus 30-38, Switch II : résidus 59-67), ce qui montre qu'elles possèdent la même capacité à interagir avec les effecteurs (pour revue Shields et al., 2000) (Figure 33). Leur divergence réside dans les 25 résidus de l'extrémité C-terminale. Cette région inclut le domaine hypervariable (acides aminés 165-185) et la boîte CAAX (C : Cystéine, A : Aliphatique amino acid, X : Serine ou Méthionine). La séquence CAAX contient les signaux nécessaires pour cibler Ras aux membranes. Comme nous le verrons par la suite, pour être actives les protéines de type Ras subissent des modifications post-traductionnelles au niveau de la séquence CAAX, comme la palmytoylation de la cystéine 186 (Figures 33 et 34).

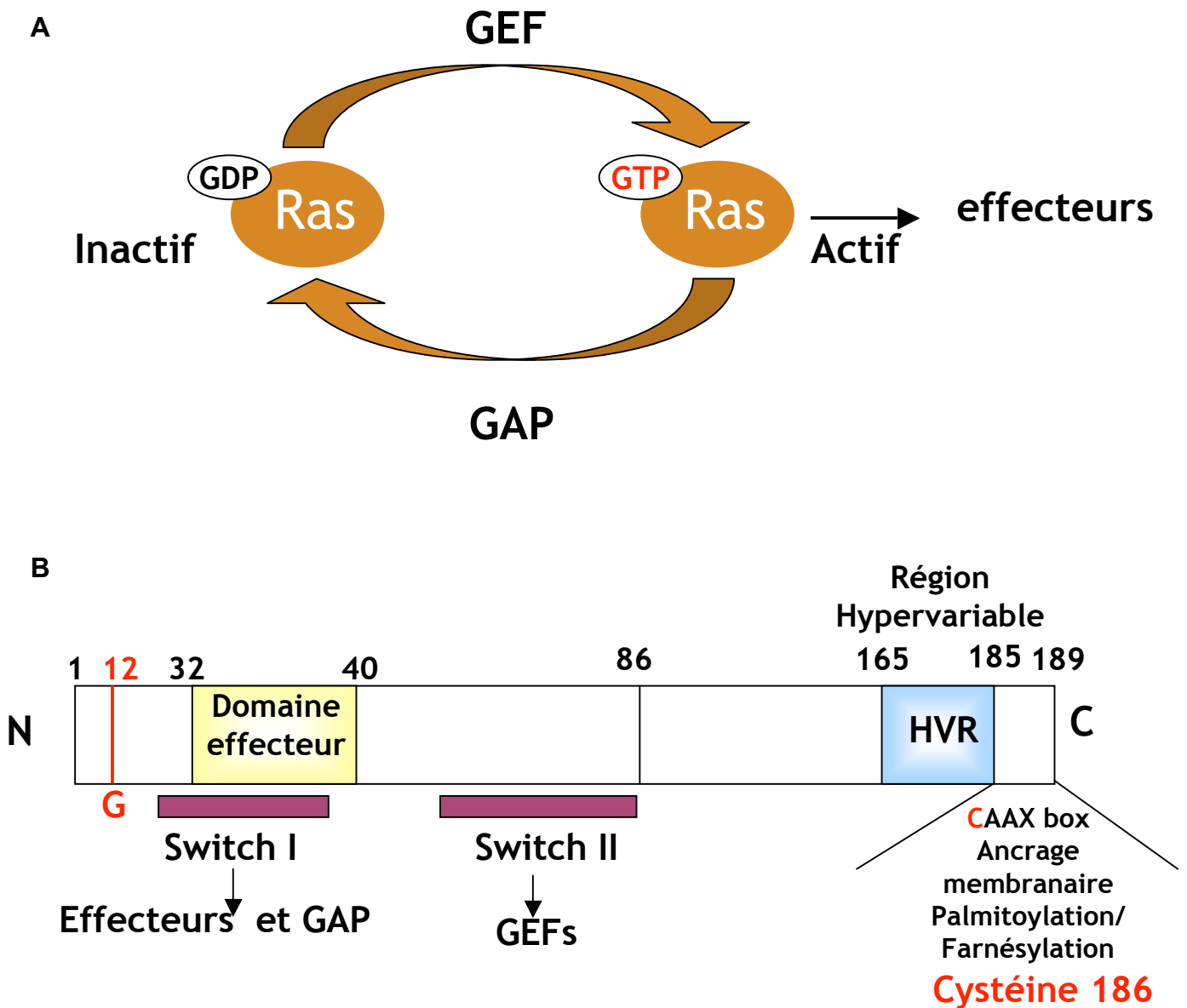


Figure 33 :

A : Cycle d'activation et d'inactivation des petites protéines G de type Ras

B : Structure des petites protéines G de la famille Ras

b) Régulation des GTPases Ras : les GEFs et les GAPs

Toutes les petites protéines G partagent la même caractéristique biochimique : elles agissent comme des interrupteurs en oscillant entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Elles possèdent de faibles activités intrinsèques d'hydrolyse du GTP, et d'échange GDP/GTP. C'est pourquoi le cycle GDP/GTP est contrôlé par deux classes de protéines régulatrices : les GEFs (Guanine Exchange Factor), et les GAPs (GTPase Activating Protein) (Figure 33).

Les GEFs favorisent le passage de l'état inactif Ras-GDP à l'état actif Ras-GTP (pour revue Schmidt and Hall 2002). La liaison du GTP induit un changement de conformation et le décrochement de la GEF. A l'inverse, les GAPs augmentent l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Ras ce qui permet le retour à un état inactif lié au GDP (pour revue Bernards and Settleman 2004). Les différences structurales entre les deux formes résident principalement dans les deux régions switch, la forme liée au GTP ayant une plus forte affinité pour les effecteurs cibles (pour revue Repasky et al., 2004; pour revue Wennerberg et al., 2005).

Enfin, une autre classe de protéines régulatrices, les GDI (GDP Dissociating Inhibitor) inhibe la dissociation du GDP et maintient les petites protéines G Rho et Rab dans le cytoplasme, sous leur forme inactive même en présence de GEF (Fukumoto et al., 1990). Cependant, aucune GDI n'a encore été identifiée pour Ras.

À l'opposé, des mutations oncogéniques principalement sur les acides aminés en position 12, 13 ou 61, sont rencontrées dans de nombreuses tumeurs. Ces mutations rendent Ras insensible à la régulation négative par les GAPs, et la maintiennent sous une forme active constitutivement liée au GTP. La protéine Ras étant impliquée dans la régulation de diverses voies de signalisation contrôlant la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose, la version mutée de la protéine joue un rôle important dans le processus de carcinogénèse. Elle a été détectée dans environ 30% des cancers humains.

c) Modifications post-traductionnelles

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des protéines de la famille Ras partagent une caractéristique biochimique commune : pour être fonctionnelles, elles doivent subir des modifications post-traductionnelles en C-terminal qui permettent leur adressage à la membrane plasmique (Figure 34). La plupart des protéines de types Ras possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence térapeptidique : CAAX (Cox and Der 2002). Ce motif

localisé dans la séquence d'adressage aux membranes est reconnu par une farnesyltransférase qui cible la Cystéine terminale. H-Ras et N-Ras possèdent des résidus Cystéine en amont de la CAAX modifiées par l'acide gras palmitique (palmitoylation) (Cox and Der 1997). Outre ces modifications, les protéines Ras subissent une protéolyse spécifique qui libère le tri-peptide terminal et positionne la cystéine en C-terminal. La protéine K-Ras ne possède pas de résidu palmitoylable mais un stretch de lysines qui permet une interaction directe avec la membrane (Magee and Marshall 1999). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles et l'interaction de Ras avec les membranes sont nécessaires pour permettre l'activation de la protéine (Figure 34).

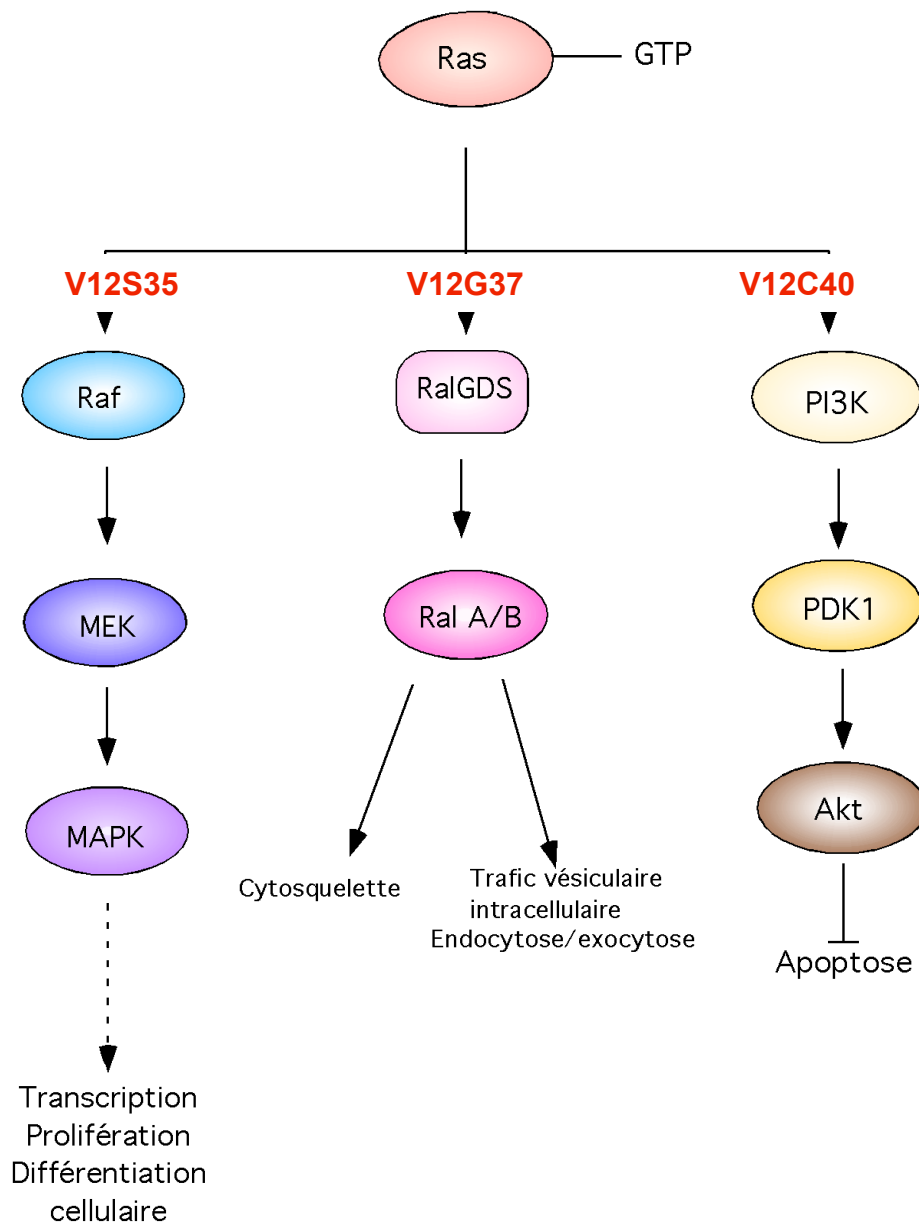
d) Les effecteurs de Ras

Les protéines G Ras sous forme active exercent leur activité biologique en s'associant à différentes cibles protéiques ou effecteurs possédant tous un domaine de liaison à Ras (RBD : Ras Binding Domain). Les effecteurs de Ras sont regroupés en au moins 10 classes fonctionnelles. Néanmoins, les diverses isoformes d'une classe n'ont pas toutes été caractérisées comme étant réellement des effecteurs de Ras (Repasky et al., 2004). Cinq classes d'effecteurs ont été montrées comme étant responsables des effets oncogéniques de Ras : la kinase Raf, la protéine RalGDS, la sous-unité catalytique de la PI3K (PhosphatidyInositol-3 lipid Kinase), la protéine Tiam1 (une GEF de Rac), et les protéines de la familles des RASSF (des suppresseurs de tumeurs régulés négativement dans de nombreuses tumeurs) (Repasky et al., 2004). Je ne décrirai ici que l'activation des trois principaux effecteurs de Ras : Raf1, RalDGD, et PI3K (Figure 35).

• La voie Raf1

La voie la mieux caractérisée de la signalisation par Ras est la cascade Raf/MEK/MAPK (voir chapitre II, paragraphe 2). Cette voie régule principalement la croissance cellulaire : prolifération, transformation, différenciation et apoptose.

Le premier évènement de la cascade de transduction Raf/MEK/MAPK est l'activation de Raf1 grâce à son interaction directe avec Ras-GTP (Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993; Stokoe et al., 1994). Cette interaction permet la localisation de Raf-1 à la membrane plasmique (Leevers et al., 1994; Stokoe et al., 1994). Les trois isoformes de Raf (A-Raf, B-Raf et C-Raf) contiennent trois régions conservées : CR1-3. CR1 permet la localisation de la protéine à la membrane et contient un domaine de liaison à Ras (Ras Binding Domain : RBD) compris entre les résidus 51 et 131 (Vojtek et al., 1993; Nassar et al., 1995; Drugan et al.,



D'après Feig et al., 2002

Figure 35 : Les effecteurs de Ras dans les cellules en culture

Trois effecteurs de Ras-GTP ont été décrits dans les cellules en culture : Raf à l'origine de l'activation de la voie MAPK, RalGDS qui est une GEF pour RalA/B, et enfin la voie PI3K. Il existe trois doubles mutants du domaine effecteur qui n'activent chacun qu'une seule des voies induites par Ras indépendamment des deux autres : RasV12S35 active la voie Raf, RasV12G37 active la voie Ral, et RasV12C40 active la voie PI3K.

2000). L'association de Ras-GTP avec le domaine RBD de Raf1 semble induire un changement de conformation de Raf1 qui démasque un deuxième domaine RBD capable également de lier Ras-GTP (Brtva et al., 1995; Drugan et al., 1996). Ce second domaine est compris entre les résidus 139 et 184 de Raf1 et contient une séquence riche en Cystéines (CRD : Cystein Rich Domain) (Mott et al., 1996). Le domaine CRD interagit avec des résidus de Ras différents de ceux qui interagissent avec les domaines RBD (Hu et al., 1995) et l'interaction entre domaine CRD et Ras semble régulée par les modifications post-traductionnelles de Ras (Kuroda et al., 1993). Cependant le rôle exact de cette interaction n'est pas totalement compris. La région CR2 est riche en Ser/Thr et contient un site inhibiteur de liaison à 14-3-3, autour de la Ser259 pour C-Raf (Muslin et al., 1993; McKay and Morrison 2007). La région CR3, située en C-terminal, correspond au domaine kinasique. Elle est suivie par une courte séquence d'acides aminés conservée, essentielle pour son activité catalytique, et qui forme un site de liaison à 14-3-3. La conséquence globale de l'interaction de Raf1 avec Ras est l'ouverture de la protéine : démasquage du domaine catalytique de la moitié C-terminale. Les phosphatases PP1 et PP2A semblent également jouer un rôle dans l'activation de Raf1 puisqu'elles dephosphorylèrent le site inhibiteur situé en N-ter, permettant ainsi le décrochage de 14-3-3, le recrutement à la membrane et l'interaction avec Ras (Wellbrock et al., 2004; McKay and Morrison 2007). Il a été montré que l'activation par Ras avait également pour conséquence l'hétérodimérisation de C-Raf avec B-Raf ce qui contribue à son activation (Weber et al., 2003; McKay and Morrison 2007).

Les protéines 14-3-3 interagissent donc avec Raf1 au niveau de sites phosphorylés situés en N-terminal (CR2) et C-terminal. Il a été proposé deux rôles relativement contradictoires à ces interactions. L'interaction en N-ter permet à Raf1 de rester sous sa forme auto-phosphorylée et inactive et d'empêcher son interaction avec Ras (Wellbrock et al., 2004; Claperon and Therrien 2007; McKay and Morrison 2007), alors que l'interaction en C-ter semble être requise pour permettre l'hétérodimérisation de C-Raf avec B-Raf (revue morrison et al 2007).

L'activation du récepteur à activité Tyrosine kinase a pour conséquence l'activation de Ras et le recrutement à la membrane de Raf1 par Ras. La liaison de Ras avec Raf est nécessaire pour permettre le relargage de 14-3-3 de l'extrémité N-ter et l'activation par phosphorylation du domaine kinasique de Raf1. Tous ces événements permettent la stabilisation de Raf1 sous sa forme active.

Il existe un double mutant du domaine effecteur (T-Loop) de Ras, RasV12S35 (White et al., 1995), qui lie spécifiquement Raf1 sans pouvoir s'associer aux deux autres effecteurs de

Ras, RalGDS et PI3K, grâce à la mutation du résidu en position 35. Ce mutant est constitutivement actif grâce à la mutation de la Glycine 12 en Valine. Il constitue un outil intéressant pour activer spécifiquement la voie Raf-MAPK indépendamment des autres voies.

- **La voie RalGDS**

Le cDNA de RalGDS a été cloné par homologie avec la séquence d'un GEF de Ras de Levure (Albright et al., 1993). Grâce à un crible double hybride utilisant la protéine H-Ras GTP comme appât, RalGDS a ensuite été identifiée comme étant un partenaire de H-Ras (Hofer et al., 1994). Trois autres GEF spécifiques de Ral ont également été identifiées : Egl, Rlf et Rgr (Feig et al., 1996). Toutes ces protéines agissent comme des facteurs d'échange pour les protéines Ral (RalA et RalB) (pour revues Urano et al., 1996; Wolthuis et al., 1998). De plus, l'activation de Ral par EGF (Epidermal Growth Factor) et par l'insuline est inhibée par un mutant dominant négatif de Ras, ce qui situe la voie RalGDS-Ral en aval de Ras (Wolthuis et al., 1998) (Figure 35).

La région C-terminale de RalGDS possède un domaine de liaison à Ras-GTP (RBD : Ras Binding Domain). Bien que la structure primaire de ce domaine des RalGEFs diffère totalement du domaine RBD présent sur Raf1, la structure tridimensionnelle supposée serait identique (Geyer et al., 1997; Huang et al., 1997; Huang et al., 1998). Notons que les affinités des différents RalGEF-RBDs pour H-Ras-GTP *in vitro* sont variables, ce qui sous-entend qu'elles sont régulées différemment par Ras (Geyer et al., 1997).

D'importants travaux, réalisés par White *et al.* ont établi qu'il existait une compétition entre les différentes voies effectrices activées par la forme oncogénique de Ras, pour permettre la transformation (White et al., 1995). L'étude de la voie de transduction en aval de RalGDS a été étudiée grâce à un double mutant du domaine effecteur (T-Loop) de Ras, RasV12G37 (White et al., 1995). Ce double mutant a la particularité d'être constitutivement actif grâce à la mutation de la Glycine en position 12 en Valine, et d'activer spécifiquement RalGDS sans pouvoir s'associer aux autres effecteurs connus de Ras (PI3K et Raf1) grâce à la mutation du résidu en position 37. Une fois activé par Ras, RalGDS est transloqué à la membrane où il sert de GEF pour Ral, et l'active (Figure 35) (Kishida et al., 1997; Matsubara et al., 1999; Wolthuis and Bos 1999). Ral est localisé au niveau de la membrane plasmique et sur les membranes des vésicules d'endocytose et d'exocytose (Feig et al., 1996).

De nombreuses cibles putatives de Ral ont été identifiées. Ral interagit avec PLD1 (Phospholipase 1) et Arf, ce qui est à l'appui d'un rôle de Ral dans le transport vésiculaire et le trafic membranaire. La forme Ral-GTP peut interagir avec RalBP1 (aussi connu sous le

nom de RLIP76 ou RIP1), qui est un GAP pour certaines petites GTPases de la famille Rho (Cdc42 et Rac) (Feig et al., 1996). Ces GTPases sont impliquées dans la régulation du cytosquelette et sont essentielles pour la transformation oncogénique induite par Ras (Symons 1996; Shields et al., 2000). Enfin, RalBP1 peut s'associer dans des complexes multiprotéiques qui lient le domaine intracellulaire du récepteur à l'EGF (Reps1 (Yamaguchi et al., 1997), Pobl (Ikeda et al., 1998)) et à l'insuline et réguler ainsi les niveaux des récepteurs à activité Tyrosine Kinase à la surface de la membrane plasmique (Wolthuis et al., 1998; Wolthuis and Bos 1999).

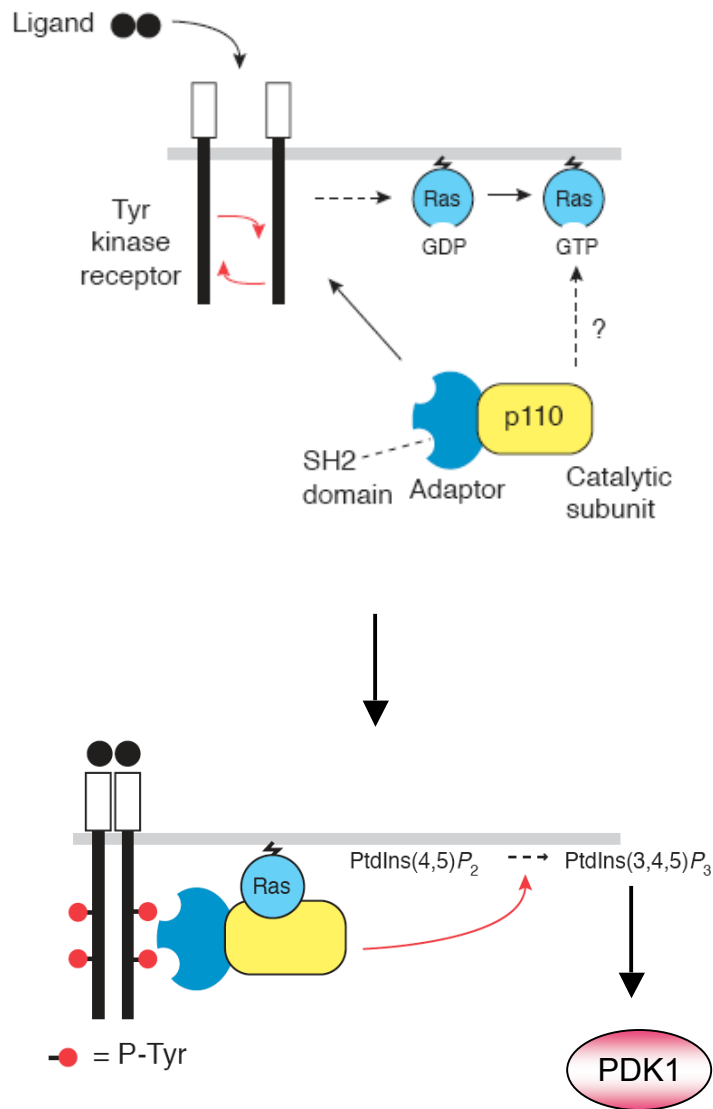
Outre la régulation du cytosquelette, du trafic vésiculaire et la modulation de l'activité des récepteurs aux facteurs de croissance, les effets de l'activation de la voie RalGEF-Ral sur la transformation oncogénique sont également dus à l'induction de l'expression de gènes de transformation tels que *c-Fos* (Wolthuis et al., 1997).

- **La voie PI3K**

Les PI3Ks (Phosphoinositide 3-Kinases) sont une famille de kinases lipidiques qui catalysent la phosphorylation du groupement inositol situé en 3' des phosphoinositides pour former des 3'-Phosphoinositols. Elles génèrent une forme de lipides qui sont désormais considérés comme des acteurs essentiels de différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et le trafic vésiculaire.

Trois classes de PI3Ks ont été définies sur la base de leur structure moléculaire et de leur affinité pour les substrats (Vanhaesebroeck et al., 2001).

La classe I est la mieux caractérisée et la plus étudiée (Figure 36). Ces enzymes utilisent comme substrats les phosphatidylinositol (PtdIns), les phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns(4)P) et les phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) pour produire des PtdIns(3)P, des PtdIns(3,4)P₂, et des PtdIns(3,4,5)P₃ respectivement. Les PI3Ks de la classe I sont toutes des hétérodimères contenant une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) et une sous-unité régulatrice de 85 ou 101 kDa (p85 ou p101). Quatre isoformes de la sous-unité catalytique ont été caractérisées chez les mammifères, toutes codées par des gènes distincts (p110 α , β , δ , et γ) chacune générant deux classes de PI3K (A et B) en fonction de la sous-unité régulatrice à laquelle elle s'associe et du type de récepteur qui les active (Figure 36). La classe IA est activée par des récepteurs à activité Tyrosine Kinase, et la classe IB est activée par des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. Une seule PI3K de la classe IA



D'après Vanhaesebroeck et al., 2000

Figure 36 : Activation des PI3Ks de classe I par des récepteurs à activité tyrosine Kinase

L'activation de la classe IA est induite par le recrutement de la sous-unité régulatrice, *via* ses domaines SH2 au niveau des Tyrosines phosphorylées sur le récepteur activé. Les GTPases de type Ras liées au GTP sont capables de lier directement la région N-terminale de p110. Cette interaction permet la translocation à la membrane de la sous-unité p110 et son activation, induisant ainsi la production de divers phospholipides inositols et l'activation de la kinase PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1).

a été caractérisée chez la Drosophile (Dp110/p60), et le Nématode (AGE-1/AAP-1). Aucune PI3K de la classe I n'a été identifiée chez la Levure et les plantes.

L'activation de la classe I des PI3Ks lance une voie de transduction qui débouche sur l'activation de la kinase Akt/PKB *in vivo* (Figure 35). L'activation de la classe IA est induite par le recrutement de la sous-unité régulatrice, *via* ses domaines SH2 au niveau des Tyrosines phosphorylées du récepteur activé (Figure 36). Les GTPases de type Ras sous leur forme GTP sont capables de lier directement la région N-terminale de la sous unité catalytique p110 (Figure 36) (Rodriguez-Viciano et al., 1994; Rodriguez-Viciano et al., 1996; Liu et al., 1998; Gupta et al., 2007). Cette interaction permet la translocation à la membrane de la sous-unité p110 et son activation, induisant ainsi la production de divers phospholipides (Pacold et al., 2000). Les seconds messagers lipidiques des PI3Ks, les 4,3-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂) et les PtdIns(3,4,5)P₃ sont transloqués sous la membrane plasmique et servent de site d'accostage (docking site) pour les protéines contenant un domaine pleckstrin (PH : Pleckstrin Homology) (Figure 36). C'est le cas de la kinase PDK1 (Phosphoinositide-dependant kinase 1) qui possède un domaine PH et qui est donc activée par le recrutement de la p110 par Ras. PDK1 est essentielle pour l'activation de PKB/Akt. Akt appartient à une famille de kinases dont la structure est conservée au cours de l'évolution. Elle contient également un domaine PH situé dans la moitié N-Terminal qui lie les PtdIns(3,4,5)P₃ et les PtdIns(3,4)P₂ et permet son recrutement à la membrane plasmique, et un domaine kinase (Alessi et al., 1996a; Vanhaesebroeck et al., 2001; Stambolic and Woodgett 2006). PDK1 phosphoryle Akt sur la Thréonine 308 située dans le domaine kinase (T-Loop). L'activation totale d'Akt dépend d'une phosphorylation additionnelle sur la Serine 473 située dans le domaine régulateur à l'extrémité C-terminale (dans le motif hydrophobe), probablement catalysée par le complexe mammalien mTor (Target of rapamycin)-Rictor (Alessi et al., 1996a; Vanhaesebroeck et al., 2001; Sarbassov et al., 2005). La forme active de Akt est transloquée dans le cytoplasme où elle active divers substrats par phosphorylation de la Sérine ou de la Thréonine contenue dans une séquence RXXXS/T qui représente le site consensus de phosphorylation par Akt (Alessi et al., 1996b). Akt peut également être transloquée dans le noyau et activer des facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose. La voie Ras/Akt est donc impliquée dans la croissance et la survie cellulaire, via la transcription de gènes anti-apoptotiques et la synthèse de protéines.

Les PI3Ks de la classe II peuvent phosphoryler les PtdIns et les PtdIns(4)P et contiennent un domaine C2 similaire à un motif de liaison au Ca²⁺. La régulation et les

fonctions de ces enzymes sont encore mal connues, mais elles semblent impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Yart et al., 2002).

La classe III est composée essentiellement de protéines de Levure. Elles peuvent uniquement phosphoryler les PtdIns. Elles participent au transport vésiculaire via la genèse de PtdIns(3)P qui interagissent avec les domaines FYVE présents sur les protéines transportées (Yart et al., 2002).

2) Raf1 dans l'ovocyte de Xénope

Dans l'ovocyte, la MAPK est activée de manière concomitante au MPF et il est bien établi que la kinase Mos est essentielle à l'obtention d'une forme activée de manière soutenue de la MAPK. Cependant, il apparaît clair que des rétrocontrôles sont exercés par la MAPK et/ou MEK sur la kinase Mos. Depuis une dizaine d'années, la question a été posée de savoir quelle était la contribution de Raf à l'activation de la MAPK : Raf peut-il lancer la voie ou y participer ? Ou est-il l'objet d'un rétrocontrôle ?

Il a été montré qu'une activation partielle de la MAPK était nécessaire à la traduction de l'ARNm de Mos, et à l'activation totale de la voie MAPK (Gotoh et al., 1995). Or, dans un ovocyte en prophase, Mos est absent et il a été proposé que l'activité élevée de PKA maintienne Raf1 sous un état inactif (Mischak et al., 1996). L'hypothèse a été formulée selon laquelle l'inhibition de l'activité de PKA qui a lieu en réponse à la progestérone, avait pour conséquence l'activation de Raf1 qui conduirait à une activation partielle de la MAPK, ce qui permettrait la synthèse de Mos (Faure et al., 1998). Raf1 serait ensuite inhibé par auto-phosphorylation (Mischak et al., 1996).

Des expériences *in vivo* et *in vitro* étayaient ce scénario. Faure et al. ont montré que dans des extraits acellulaires, la MAPK serait activée de manière dépendante de PKA en absence de la synthèse de Mos, probablement par Raf1 (Faure et al., 1998). La MAPK permettrait alors la traduction de l'ARNm de Mos, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif entre Mos et la MAPK (Faure et al., 1998). L'activation initiale de la MAPK serait donc effectuée par Raf1. De plus, Raf1 pourrait aussi contribuer à l'activation du MPF indépendamment de la MAPK dans la mesure où il a été montré qu'il pouvait s'associer à Cdc25 et l'activer (Galaktionov et al., 1995). Par ailleurs, l'injection d'une forme oncogénique (constitutivement active de Raf1) induit la maturation méiotique (Muslin et al., 1993). *In vitro*, l'activation de Cdc25 est dépendante de l'activité de Raf1. *In vivo*, la progestérone conduit à une activation simultanée de Raf1 et de Cdc25 (Galaktionov et al., 1995). Enfin, Muslin *et al.* (Muslin et al.,

1993) ont montré que l'injection d'un mutant dominant négatif de Raf1, muté sur le site de liaison à l'ATP, inhibe l'activation du MPF induite par la progestérone ou par l'injection de l'ARNm de Mos. Dans un ovocyte en prophase, le niveau élevé de l'activité de PKA et l'inhibition de Raf1 auraient pour conséquence de maintenir Cdc25 et la voie MAPK inactifs, et d'empêcher *in fine* l'activation du MPF.

Cependant, d'autres publications rapportent des résultats en opposition avec l'hypothèse d'un rôle de Raf1 dans l'activation du MPF et de la voie Mos/MAPK. Contrairement aux résultats de Muslin *et al.* (Muslin et al., 1993), il a été montré que l'inhibition de Raf1 par une stratégie dominant négatif n'inhibait pas la reprise de la méiose, ni l'activation de la MAPK (Fabian et al., 1993) et que l'activation de Raf observée pendant la maturation serait une conséquence de l'activation de la MAPK et non l'élément initial de démarrage (Dupré et al., 2002a).

La situation est donc confuse et les questions restent ouvertes sur les points suivants :

- Raf1 est-il requis pour l'activation du MPF ?
- Raf1 joue-t-il un rôle dans le démarrage de l'activation de la voie MAPK, ou est-il activé simplement par un rétro-contrôle par la MAPK et/ou MEK ?

3) Ras dans l'ovocyte de Xénope

Trois isoformes de Ras ont été identifiées chez le Xénope et codent pour des protéines très conservées : K-Ras, N-Ras et H-Ras. Deux publications rapportent l'isolement de clones, correspondant vraisemblablement au même gène, et homologues au gène de mammifère K-Ras 2B (Andeol et al., 1990; Baum and Bebernitz 1990). K-Ras2A a été mis en évidence dans les cellules épithéliales rénales de Xénope (Spindler et al., 1997). N-Ras a été cloné lors d'un crible de réversion des effets de la mutation du gène *cdc15* chez la Levure (Spevak et al., 1993). Les ARNm codant pour K- et N-Ras sont présents dans l'ovocyte et dans l'embryon de Xénope et leur niveau reste constant au cours de l'embryogenèse précoce (Andeol et al., 1990; Andeol et al., 1992; Spevak et al., 1993). Seul H-Ras n'avait pas encore été caractérisé chez le Xénope. Cela a été fait en 2002 avec le clonage au laboratoire de tous les ADNc codant pour H-, K-, N-Ras à partir d'une banque d'ADNc d'ovocytes de Xénope, montrant que ces gènes sont exprimés sous forme d'ARNm maternels (Dupré et al., 2002b).

Aucun anticorps ne permet de discriminer les différents types de Ras, H-, K- ou N-, chez le Xénope. Il est en revanche bien établi qu'une forme de Ras est exprimée sous forme

protéique dans l'ovocyte comme le montrent des western blots réalisés avec différents anticorps dirigés contre Ras (Hanocq-Quertier and Hanocq 1991).

- **Rôle de H-Ras dans la reprise de la méiose**

La progestérone induit une inhibition de l'adénylate cyclase qui se traduit par une chute de la concentration intracellulaire de l'AMPc (Mulner et al., 1979). Dans les cellules des eucaryotes supérieurs, le niveau d'AMPc est généralement régulé par les protéines G trimériques. En revanche, chez la levure *S. cerevisiae*, l'adénylate cyclase est régulée par des petites G monomériques de type Ras (Birchmeier et al., 1985).

L'hypothèse a donc été émise que l'inhibition de l'adénylate cyclase dans l'ovocyte puisse être contrôlée par une protéine Ras. Dans ce cas de figure, la progestérone devrait provoquer une inhibition de Ras.

Deux études sont venues à l'appui de cette hypothèse. L'inhibition spécifique des petites protéines G Ras, Rac et Rap dans l'ovocyte de Xénope par la toxine léthale (via la glucosylation du résidu thréonine 35 des petites protéines G), induit la reprise de la méiose (Jesus et al., 1998; Rime et al., 1998). La cible de la toxine léthale impliquée dans la reprise de la méiose ne correspond pas à Rac dans la mesure où l'inhibition spécifique de cette petite protéine G par la toxine B ne provoque pas la reprise de la méiose. Rap et Ras restent donc les deux candidats possibles. De même, l'inhibition de la protéine H-Ras endogène à l'aide d'anticorps neutralisants accélère la maturation méiotique induite par la progestérone (Sadler et al., 1986). Mais ces expériences ne permettent pas de discriminer entre les différentes isoformes de Ras endogènes susceptibles d'être affectées par l'anticorps. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'une petite protéine G de la famille Ras, Ras ou Rap, exerce un effet inhibiteur sur la reprise de la méiose.

Afin d'étudier le rôle éventuel de H-Ras sur la régulation de l'adénylate cyclase, le mutant constitutivement actif H-RasV12 humain a été injecté dans un ovocyte en prophase (Birchmeier et al., 1985). Contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre de la part d'un activateur potentiel de l'adénylate cyclase, H-RasV12 induit GVBD, mais n'a aucun effet sur l'activité de la cyclase. La cinétique de maturation est plus lente que celle induite par la progestérone (Birchmeier et al., 1985; Kamata and Kung 1990; Chung et al., 1992). La protéine injectée est stable, subit des modifications post-traductionnelles, et est adressée à la membrane dans les deux à trois heures qui suivent l'injection (Birchmeier et al., 1985; Dudler and Gelb 1996; Dudler and Gelb 1997). Cet adressage membranaire est requis pour l'effet inducteur de la méiose de H-RasV12. Ces résultats conduisent à penser que Ras n'est pas la

cible de la toxine létale dont l'inhibition permet la reprise de la méiose. Cette cible, qui correspond donc à une petite G inhibitrice du MPF, reste à découvrir. En revanche, la découverte que H-Ras est capable de déclencher la reprise de la méiose débouche sur deux questions : par quelle voie de transduction H-Ras conduit-il à l'activation du MPF ? La progestérone, inducteur physiologique de la maturation, recrute-t-elle Ras pour activer la voie de transduction conduisant à l'activation du MPF ?

Les effets de l'injection de H-RasV12 sont inhibés lorsque l'on traite préalablement les ovocytes avec la toxine cholérique, un activateur de l'adénylate cyclase, ou avec des inhibiteurs des phosphodiesterases. Ces résultats suggèrent que la voie de transduction initiée par H-RasV12 et conduisant à l'activation de Cdc2 dans l'ovocyte de Xénope est dépendante de la chute de la concentration intra-cellulaire en AMPc, comme cela est le cas pour la progestérone (Birchmeier et al., 1985; Sadler and Maller 1989; Sadler 1991). Malgré une littérature importante et parfois contradictoire, le mécanisme d'action de H-RasV12 conduisant à l'activation de Cdc2 dans l'ovocyte de Xénope, est longtemps resté incompris. De plus, jusqu'à récemment, tous les travaux concernant le rôle de H-Ras avaient été effectués en surexprimant la forme humaine de H-Ras.

Afin de comprendre le rôle et le mode d'action de H-Ras dans l'ovocyte de Xénope, et notamment l'implication de Mos et de la voie MAPK, le cDNA de H-Ras de Xénope a été cloné au laboratoire à partir d'une banque de cDNA d'ovocytes de Xénope, et le mutant H-RasV12 de Xénope a été construit. L'injection de la protéine recombinante H-RasV12 de Xénope dans l'ovocyte induit GVBD avec une cinétique comparable à celle de la progestérone (Dupré et al., 2002b). L'injection d'une forme mutée de H-Ras, Xe H-RasV12S186, qui ne peut être transloquée à la membrane, n'induit pas GVBD, montrant l'importance de l'adressage membranaire de Xe H-Ras. Enfin, une chute de concentration en AMPc et la synthèse de nouvelles protéines sont indispensables à la maturation méiotique induite par Xe H-RasV12, comme c'est le cas pour la progestérone (Dupré et al., 2002b). Les deux questions restent donc posées : H-Ras est-il le médiateur de la progestérone pour permettre l'activation du MPF ? Par quelle voie de signalisation la protéine H-Ras de Xénope induit-elle l'activation du MPF suite à son injection dans l'ovocyte ?

- **Activation de la voie MAPK en réponse à H-RasV12**

Il avait été proposé que la MAPK soit essentielle à l'activation du MPF, et que, parallèlement à Mos, la kinase Raf1 puisse contribuer à cette activation. Il était donc logique

de postuler que H-RasV12 agisse via le recrutement de Raf1 et l'activation de la MAPK dans l'ovocyte de Xénope.

In vivo, l'activation de la MAPK suite à l'injection de H-RasV12 dans des ovocytes en prophase précède l'activation du MPF (Nebreda et al., 1993; Chesnel et al., 1997), alors que ces deux kinases sont activées au même moment, juste avant GVBD, lors de la maturation méiotique induite par la progestérone (Jesus et al., 1991). La co-injection de H-RasV12 avec un anticorps anti-MEK inhibant l'activité de MEK, inhibe la maturation méiotique normalement induite par l'injection de H-Ras, suggérant effectivement que la voie MAPK est responsable des effets de H-Ras sur la reprise de la méiose (Fukuda et al., 1994). Dans des extraits *in vitro* obtenus à partir d'ovocytes de Xénope, l'activation de la voie MAPK par H-RasV12 est inhibée par une forme dominante négative de Raf1, par l'addition d'anticorps bloquant la fonction de Raf1, ou par l'immunodépletion de MEK (Fukuda et al., 1994).

Enfin, il a été proposé que la protéine H-RasV12 humaine conduise à l'activation de la voie MEK/MAPK indépendamment de la synthèse protéique (Jesus et al., 1998). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'activation du MPF induite par H-RasV12 *in vivo* dans des ovocytes en prophase ou *in vitro* dans des extraits, passe par l'activation de la voie Raf1/MEK/MAPK. Si tel est le cas, quel serait le rôle de Mos dans ce processus ?

Plusieurs publications ont montré que H-RasV12 était capable d'activer le MPF et la MAPK en présence de cycloheximide ou en absence de Mos (Allende et al., 1988; Daar et al., 1991; Nebreda et al., 1993; Carnero and Lacal 1995; Carnero et al., 1995), venant à l'appui d'un rôle de Raf1 comme kinase initiatrice de la voie MAPK, ce qui conduirait à l'activation du MPF. Néanmoins, une fois de plus, ces conclusions n'ont pas été l'objet d'un consensus et une publication a montré au contraire la nécessité de Mos dans l'activation du MPF suite à l'injection de H-RasV12 (Barrett et al., 1990). Notons cependant que toutes ces expériences sont basées sur la surexpression de protéines hétérologues H-Ras. Elles ne permettent pas de conclure quant au rôle physiologique de la protéine H-Ras endogène dans la reprise de la méiose chez le Xénope.

L'injection de la protéine H-RasV12 de Xénope a permis de montrer que lorsque la synthèse de Mos ou l'activation de la MAPK sont inhibées respectivement par l'injection d'oligonucléotides antisens ou par l'addition de U0126, Xe H-RasV12 est toujours capable d'activer Cdc2 (Dupré et al., 2002b). Ces résultats suggèrent que ni Mos ni la MAPK ne sont requis pour l'activation de Cdc2 en réponse à l'injection de Xe H-RasV12. De plus, ces auteurs ont montré que lorsque l'activation du MPF est bloquée grâce à l'injection de la protéine p21Cip1, Xe H-RasV12, conduit à une activation partielle de la MAPK,

indépendamment de Mos, probablement via Raf1 (Dupré et al., 2002b). Cependant, lorsque la synthèse protéique est inhibée par la cycloheximide, ou que l'on maintient un niveau élevé en AMPc par l'addition d'IBMX (inhibiteur des phosphodiésterases), XeH-RasV12 n'est plus capable de conduire à l'activation de Cdc2. Ces résultats montrent que l'activation de Cdc2 dépend à la fois de la synthèse d'une ou de plusieurs protéines non encore identifiées, et de l'inhibition de l'activité de PKA, comme dans le cas de la progestérone. Dans ces deux cas, H-Ras est donc incapable d'activer le MPF, mais l'activation de la MAPK a cependant lieu, au moins partiellement. Cette activation de la MAPK par H-RasV12 en l'absence de MPF, de la protéine Mos et de synthèse protéique, pourrait donc être médié par la kinase Raf1, bien qu'elle soit elle-même régulée négativement par PKA.

En conclusion, H-Ras est bien capable de recruter Raf1 et d'activer la MAPK. Cependant, l'activation de la MAPK n'est pas requise pour l'activation initiale de Cdc2 induite par Xe H-RasV12 comme c'est le cas pour la progestérone (Dupré et al., 2002a; Dupré et al., 2002b). Les voies de transduction lancées par la progestérone et par Xe H-RasV12 dépendent de la synthèse de protéines non encore identifiées. Comme nous l'avons commenté précédemment pour la progestérone, l'une ou l'autre des deux voies redondantes, la voie lancée par Mos et synthèse de Cyclines, serait responsable de l'activation initiale du MPF (Haccard and Jessus 2006b). En ce qui concerne Ras, l'activation de l'un de ses trois effecteurs Raf, PI3K ou RalGDS, pourrait conduire à l'activation de Cdc2 selon un mécanisme indépendant de la MAPK. Au cours de ma thèse, j'ai eu pour double objectif de déterminer le rôle et le mode d'action de H-Ras dans l'activation de la kinase Cdc2 au cours de la maturation de l'ovocyte de Xénope.

Les résultats présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Oncogene* (Gaffre et al., 2006).

4) Résultats : Etude de la voie de transduction induite par Xe H-Ras dans l'ovocyte de Xénope

a) La voie induite par Xe H-Ras dans l'ovocyte de Xénope

Afin de déterminer quelle est la voie induite par Xe H-Ras dans l'ovocyte de Xénope, nous avons généré trois doubles mutants dans le domaine effecteur de Xe H-Ras. Tous ces doubles mutants sont constitutivement actifs, puisqu'ils présentent la mutation de la Glycine en Valine en position 12. D'après ce qui a été décrit dans les cellules mammaliennes, ils

devraient présenter la caractéristique d'interagir uniquement avec l'une des trois voies ciblées par Ras, à l'exclusion des deux autres : H-RasV12G37 lance la voie RalGDS (mais n'active ni Raf1, ni PI3K), H-RasV12S35 lance la voie Raf1 (mais n'active ni PI3K ni RalGDS), et enfin H-RasV12C40 active la voie PI3K (mais n'active ni Raf1 ni RalGDS) (Figure 35).

Ces trois doubles mutants ont été injectés dans des ovocytes en prophase. Pour être actif H-Ras doit subir des modifications post-traductionnelles telles que la myristoylation ou la palmitoylation, qui permettent son adressage aux membranes. Comme c'était le cas pour Xe H-RasV12, les trois doubles mutants sont correctement adressés aux membranes dans les 90 minutes qui suivent l'injection, et sont donc potentiellement activables.

Cependant, seul le double mutant Xe H-RasV12G37 induit la reprise de la méiose avec une cinétique plus lente que la progestérone ou le simple mutant Xe H-RasV12. De manière surprenante, le double mutant Xe H-RasV12S35 n'a aucun effet sur la reprise de la méiose malgré l'activation partielle de la MAPK. Pour expliquer le fait que Xe H-RasV12S35 n'active que partiellement la MAPK et n'induit pas GVBD dans l'ovocyte de Xénope, nous pouvons émettre les deux hypothèses suivantes : soit Raf1 est peu accessible, soit il manque une protéine scaffold nécessaire à son interaction avec MEK. Pour répondre à cette question, nous avons surexprimé une forme sauvage de Raf1 dans des ovocytes en prophase de manière à compenser un défaut d'accessibilité de la protéine endogène. Dans ces conditions, l'injection de Xe H-RasV12S35 induit GVBD, l'activation totale de Raf1 et de la MAPK, montrant que ce double mutant est bien fonctionnel. La voie Raf1 est donc peu efficace dans l'ovocyte. Cependant, il a été publié que la voie MAPK n'était pas nécessaire pour l'activation du MPF induite par l'injection de Xe H-RasV12 (Dupré et al., 2002b). Ce n'est donc pas la voie Raf/MAPK activée par Xe H-RasV12, qui est responsable de la reprise de la méiose.

Les données portant sur la voie PI3K dans l'ovocyte de Xénope sont à nouveau assez contradictoires mais suggèrent que cette protéine ne soit pas impliquée dans la reprise de la méiose. En effet, il a été rapporté que les inhibiteurs de la PI3K comme la wortmanine ou le LY294002 ne bloquent pas la reprise de la méiose induite par la progestérone (Carnero and Lacal 1998). En accord avec ces observations, le double mutant Xe H-RasV12C40, spécifique de la PI3K dans les cellules mammaliennes, n'induit pas la reprise de la méiose. En revanche, dans un ovocyte injecté avec un ARNm codant pour une forme mutante de la sous-unité catalytique de la PI3K, p110 α , constitutivement adressée à la membrane, Xe H-RasV12C40 devient capable de conduire à l'activation de Cdc2. Ce double mutant est donc effectivement

capable de recruter la voie PI3K dans l'ovocyte. Mais dans l'ovocyte, la PI3K endogène ne semble pas impliquée dans l'activation de Cdc2 induite par XeH-Ras.

Enfin, nous avons montré que le troisième double mutant, Xe H-RasV12G37, qui active la voie RalGDS dans les cellules mammaliennes, induit GVBD indépendamment de la voie Ral dans l'ovocyte. En effet nous avons montré que l'injection de deux mutants de RalB, l'un constitutivement actif, RalG23V, et l'autre, RalS28N, dominant négatif (blocage de l'activité GEF de RalGDS par liaison à son domaine catalytique) n'avaient aucun effet sur la reprise de la méiose induite par la progestérone ou par Xe H-RasV12G37. La forme constitutivement active de Ral est par ailleurs incapable de déclencher la reprise de la méiose. Il a été décrit chez d'autres espèces et types cellulaires, que le mutant H-RasV12G37 pouvait agir via une PI3K monomérique (Rodriguez-Viciano et al., 1996; Pacold et al., 2000; Prober and Edgar 2002; Gupta et al., 2007). Nous avons testé cette possibilité et montré que l'activation du MPF induite par Xe H-RasV12G37 est inhibée par le LY294002 (inhibiteur de PI3K). Xe H-Ras induit donc l'activation de Cdc2 par une voie dépendante du LY294002 qui pourrait correspondre à l'activation d'une PI3K particulière, non ciblée par Xe H-RasV12C40.

b) Quel rôle physiologique pour Xe H-Ras dans la reprise de la méiose ?

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une littérature abondante concernant le rôle physiologique potentiel de H-Ras dans la reprise de la méiose chez le Xénope, mais les résultats restent très controversés (Jesus et al., 1998). Nous avons montré que H-Ras induisait la reprise de la méiose via l'activation d'une PI3K (Gaffre et al., 2006). Chez l'Etoile de Mer, l'hormone qui provoque la reprise de la méiose ovocytaire, la 1-méthyladénine, agit en recrutant la voie PDK1/Akt qui dépend de la PI3K. Akt régule alors directement par phosphorylation Cdc25 et Myt1 (Hiraoka et al., 2004). Il est cependant peu probable que ce scénario opère dans l'ovocyte de Xénope. En effet, l'activation du MPF requiert une synthèse protéique, ce qui n'est pas le cas chez l'Etoile de Mer, et le rôle d'Akt semble écarté.

En outre, chez le Xénope, nous avons confirmé que la maturation méiotique induite par la progestérone n'était pas sensible aux inhibiteurs des PI3Ks comme le LY294002 et la wortmannine (Carnero and Lacal 1998; Gaffre et al., 2006). Donc, même si une voie PI3K est activable par H-Ras et a le potentiel de conduire à l'activation du MPF, elle ne semble pas être recrutée par la progestérone dans une situation physiologique.

Afin d'aborder le rôle de H-Ras dans le processus physiologique de la reprise de la méiose induite par la progestérone, nous avons utilisé un mutant de H-Ras dominant négatif, Xe H-

RasN17, qui, dans les cellules en culture, a été montré comme bloquant la protéine H-Ras endogène (Stacey et al., 1991). Injecté dans des ovocytes en prophase, ce mutant inhibe complètement la maturation induite par Xe H-RasV12, ce qui prouve qu'il exerce bien un effet dominant négatif. Mais il n'a aucun effet sur la maturation induite par la progestérone. Nous pouvons donc conclure de ces résultats que H-Ras n'est pas nécessaire pour l'activation de Cdc2 induite par la progestérone. Il est intéressant de noter que l'ovocyte a la potentialité d'activer le MPF par une voie Ras/PI3K, mais que dans une situation physiologique, il n'utilise pas celle-ci. Ceci illustre encore la notion de redondance qui caractérise le processus de la maturation méiotique. On ne peut exclure que dans des situations pathologiques, où les voies « canoniques », comme Mos/MAPK et synthèse de Cyclines sont inactives, l'ovocyte a recours à la voie Ras/PI3K comme secours. La multiplicité des voies conduisant à l'activation du MPF confère ainsi une robustesse au processus.

c) H-Ras et la maturation induite par l'insuline et l'IGF-1

Les IGFs (Insuline Growth Factor 1 et 2) sont des facteurs de croissance qui agissent par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase dans les cellules somatiques, apparentés au récepteur à l'insuline. L'insuline est capable de se lier aux récepteurs à l'IGF. L'insuline et l'IGF1 sont des inducteurs *in vitro* de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénopé (El Etr et al., 1980; Maller and Koontz 1981). Ces deux facteurs agissent via les récepteurs à l'IGF1 qui sont présents à la surface de l'ovocyte (Zhu et al., 1998). De plus, dans les ovaires, l'IGF-1 est présent à une forte concentration. Ce facteur de croissance pourrait avoir un rôle facilitateur de la reprise de la méiose lors de l'ovulation, en appui à la progestérone. Les cinétiques de maturation induites par l'insuline et l'IGF-1 sont plus lentes que celles qui sont induites par la progestérone, suggérant qu'ils agissent par des mécanismes distincts, bien qu'ils nécessitent tous la synthèse de nouvelles protéines et une chute de l'AMPc (El-etr et al., 1979; Sadler and Maller 1987; Miller 1989). Enfin, il a été montré que l'IGF1/insuline n'avaient pas besoin de la voie Mos/MAPK pour agir dans l'ovocyte (Baert et al., 2003). H-Ras étant une cible de la voie insuline/IGF1 dans les cellules en culture, nous avons voulu déterminer si H-Ras était un élément de la voie de transduction induite par l'insuline.

A l'appui de l'hypothèse selon laquelle H-Ras pourrait être impliqué dans le mécanisme d'action de l'insuline et de l'IGF-1 dans l'ovocyte, figurent plusieurs observations (Korn et al., 1987). Tout d'abord les cinétiques de maturation induites par la forme humaine de H-RasV12 ou l'insuline/IGF-1 sont similaires et la micro-injection d'anticorps bloquant

l'activité de Ras inhibe la maturation induite par l'insuline/IGF-1, mais n'ont aucun effet sur la maturation induite par la progestérone (Kung et al., 1986; Korn et al., 1987; Chung et al., 1992). Enfin, l'un des éléments communs à Ras et à l'insuline est la PI3K. De nombreux inhibiteurs de la liaison entre IRS1 et la PI3K, ainsi que des inhibiteurs de PI3Ks comme la wortmannine, bloquent la maturation induite par l'insuline/IGF-1 (Chuang et al., 1993; Liu et al., 1995). Or, nous avons montré que dans l'ovocyte de Xénope, Xe H-Ras induisait la reprise de la méiose par une voie dépendante de la PI3K (Gaffre et al., 2006). Pour étudier le rôle de Xe H-Ras dans le processus de la reprise de la méiose induite par l'insuline/IGF-1, nous avons utilisé le mutant de Xe H-Ras dominant négatif, Xe H-RasN17 (Stacey et al., 1991). Injecté dans des ovocytes en prophase, il n'inhibe pas la maturation induite par l'insuline. Nous avons donc montré que H-Ras n'était pas requis *in vivo* dans la voie de transduction induite par l'insuline dans l'ovocyte (Gaffre et al., 2006). En revanche, nous ne pouvons pas exclure qu'il y participe. Lors de l'ovulation, le taux d'IGF1 dans l'ovaire pourrait « faciliter » le processus de la reprise de la méiose induite par la progestérone.

En conclusion, nous avons montré que la voie induite par H-Ras n'était pas recrutée par la progestérone ou par le système IGF-1/insuline dans l'ovocyte de Xénope au cours de la maturation méiotique. Mais cette voie, comme d'autres voies, existe dans l'ovocyte et est fonctionnelle et il est possible qu'elle puisse être recrutée dans des conditions pathologiques pour assurer la reprise de la méiose quand les effecteurs normaux ne sont pas disponibles.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était l'étude de la régulation du moteur moléculaire responsable des divisions des cellules eucaryotes : le MPF (complexe Cdc2-Cycline B). Pour cela, nous avons choisi la maturation méiotique des ovocytes de Xénope comme modèle. Pendant l'ovogenèse, l'ovocyte se bloque en prophase de première division de méiose, un arrêt assimilé à une phase G2 du cycle cellulaire. La reprise de la méiose est assurée par une hormone stéroïde, la progestérone, qui agit par un mode d'action post-transcriptionnel. La méiose se bloque à nouveau en métaphase II. Le processus de maturation méiotique est donc comparable à la transition G2/M du cycle cellulaire, ce qui en fait un excellent modèle d'étude du régulateur de cette transition, le MPF. Ce modèle a permis effectivement de caractériser et d'identifier nombre de régulateurs de cette période du cycle, dont le MPF lui-même. Enfin, l'ovocyte de Xénope est une cellule géante de 1,2 mm de diamètre qui rend aisé le recours à des techniques de biochimie et de biologie cellulaire, qui permet la formation d'extraits acellulaires reproduisant l'activation du MPF, et qui autorise donc des études mécanistiques.

Notre travail a porté sur deux périodes de la maturation méiotique. Nous avons analysé la voie induite par H-Ras dans l'ovocyte et permettant l'activation du MPF et déterminé son rôle dans le processus physiologique de la reprise de la méiose. Puis nous avons étudié les voies de transduction induites par la progestérone qui conduisent à la régulation de Myt1, la kinase responsable de la phosphorylation et de l'inhibition du complexe Cdc2-Cycline B

1) H-Ras et la maturation méiotique

La reprise de la méiose de l'ovocyte de Xénope par la progestérone dépend de l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la chute de la concentration en AMPc qu'elle entraîne qui pourrait faire intervenir une petite protéine G (Mulner et al., 1979). Bien que la régulation du taux d'AMPc soit essentiellement assurée par les protéines G trimériques, certains modèles, comme la levure, voient leurs niveaux d'AMPc régulés par des petites protéines G de type Ras. Au laboratoire, des résultats inattendus ont été obtenus en utilisant la toxine létale, une glucosyl transférase qui inhibe spécifiquement les petites protéines G Ras, Rac et Rap (Jesus et al., 1998; Rime et al., 1998). En effet, la toxine létale induit la reprise de la méiose et ne passe pas par Rac, ce qui laisse la possibilité qu'elle agisse par H-Ras ou Rap. La petite protéine G impliquée pourrait donc avoir pour cible l'activation de l'adénylate

cyclase. Cependant, de nombreux arguments, dont le fait que l'injection d'une forme oncogénique de H-Ras induise la reprise de la méiose, ont conduit à exclure H-Ras comme activateur potentiel de l'adénylate cyclase.

Nous avons choisi d'étudier la voie induite par H-Ras dans l'ovocyte de Xénope et qui conduit à l'activation du MPF. Cette stratégie répondait à un double objectif. Le premier était de comprendre par quelle voie de transduction H-Ras pouvait conduire à l'activation du MPF. Ceci pouvait nous donner des indications sur les voies dont est équipé l'ovocyte et qui peuvent conduire à la reprise de la méiose. Le second était de savoir si une telle voie était recrutée par la progestérone lors du processus physiologique de la maturation méiotique. Les trois principales cibles de la petite protéine G H-Ras sont la kinase Raf1 à l'origine de l'activation de la voie MAPK, RalGDS, et PI3 kinase. Dans l'ovocyte de Xénope, l'injection d'une forme oncogénique de Raf1 ou des membres de la voie MAPK induit la reprise de la méiose (Fabian et al., 1993; Haccard et al., 1995; Huang et al., 1995; Gross et al., 1999). Cependant, dans des conditions physiologiques, l'activation de Raf1 serait une conséquence de l'activation de la voie MAPK et non un événement amont initiateur de la cascade MEK/MAPK/p90Rsk (Dupré et al., 2002a). Nos résultats indiquent que dans l'ovocyte de Xénope, l'injection de H-Ras conduit à l'activation du MPF par une voie sensible au LY294002 et à la wortmannine, qui pourrait passer par une PI3K monomérique, p110, comme cela a déjà été décrit chez d'autres espèces (Rodriguez-Viciano et al., 1996; Pacold et al., 2000; Prober and Edgar 2002). Cependant, chez le Xénope, nous avons confirmé que la maturation méiotique induite par la progestérone n'était pas sensible aux inhibiteurs des PI3Ks (Carnero and Lacal 1998; Gaffre et al., 2006). Donc, même si une voie PI3K est activable par H-Ras et a le potentiel de conduire à l'activation du MPF, elle ne semble pas être recrutée par la progestérone dans une situation physiologique. Ceci est corroboré par les résultats d'Andersen et al., qui ont montré que Akt, une cible de PI3K, était impliquée dans l'activation de Cdc2 en réponse à l'insuline mais pas à la progestérone (Andersen et al., 2003). Enfin, nous avons montré que H-Ras n'est pas impliquée dans la voie de transduction induite par la progestérone. En situation normale, la progestérone ne passe donc, ni par le recrutement de Ras, ni par celui de la voie PI3K/Akt, pour conduire à l'activation du MPF. Néanmoins, l'activation d'une PI3K a le potentiel à activer le MPF dans l'ovocyte. Ce mécanisme représente peut-être une réminiscence évolutive de la situation qui fonctionne chez l'étoile de mer. Chez cette espèce, c'est la kinase Akt activée par une PI3K, qui phosphoryle et régule la balance Myt1/Cdc25 (Okumura et al., 2002). Il est possible que cette

voie ait gardé sa fonctionnalité chez le Xénope, mais qu'une autre voie, recrutée par la progestérone ait été privilégiée.

Il sera intéressant dans le futur d'étudier le rôle de Rap1, qui reste la petite G candidate comme régulateur négatif de la reprise de la méiose. Nos résultats préliminaires montrent que l'injection d'une forme constitutivement active de Rap1 (Rap1V12) ralentit la cinétique de maturation induite par la progestérone, ce qui conforte l'hypothèse que Rap1 pourrait jouer ce rôle. Si tel est le cas, il serait alors possible de ré-étudier la cascade d'événements lancée très précocement par la progestérone : Rap fournirait un point d'entrée pour identifier les cibles en amont et en aval (récepteur, cyclase, PKA) de cette petite G, et pour appréhender le mécanisme de réception de la progestérone, une boîte noire depuis près de 30 ans.

2) Régulation de Myt1

Myt1 est la kinase responsable de l'inhibition de Cdc2 en fin d'ovogenèse chez le Xénope. Elle est régulée par phosphorylation au moment de GVBD. Deux kinases ont été proposées pour l'inhibition de Myt1, p90Rsk et Plx1 (Palmer et al., 1998; Inoue and Sagata 2005). Le modèle proposé est que Myt1 est inhibé par p90Rsk pendant la maturation méiotique et par Plx1 après la fécondation. La question majeure, non résolue, est la suivante : est-ce que l'inhibition de Myt1 représente un événement initiateur de l'activation du MPF, qui doit donc avoir lieu avant l'activation du MPF et indépendamment de son activité ? Si tel est le cas, les deux kinases proposées pour réguler Myt1, Plx1 et p90Rsk, ne peuvent pas rendre compte de cet événement, car elles sont toutes deux sous le contrôle du MPF. Nous avons montré que ces deux voies ne semblent effectivement pas pouvoir rendre compte à elles seules de l'inhibition initiale de Myt1 induite par la progestérone. Nos résultats ne nous permettent pas d'exclure une contribution de Plx1 à la phosphorylation de Myt1 au sein de la boucle d'auto-amplification, une fois les premières molécules de MPF activées. Contrairement à Plx1, p90Rsk est capable de conduire à une phosphorylation partielle de Myt1 en absence de Cdc2 actif, mais cette phosphorylation n'est pas suffisante pour inhiber la kinase. Cette voie pourrait donc aussi participer à la phosphorylation de Myt1, mais il sera nécessaire d'établir le rôle propre de cette phosphorylation ainsi que la chronologie des événements. Nous avons montré que la voie MAPK/p90Rsk est activée partiellement au même moment que l'inhibition de Myt1, et que son activation totale a lieu au moment de GVBD. Deux hypothèses sont envisageables. La première implique que la phosphorylation partielle de p90Rsk soit un pré-requis à une phosphorylation inhibitrice totale catalysée par

Cdc2. Pour cela, il sera intéressant de vérifier qu'en l'absence de p90Rsk et de Plx1 (expériences de double invalidation de Plx1, et de p90Rsk), Cdc2 est toujours capable d'inhiber Myt1. La deuxième hypothèse est que la phosphorylation de Myt1 par p90Rsk se situe en aval des phosphorylations inhibitrices catalysées par Cdc2, au sein de la boucle d'auto-amplification, et serait requise afin de maintenir le MPF sous sa forme active pendant le reste de la maturation et l'arrêt en métaphase II. L'analyse de l'évolution dynamique des complexes protéiques formés au cours de la maturation méiotique pourra nous permettre de discriminer entre ces deux hypothèses. Il sera également important d'identifier les sites spécifiques de phosphorylation par Plx1, par Cdc2 ou par p90Rsk. L'analyse des mutants pour ces différents sites permettrait d'établir la chronologie des événements de phosphorylation ainsi que leur importance au cours du processus de la maturation méiotique.

Le point fondamental de nos résultats est que les phosphorylations inhibitrices de Myt1 dépendent de l'activité Cdc2. Comment expliquer que l'inhibition de Myt1 dépende du MPF alors qu'il était proposé que l'inhibition de Myt1 soit un pré-requis pour l'activation du MPF? L'hypothèse la plus attractive est la suivante. Myt1 est une kinase active pendant la croissance ovocytaire, permettant l'accumulation du pré-MPF. En réponse à la progestérone, la synthèse de Cycline B1 est stimulée indépendamment de l'activité du MPF. Ces molécules de Cycline B1 s'associeraient à des molécules de Cdc2 déjà phosphorylées sur Thr161 et formeraient une amorce de MPF actif. Ces néo-complexes échapperaient à l'inhibition par Myt1, soit parce qu'ils ne sont pas accessibles à la phosphorylation par Myt1 (association avec un partenaire original), soit parce qu'ils seraient localisés dans un compartiment distinct de celui où réside Myt1 (aux membranes dans les ovocytes de stade VI), soit parce qu'ils inhibent directement Myt1, soit parce qu'ils permettent une activation rapide de Cdc25 qui contrebalance l'activité de Myt1, et est suffisante pour permettre la déphosphorylation du pré-MPF (Figure 37).

Cdc2 apparaît donc comme la kinase majeure permettant l'inhibition de Myt1. Elle agirait en partenariat soit avec Plx1 soit avec la voie Mos/MAPK/p90Rsk et si l'une de ces deux voies est invalidée, l'autre peut prendre le relais.

Un article récent propose que l'autophosphorylation de Myt1 sur la Sérine 66 soit un pré-requis pour son inhibition, impliquant que Myt1 lui-même amorce son inhibition (Kristjansdottir et al., 2006). Il sera également intéressant d'étudier plus en détail le rôle de cette auto-phosphorylation et si elle a lieu au cours de la maturation méiotique.

L'ovocyte de Xénope est donc une cellule qui est dotée de multiples voies de transduction convergeant vers l'activation du MPF. Il est probablement inutile de chercher à

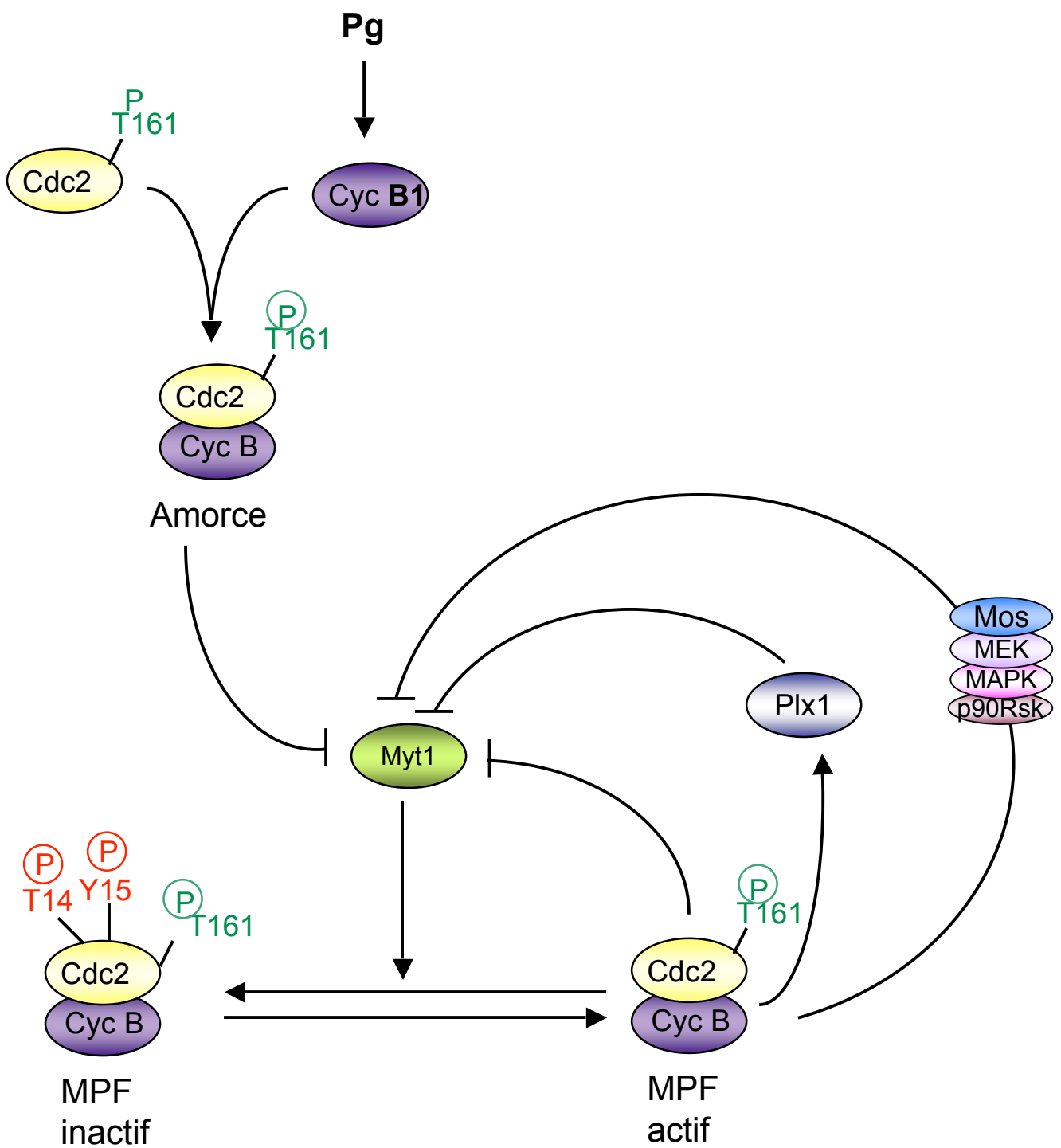


Figure 37 : Modèle de la régulation de Myt1

identifier « la » voie linéaire unique qui irait de la progestérone à l'activation du MPF. Beaucoup d'expériences d'invalidation de voies spécifiques ne perturbent pas dramatiquement le processus. Cela ne signifie pas forcément que ces voies ne servent pas pendant la maturation méiotique, mais qu'en leur absence, l'ovocyte a recours à d'autres voies de secours. L'ovocyte a donc à sa disposition un réseau complexe de voies redondantes, qui peuvent être activées dans des conditions pathologiques et conduire néanmoins à l'activation du MPF. La plasticité du choix des voies confère au système un caractère robuste qui permet la genèse d'un ovocyte fécondable même en situation perturbée, et qui rend difficile le travail du chercheur qui veut déterminer quelle est la voie préférentiellement utilisée en conditions physiologiques.

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**(Pt 12): 1751-7.
- Albright, C. F., Giddings, B. W., Liu, J., Vito, M. and Weinberg, R. A. (1993). "Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related gtpase." *EMBO Journal* **12**: 339-347.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B. A. (1996a). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *Embo J* **15**(23): 6541-51.
- Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. and Cohen, P. (1996b). "Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase." *FEBS Lett* **399**(3): 333-8.
- Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A. and Nasmyth, K. (1999). "Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage." *Embo J* **18**(10): 2707-21.
- Allende, C. C., Hinrichs, M. V., Santos, E. and Allende, J. E. (1988). "Oncogenic ras protein induces meiotic maturation of amphibian oocytes in the presence of protein synthesis inhibitors." *FEBS Lett* **234**(2): 426-30.
- Amanai, M., Shoji, S., Yoshida, N., Brahmajosyula, M. and Perry, A. C. (2006). "Injection of mammalian metaphase II oocytes with short interfering RNAs to dissect meiotic and early mitotic events." *Biol Reprod* **75**(6): 891-8.
- Andeol, Y., Gusse, M. and Mechali, M. (1990). "Characterization and expression of a *Xenopus* ras during oogenesis and development." *Dev Biol* **139**(1): 24-34.
- Andeol, Y., Mechali, M. and Houdry, J. (1992). "Localization of ras proto-oncogene expression during development in *xenopus-laevis*." *Mol. Reprod. Dev.* **32**: 187-195.
- Andersen, C. B., Sakaue, H., Nedachi, T., Kovacina, K. S., Clayberger, C., Conti, M. and Roth, R. A. (2003). "Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." *Biochem J* **369**(Pt 2): 227-38.
- Arellano, M., and Moreno, S., (1997). "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle." *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Apr;**29**(4):559-73. Review.
- Ayad, N. G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S. and Kirschner, M. W. (2003). "Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC." *Cell* **113**(1): 101-13.
- Baert, F., Bodart, J. F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A. and Vilain, J. P. (2003). "Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **278**(50): 49714-20.
- Baldin, V. and Ducommun, B. (1995). "Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle." *J Cell Sci* **108** (Pt 6): 2425-32.
- Barrett, C. B., Schroetke, R. M., Van der Hoorn, F. A., Nordeen, S. K. and Maller, J. L. (1990). "Ha-rasVal-12,Thr-59 activates S6 kinase and p34^{cdc2} kinase in *Xenopus* oocytes: evidence for c-mosx-dependent and -independent pathways." *Mol. Cell. Biol.* **10**(1): 310-315.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." *Cancer Cell* **3**(5): 421-9.
- Baum, E. Z. and Bebernitz, G. A. (1990). "K-ras oncogene expression in *Xenopus laevis*." *Oncogene* **5**(5): 763-7.
- Bayaa, M., Booth, R. A., Sheng, Y. and John Liu, X. (2000). "The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Bernards, A. and Settleman, J. (2004). "GAP control: regulating the regulators of small GTPases." *Trends Cell Biol* **14**(7): 377-85.
- Bhatt, R. R. and Ferrell, J. E., Jr. (1999). "The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosolic factor activity [In Process Citation]." *Science* **286**(5443): 1362-5.
- Birchmeier, C., Broek, D. and Wigler, M. (1985). "ras proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes." *Cell* **43**(3 Pt 2): 615-21.
- Bogoyevitch, M. A. and Kobe, B. (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(4): 1061-95.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J. and Kirschner, M. W. (1993). "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34^{CDC28} in response to G₁ and G₂ cyclins." *EMBO Journal* **12**: 3417-3426.
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., Depinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. (1991). "ERKs: A Family of Protein-

- Serine/Threonine Kinases That are Activated and Tyrosine Phosphorylated in Response to insulin and NGF." *Cell* **65**: 663-675.
- Boulton, T. G., Yancopoulos, D. G., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moonmaw, C., Hsu, J. and Cobb, M. H. (1990). "An Insulin-Stimulated Protein Kinase Similar to Yeast Kinase Involved in Cell Cycle Control." *Science* **24**: 64-67.
- Boutros, R., Dozier, C. and Ducommun, B. (2006). "The when and where of CDC25 phosphatases." *Curr Opin Cell Biol* **18**(2): 185-91.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A. and Davis, R. J. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." *Genes Dev* **17**(16): 1969-78.
- Brtva, T. R., Drugan, J. K., Ghosh, S., Terrell, R. S., Campbell-Burk, S., Bell, R. M. and Der, C. J. (1995). "Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras." *J Biol Chem* **270**(17): 9809-12.
- Burrows, A. E., Scurman, B. K., Kosinski, M. E., Richie, C. T., Sadler, P. L., Schumacher, J. M. and Golden, A. (2006). "The *C. elegans* Myt1 ortholog is required for the proper timing of oocyte maturation." *Development* **133**(4): 697-709.
- Carnero, A. and Lacal, J. C. (1995). "Activation of intracellular kinases in *Xenopus* oocytes by p21(ras) and phospholipases: A comparative study." *Mol. Cell. Biol.* **15**(2): 1094-1101.
- Carnero, A. and Lacal, J. C. (1998). "Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway." *FEBS Lett* **422**(2): 155-9.
- Carnero, A., Liyanage, M., Stabel, S. and Lacal, J. C. (1995). "Evidence for different signalling pathways of PKC zeta and ras-p21 in *Xenopus* oocytes." *Oncogene* **11**(8): 1541-7.
- Castro, A., Peter, M., Lorca, T. and Mandart, E. (2001). "c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation." *Biol Cell* **93**(1-2): 15-25.
- Chang, L. and Karin, M. (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Chesnel, F., Bonnet, G., Tardivel, A. and Boujard, D. (1997). "Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes." *Dev Biol* **188**(1): 122-133.
- Chuang, L. M., Myers, M. G., Backer, J. M., Shoelson, S. E., White, M. F., Birnbaum, M. J. and Kahn, C. R. (1993). "Insulin-Stimulated Oocyte Maturation Requires Insulin Receptor Substrate-1 and Interaction with the SH2 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Mol. Cell. Biol.* **13**(11): 6653-6660.
- Chung, D. L., Joran, A., Friedman, F., Robinson, R., Brandt-Rauf, P. W., Weinstein, I. B., Ronai, Z., Baskin, L., Dykes, D. C., Murphy, R. B. and al., e. (1992). "Evidence that oocyte maturation induced by an oncogenic ras-p21 protein and insulin is mediated by overlapping yet distinct mechanisms." *Exp Cell Res* **203**(2): 329-35.
- Claperon, A. and Therrien, M. (2007). "KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation." *Oncogene* **26**(22): 3143-58.
- Clarke, P. R. (1995). "Cyclin-dependent kinases: CAK-handed kinase activation." *Curr. Biol.* **5**(1): 40-42.
- Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1994). "Cdc2 regulatory factors." *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**(6): 877-882.
- Coleman, T. R., Tang, Z. H. and Dunphy, W. G. (1993). "Negative regulation of the Wee1 protein kinase by direct action of the Nim1/Cdr1 mitotic inducer." *Cell* **72**: 919-929.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Udy, G. B. and Evans, M. J. (1994). "Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs." *Nature* **370**(6484): 65-68.
- Cornwell, W. D., Kaminski, P. J. and Jackson, J. R. (2002). "Identification of *Drosophila* Myt1 kinase and its role in Golgi during mitosis." *Cell Signal* **14**(5): 467-76.
- Cox, A. D. and Der, C. J. (1997). "Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras?" *Biochim Biophys Acta* **1333**(1): F51-71.
- Cox, A. D. and Der, C. J. (2002). "Ras family signaling: therapeutic targeting." *Cancer Biol Ther* **1**(6): 599-606.
- Cuenda, A. and Rousseau, S. (2007). "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta*.
- Daar, I., Nebreda, A. R., Yew, N., Sass, P., Paules, R., Santos, E., Wigler, M. and Vande Woude, G. F. (1991). "The ras oncoprotein and M-phase activity." *Science* **253**(5015): 74-6.
- Daar, I., Yew, N. and Vande Woude, G. F. (1993). "Inhibition of mos-induced oocyte maturation by protein kinase A." *J Cell Biol* **120**(5): 1197-202.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L.,

- Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R. and Futreal, P. A. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-54.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* **103**(2): 239-52.
- De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaïskou, A., Jessus, C. and Ozon, R. (2002). "Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **277**(32): 28592-600.
- Den Haese, G. J., Walworth, N., Carr, A. M. and Gould, K. L. (1995). "The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2." *Mol Biol Cell* **6**(4): 371-85.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R. J. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* **76**(6): 1025-37.
- 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 ('menage à trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK." *EMBO Journal* **14**(20): 5027-5036.
- Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L. and Davis, R. J. (1997). "A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway." *Science* **277**(5326): 693-6.
- Diffley, J. F. (2001). "DNA replication: building the perfect switch." *Curr Biol* **11**(9): R367-70.
- Doree, M. (1990). "Control of M-phase by maturation-promoting factor." *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 269-273.
- Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. (2007) "Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice." *Biochem J*. **398**(2):243-56.
- Drugan, J. K., Khosravi-Far, R., White, M. A., Der, C. J., Sung, Y. J., Hwang, Y. W. and Campbell, S. L. (1996). "Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation." *J Biol Chem* **271**(1): 233-7.
- Drugan, J. K., Rogers-Graham, K., Gilmer, T., Campbell, S. and Clark, G. J. (2000). "The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain." *J Biol Chem* **275**(45): 35021-7.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S. and Ruderman, J. V. (2002). "G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16794-9.
- Dudler, T. and Gelb, M. H. (1996). "Palmitoylation of Ha-Ras facilitates membrane binding, activation of downstream effectors, and meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **271**(19): 11541-7.
- Dudler, T. and Gelb, M. H. (1997). "Replacement of the H-Ras farnesyl group by lipid analogues: Implications for downstream processing and effector activation in *Xenopus* oocytes." *Biochemistry* **36**(41): 12434-12441.
- Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." *J. Morphol.* **136**: 153-179.
- Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. and Newport, J. (1988). "The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis." *Cell* **54**(3): 423-431.
- Dunphy, W. G. and Kumagai, A. (1991). "The Cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity." *Cell* **67**: 189-196.
- Dupré, A., Jessus, C., Ozon, R. and Haccard, O. (2002a). "Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." *Embo J* **21**(15): 4026-36.
- Dupré, A., Suziedelis, K., Valuckaite, R., de Gunzburg, J., Ozon, R., Jessus, C. and Haccard, O. (2002b). "Xenopus H-RasV12 promotes entry into meiotic M phase and cdc2 activation independently of Mos and p42(MAPK)." *Oncogene* **21**(42): 6425-33.
- El Etr, M., Schorderet-slatkine, S. and Baulieu, E.-E. (1980). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by insulin. *Steroids and their mechanism of action in nonmammalian vertebrates*. G. Delrio and J. Brachet. New York, Raven press: 103-110.
- El-etr, M., Schorderet-slatkine, S. and Baulieu, E. E. (1979). "Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin." *Science* **205**: 1397-1399.
- Elia, A. E., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003a). "Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates." *Science* **299**(5610): 1228-31.
- Elia, A. E., Rellos, P., Haire, L. F., Chao, J. W., Ivins, F. J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L. C., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2003b). "The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain." *Cell* **115**(1): 83-95.
- Enslin, H. and Davis, R. J. (2001). "Regulation of MAP kinases by docking domains." *Biol Cell* **93**(1-2): 5-14.
- Erikson, E., Haystead, T. A., Qian, Y. W. and Maller, J. L. (2004). "A feedback loop in the polo-like kinase activation pathway." *J Biol Chem* **279**(31): 32219-24.

- Fabian, J. R., Morrison, D. K. and Daar, I. O. (1993). "Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes." *J Cell Biol* **122**(3): 645-52.
- Fattaey, A. and Booher, R. N. (1997). "Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14." *Prog Cell Cycle Res* **3**: 233-40.
- Faure, S., Morin, N. and Doree, M. (1998). "Inactivation of protein kinase A is not required for c-mos translation during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes." *Oncogene* **17**(10): 1215-1221.
- Feig, L. A., Buchsbaum, R. J. (2002) "Cell signaling: life or death decisions of ras proteins." *Curr Biol* **2**;12(7):R259-61. Review.
- Feig, L. A., Urano, T. and Cantor, S. (1996). "Evidence for a Ras/Ral signaling cascade." *Trends Biochem Sci* **21**(11): 438-41.
- Ferby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R. and Nebreda, A. R. (1999). "A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes." *Genes Dev* **13**(16): 2177-89.
- Ferguson, A. M., White, L. S., Donovan, P. J. and Piwnicka-Worms, H. (2005). "Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases." *Mol Cell Biol* **25**(7): 2853-60.
- Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M. and Cavadore, J. C. (1993). "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 Journal* **12**(8): 3111-21.
- Fisher, D. L., Brassac, T., Galas, S. and Dor#e, M. (1999). "Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone- stimulated maturation of *Xenopus* oocytes." *Development* **126**(20): 4537-4546.
- Frank-Vaillant, M., Haccard, O., Ozon, R. and Jessus, C. (2001). "Interplay between Cdc2 kinase and the c-Mos/MAPK pathway between metaphase I and metaphase II in *Xenopus* oocytes." *Dev Biol* **231**(1): 279-88.
- Frank-Vaillant, M., Jessus, C., Ozon, R., Maller, J. L. and Haccard, O. (1999). "Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and mos in *xenopus* oocytes in response to progesterone." *Mol Biol Cell* **10**(10): 3279-88.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., Kosako, H., Hattori, S. and Nishida, E. (1994). "Analysis of the Ras p21/mitogen-activated protein kinase signaling in vitro and in *Xenopus* oocytes." *J. Biol. Chem.* **269**(52): 33097-33101.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. and Takai, Y. (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins." *Oncogene* **5**(9): 1321-8.
- 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**(4): 833-45.
- Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1994). "Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes." *EMBO Journal* **13**(10): 2399-410.
- Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N. and Sagata, N. (1997). "Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase." *EMBO J* **16**(13): 3860-3865.
- Furuya, K. and Carr, A. M. (2003). "DNA checkpoints in fission yeast." *J Cell Sci* **116**(Pt 19): 3847-8.
- Gabrielli, B. G., Roy, L. M. and Maller, J. L. (1993). "Requirement for Cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest." *Science* **259**(5102): 1766-1769.
- Gaffre, M., Dupre, A., Valuckaite, R., Suziedelis, K., Jessus, C. and Haccard, O. (2006). "Deciphering the H-Ras pathway in *Xenopus* oocyte." *Oncogene* **25**(37): 5155-62.
- Galaktionov, K., Jessus, C. and Beach, D. (1995). "Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation." *Genes Dev* **9**(9): 1046-58.
- Gard, D. L. (1992). "Microtubule organization during maturation of *xenopus* oocytes - assembly and rotation of the meiotic spindles." *Develop. Biol.* **151**: 516-530.
- Garrington, T. P. and Johnson, G. L. (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 211-8.
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. and Maller, J. L. (1990). "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*." *Cell* **60**(3): 487-494.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M. and Maller, J. (1988). "Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle 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 p34^{cdc2}." *Cell* **67**: 197-211.

- Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. and Kalbitzer, H. R. (1997). "Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling." Nat Struct Biol **4**(9): 694-9.
- Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J. C., Russell, P., Fernandez, A. and Lamb, N. J. C. (1992). "Cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells." J. Cell Biol. **118**: 785-794.
- Glutzer, M., Murray, A. W. and Kirschner, M. W. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**: 132-138.
- Godeau, J. F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. and Baulieu, E. E. (1978). "Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(5): 2353-7.
- Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W. (1989). "Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes." FEBS Letters **245**(1-2): 91-4.
- Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K. and Nishida, E. (1995). "Initiation of *Xenopus* oocyte maturation by activation of the mitogen- activated protein kinase cascade." J Biol Chem **270**(43): 25898-25904.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L. (1999). "Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk." Science **286**(5443): 1365-7.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y. W. and Maller, J. L. (2000). "The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk)." Curr Biol **10**(8): 430-8.
- Gurdon, J. B. (1967). "On the origin and persistence of a cytoplasmic state inducing nuclear DNA synthesis in frogs' eggs." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 545-52.
- Gutierrez, G. J., Vogtlin, A., Castro, A., Ferby, I., Salvagiotto, G., Ronai, Z., Lorca, T. and Nebreda, A. R. (2006). "Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation." Nat Cell Biol **8**(10): 1084-94.
- Haccard, O. and Jessus, C. (2006a). "Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation." Cell Cycle **5**(11): 1152-9.
- Haccard, O. and Jessus, C. (2006b). "Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis." EMBO Rep.
- Haccard, O., Jessus, C., Rime, H., Goris, J., Merlevede, W. and Ozon, R. (1993). "Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activation in *Xenopus* oocytes: roles of MPF and protein synthesis." Molecular Reproduction and Development **36**(1): 96-105.
- Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R. S., Erikson, E. and Maller, J. L. (1995). "Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase." Developmental Biology **168**(2): 677-82.
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A. and Nasmyth, K. (2002). "Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex." Mol Cell **9**(4): 773-88.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. and Pines, J. (1999). "Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal [In Process Citation]." Curr Biol **9**(13): 680-9.
- Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P. and Conti, M. (2005). "Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse." Curr Biol **15**(18): 1670-6.
- Hanocq-Quertier, J. and Hanocq, F. (1991). "Expression of ras-like proteins in embryonic and adult cells of *Xenopus laevis*." Mol Reprod Dev **28**(4): 325-36.
- Hansen, D. V., Tung, J. J. and Jackson, P. K. (2006). "CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 608-13.
- Hardwick, K.G., (2005). "Checkpoint signalling: Mad2 conformers and signal propagation". Curr Biol. **15**(4):R122-4. Review..
- Harvey, S. L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S. P. and Kellogg, D. R. (2005). "Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1." Cell **122**(3): 407-20.
- Harvey, S. L. and Kellogg, D. R. (2003). "Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control." Curr Biol **13**(4): 264-75.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S. (1994). "Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice." Nature **370**(6484): 68-71.
- Heald, R., McLoughlin, M. and McKeon, F. (1993). "Human wee-1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated cdc2 kinase." Cell **74**: 463-474.
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A. and Sluder, G. (2001). "Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase." Science **291**(5508): 1547-50.

- Hiraoka, D., Hori-Oshima, S., Fukuhara, T., Tachibana, K., Okumura, E. and Kishimoto, T. (2004). "PDK1 is required for the hormonal signaling pathway leading to meiotic resumption in starfish oocytes." Dev Biol **276**(2): 330-6.
- Hochegger, H., Klotzbucher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M. and Hunt, T. (2001). "New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation." Development **128**(19): 3795-807.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C. and Martin, G. S. (1994). "Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11089-93.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., 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 Journal **12**(1): 53-63.
- Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (1994). "Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G(1)/S transition." EMBO Journal **13**(18): 4302-4310.
- Howe, L., Leever, S., Gomez, N., Nakielnny, S., Cohen, P. and Marshall, C. (1992). "Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf." Cell **71**(2): 335-342.
- Hu, C. D., Kariya, K., Tamada, M., Akasaka, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Kataoka, T. (1995). "Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras." J Biol Chem **270**(51): 30274-7.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G. S. and Kim, S. H. (1998). "Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS." Nat Struct Biol **5**(6): 422-6.
- Huang, L., Weng, X., Hofer, F., Martin, G. S. and Kim, S. H. (1997). "Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS." Nat Struct Biol **4**(8): 609-15.
- Huang, W., Kessler, D. and Erikson, R. (1995). "Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants." Mol. Biol. Cell **6**(3): 237-45.
- Huchon, D., Crozet, N., Cantenot, N. and Ozon, R. (1981a). "Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte: description of a transient microtubular structure." Reproduction, Nutrition, Developpement **21**(1): 135-48.
- Huchon, D., Ozon, R., Fischer, E. H. and Demaille, J. G. (1981b). "The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation A 4-step scheme for meiotic maturation." Molecular & Cellular Endocrinology **22**(2): 211-22.
- Huchon, D., Rime, H., Jessus, C. and Ozon, R. (1993). "Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis." Biol Cell **77**(2): 133-41.
- Hwang, L. H., Lau, L. F., Smith, D. L., Mistrot, C. A., Hardwick, K. G., Hwang, E. S., Amon, A. and Murray, A. W. (1998). "Budding yeast Cdc20: A target of the spindle checkpoint." Science **279**(5353): 1041-1044.
- Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K. and Okayama, H. (1991). "Wee1(+)-like gene in human cells." Nature **353**(6339): 80-3.
- Ikeda, M., Ishida, O., Hinoi, T., Kishida, S. and Kikuchi, A. (1998). "Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral." J Biol Chem **273**(2): 814-21.
- Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T. and Sagata, N. (2007). "A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs." Nature **446**(7139): 1100-4.
- Inoue, D. and Sagata, N. (2005). "The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs." Embo J **24**(5): 1057-67.
- Ishikawa, K., Hanaoka, Y., Kondo, Y. and Imai, K. (1977). "Primary action of steroid hormone at the surface of amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown." Mol Cell Endocrinol **9**(1): 91-100.
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W. and Kishimoto, T. (2000). "Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts." Embo J **19**(17): 4513-23.
- Izumi, T., Walker, D. H. and Maller, J. L. (1992). "Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* Cdc25 phosphatase regulate its activity." Mol. Biol. Cell **3**: 927-939.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A. and Pines, J. (2003). "Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase." Nat Cell Biol **5**(2): 143-8.
- Jacobelli, S., Hanocq, J., Baltus, E. and Brachet, J. (1974). "Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor." Differentiation **2**: 129-13.
- Jessus, C. and Ozon, R. (2004). "How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation?" Biol Cell **96**(3): 187-92.
- Jessus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W. and Ozon, R. (1991). "Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP." Development **111**(3): 813-20.

- Jessus, C., Rime, H. and Ozon, R. (1998). "Ras family proteins: new players involved in the diplotene arrest of *Xenopus* oocytes." *Biol. Cell* **90**(8): 573-83.
- Jin, Z., Homola, E. M., Goldbach, P., Choi, Y., Brill, J. A. and Campbell, S. D. (2005). "Drosophila Myt1 is a Cdk1 inhibitory kinase that regulates multiple aspects of cell cycle behavior during gametogenesis." *Development* **132**(18): 4075-85.
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. and Okayama, H. (1994). "Cdc25A Is a Novel Phosphatase Functioning Early in the Cell Cycle." *EMBO Journal* **13**(7): 1549-1556.
- Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-2.
- Jones, S. W., Erikson, E., Blenis, J., Maller, J. L. and Erikson, R. L. (1988). "A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**(10): 3377-81.
- Josefsberg Ben-Yehoshua, L., Lewellyn, A. L., Thomas, P. and Maller, J. L. (2007). "The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation." *Mol Endocrinol* **21**(3): 664-73.
- Kaiser, P., Sia, R. A., Bardes, E. G., Lew, D. J. and Reed, S. I. (1998). "Cdc34 and the F-box protein Met30 are required for degradation of the Cdk-inhibitory kinase Swe1." *Genes Dev* **12**(16): 2587-97.
- Kallstrom, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A. and Rosenthal, C. K. (2005). "Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import." *Exp Cell Res* **303**(1): 89-100.
- Kalejs, M., Ivanov, A., Plakhins, G., Cragg, M. S., Emzinsh, D., Illidge, T. M. and Erenpreisa, J. (2006). "Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe." *BMC Cancer* **6**: 6.
- Kamata, T. and Kung, H. F. (1990). "Modulation of maturation and ribosomal protein S6 phosphorylation in *Xenopus* oocytes by microinjection of oncogenic ras protein and protein kinase C." *Mol Cell Biol* **10**(3): 880-6.
- Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C. and Ozon, R. (1998). "MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase." *Exp Cell Res* **244**(2): 491-500.
- Karaiskou, A., Jessus, C., Brassac, T. and Ozon, R. (1999). "Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification." *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3747-56.
- Karaiskou, A., Lepretre, A. C., Pahlavan, G., Du Pasquier, D., Ozon, R. and Jessus, C. (2004). "Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes." *Development* **131**(7): 1543-52.
- Karaiskou, A., Perez, L. H., Ferby, I., Ozon, R., Jessus, C. and Nebreda, A. R. (2001). "Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins." *J Biol Chem* **276**(38): 36028-34.
- Karsenti, E. and Vernos, I. (2001). "The mitotic spindle: a self-made machine." *Science* **294**(5542): 543-7.
- Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O. and Winoto, A. (2000). "ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain." *Mol Cell Biol* **20**(22): 8382-9.
- Keyse, S. M. (2000). "Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling." *Curr Opin Cell Biol* **12**(2): 186-92.
- Kim, S. H., Lin, D. P., Matsumoto, S., Kitazono, A. and Matsumoto, T. (1998). "Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint [see comments]." *Science* **279**(5353): 1045-7.
- Kishida, S., Koyama, S., Matsubara, K., Kishida, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A. (1997). "Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator." *Oncogene* **15**(24): 2899-907.
- Kobayashi, H., Minshull, J., Ford, C., Golsteyn, R., Poon, R. and Hunt, T. (1991). "On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*." *J Cell Biol* **114**: 755-765.
- Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 827-37.
- Korn, L. J., Siebel, C. W., McCormick, F. and Roth, R. A. (1987). "Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes." *Science* **236**(4803): 840-3.
- Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T. and Newport, J. (1994). "Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34^{cdc2} on threonine 14." *Mol. Biol. Cell* **5**(3): 273-82.
- Kristjansdottir, K., Safi, A., Shah, C. and Rudolph, J. (2006). "Autophosphorylation of Ser66 on *Xenopus* Myt1 is a prerequisite for meiotic inactivation of Myt1." *Cell Cycle* **5**(4): 421-7.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1991). "The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system." *Cell* **64**: 903-914.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (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**(5280): 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**(9): 1067-72.
- Kumagai, A., Yakowec, P. S. and Dunphy, W. G. (1998). "14-3-3 Proteins Act As Negative Regulators Of the Inducer Cdc25 In *Xenopus* Egg Extracts." *Molecular Biology of the Cell* **9**(2): 345-354.
- Kung, H. F., Smith, M. R., Bekesi, E., Manne, V. and Stacey, D. W. (1986). "Reversal of transformed phenotype by monoclonal antibodies against Ha- ras p21 proteins." *Exp Cell Res* **162**(2): 363-71.
- Kuroda, Y., Suzuki, N. and Kataoka, T. (1993). "The effect of posttranslational modifications on the interaction of Ras2 with adenylyl cyclase." *Science* **259**(5095): 683-6.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. (1992). "Raf-1 activates map kinase-kinase." *Nature* **358**: 417-421.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. and Woodgett, J. R. (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." *Nature* **369**(6476): 156-60.
- Laskey, R. A., Harland, R. M. and Mechali, M. (1983). "Induction of chromosome replication during maturation of amphibian oocytes." *Ciba Found Symp* **98**: 25-43.
- Lee, J. D., Ulevitch, R. J. and Han, J. (1995). "Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase." *Biochem Biophys Res Commun* **213**(2): 715-24.
- Leevers, S. J., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1994). "Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane." *Nature* **369**(6479): 411-4.
- Leibovitch, S. A., Guillier, M., Lenormand, J. L. and Leibovitch, M. P. (1993). "p34(cdc2) protein is complexed with the c-mos protein in rat skeletal muscle." *Oncogene* **8**: 2361-2369.
- Leighton, I. A., Dalby, K. N., Caudwell, F. B., Cohen, P. T. and Cohen, P. (1995). "Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation." *FEBS Lett* **375**(3): 289-93.
- Leise, W., 3rd and Mueller, P. R. (2002). "Multiple Cdk1 inhibitory kinases regulate the cell cycle during development." *Dev Biol* **249**(1): 156-73.
- Lemaitre, J. M., Bocquet, S. and Mechali, M. (2002). "Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation." *Nature* **419**(6908): 718-22.
- Lenormand, J. L., Dellinger, R. W., Knudsen, K. E., Subramani, S. and Donoghue, D. J. (1999). "Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition." *Embo J* **18**(7): 1869-77.
- Lenormand, J. L., Benayoun, B., Guillier, M., Vandromme, M., Leibovitch, M. P. and Leibovitch, S. A. (1997). "Mos activates myogenic differentiation by promoting heterodimerization of MyoD and E12 proteins." *Mol Cell Biol* **17**(2): 584-93.
- Li, J., Meyer, A. N. and Donoghue, D. J. (1997). "Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(2): 502-507.
- Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E. and Rosenthal, C. K. (2005). "Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome." *J Cell Biol* **171**(1): 35-45.
- Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C. E. and Piwnica-Worms, H. (1999). "Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5113-23.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. and Piwnica-Worms, H. (1997). "The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex." *Mol Cell Biol* **17**(2): 571-83.
- Liu, J., Fitzli, D., Liu, M., Tseu, I., Caniggia, I., Rotin, D. and Post, M. (1998). "PDGF-induced glycosaminoglycan synthesis is mediated via phosphatidylinositol 3-kinase." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 1): L702-13.
- Liu, J. and Maller, J. L. (2005). "Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor." *Curr Biol* **15**(16): 1458-68.
- Liu, X. J., Sorisky, A., Zhu, L. and Pawson, T. (1995). "Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin- induced *Xenopus* oocyte maturation." *Mol Cell Biol* **15**(7): 3563-70.
- 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. U S A* **85**(9): 3009-3013.
- Lorca, T., Castro, A., Martinez, A. M., Vigneron, S., Morin, N., Sigrist, S., Lehner, C., Doree, M. and Labbe, J. C. (1998). "Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts." *Embo J* **17**(13): 3565-75.

- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Mery, J., Means, A. and Doree, M. (1993). "Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II Mediates Inactivation of MPF and CSF upon Fertilization of *Xenopus* Eggs." *Nature* **366**(6452): 270-273.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R. and Hirano, T. (2000). "Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes." *J Cell Biol* **150**(3): 405-16.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991). "mik1 and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2." *Cell* **64**(6): 1111-22.
- Magee, T. and Marshall, C. (1999). "New Insights into the Interaction of Ras with the Plasma Membrane." *Cell* **98**: 9-12.
- Maller, J. L. (2001). "The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 8-10.
- Maller, J. L., Kemp, B. E. and Krebs, E. G. (1978). "In vivo phosphorylation of a synthetic peptide substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**(1): 248-51.
- Maller, J. L. and Koontz, J. W. (1981). "A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin." *Dev. Biol.* **85**(2): 309-16.
- Maller, J. L. and Krebs, E. G. (1977). "Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." *J. Biol. Chem.* **252**(5): 1712-1718.
- Maller, J. L. and Krebs, E. G. (1978). "Intracellular cAMP levels and the initiation of meiosis in *Xenopus* oocytes." *J. Cell Biol.* **79**: 180a.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2007). "Cell cycle kinases in cancer." *Curr Opin Genet Dev* **17**(1): 60-5.
- Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E. and Yaffe, M. B. (2005). "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation." *Mol Cell* **17**(1): 37-48.
- Margolis, S. S. and Kornbluth, S. (2004). "When the checkpoints have gone: insights into Cdc25 functional activation." *Cell Cycle* **3**(4): 425-8.
- Margolis, S. S., Perry, J. A., Forester, C. M., Nutt, L. K., Guo, Y., Jardim, M. J., Thomenius, M. J., Freel, C. D., Darbandi, R., Ahn, J. H., Arroyo, J. D., Wang, X. F., Shenolikar, S., Nairn, A. C., Dunphy, W. G., Hahn, W. C., Virshup, D. M. and Kornbluth, S. (2006a). "Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis." *Cell* **127**(4): 759-73.
- Margolis, S. S., Perry, J. A., Weitzel, D. H., Freel, C. D., Yoshida, M., Haystead, T. A. and Kornbluth, S. (2006b). "A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1779-89.
- Margolis, S. S., Walsh, S., Weiser, D. C., Yoshida, M., Shenolikar, S. and Kornbluth, S. (2003). "PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation." *Embo J* **22**(21): 5734-45.
- Marshall, C. J. (1994). "MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase." *Curr Opin Genet Dev* **4**(1): 82-9.
- Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." *J. Exp. Zool.* **177**: 129-146.
- Maton, G., Lorca, T., Girault, J. A., Ozon, R. and Jessus, C. (2005). "Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in *Xenopus* oocytes: a crucial role of phosphatase 2A." *J Cell Sci* **118**(Pt 11): 2485-94.
- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M. and Kikuchi, A. (1999). "Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation." *Oncogene* **18**(6): 1303-12.
- Matten, W., Daar, I. and Vande Woude, G. F. (1994). "Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation." *Mol Cell Biol* **14**(7): 4419-26.
- May, K. M. and Hardwick, K. G. (2006). "The spindle checkpoint." *J Cell Sci* **119**(Pt 20): 4139-42.
- McGowan, C. H. and Russell, P. (1993). "Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34^{cdc2} exclusively on Tyr15." *EMBO Journal* **12**(1): 75-85.
- McKay, M. M. and Morrison, D. K. (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." *Oncogene* **26**(22): 3113-21.
- Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R. and Russell, P. (1991a). "p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast." *Embo J* **10**(13): 4301-9.
- Millar, J. B. A., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C. and Russell, P. (1991b). "p55cdc25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10500-10504.
- Millar, J. B. A. and Russell, P. (1992). "The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase." *Cell* **68**: 407-410.
- Miller, D. S. (1989). "Stimulation of protein synthesis in stage IV *Xenopus* oocytes by microinjected insulin." *J. Biol. Chem.* **264**: 10438-10446.

- Minshull, J., Murray, A., Colman, A. and Hunt, T. (1991). "Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis." *J Cell Biol* **114**(4): 767-72.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A. and Kolch, W. (1996). "Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5409-18.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-42.
- Mittelstadt, P. R., Salvador, J. M., Fornace, A. J., Jr. and Ashwell, J. D. (2005). "Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase." *Cell Cycle* **4**(9): 1189-92.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* **374**: 131-134.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-91.
- Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M. and Campbell, S. L. (1996). "The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8312-7.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1995a). "Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase." *Mol Biol Cell* **6**(1): 119-34.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1995b). "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." *Science* **270**(5233): 86-90.
- Mulner, O., Belle, R. and Ozon, R. (1983). "cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the Xenopus oocyte: evidence for an intracellular feedback mechanism." *Molecular & Cellular Endocrinology* **31**(1): 151-60.
- Mulner, O., Huchon, D., Thibier, C. and Ozon, R. (1979). "Cyclic AMP synthesis in Xenopus laevis oocytes: inhibition by progesterone." *Biochimica et Biophysica Acta* **582**(1): 179-84.
- Murakami, M. S. and Vande Woude, G. F. (1998). "Analysis of the early embryonic cell cycles of Xenopus; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos." *Development* **125**(2): 237-48.
- Muslin, A. J., Macnicol, A. M. and Williams, L. T. (1993). "Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced xenopus oocyte maturation and acts downstream of mos." *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4197-4202.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2003). "Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate." *J Biol Chem* **278**(28): 25277-80.
- Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K. and Sagata, N. (2000). "Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes." *Genes & Development* **14**(3): 328-38.
- Nasmyth, K. (1993). "Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase." *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 166-179.
- Nasmyth, K. (2001). "Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis." *Annu Rev Genet* **35**: 673-745.
- Nasmyth, K., Peters, J. M. and Uhlmann, F. (2000). "Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids." *Science* **288**(5470): 1379-85.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. and Wittinghofer, A. (1995). "The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue." *Nature* **375**(6532): 554-60.
- Nebreda, A., Gannon, J. and Hunt, T. (1995). "Newly synthesized protein(s) must associate with p34^{cdc2} to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes." *EMBO Journal* **14**(22): 5597-5607.
- Nebreda, A. R. and Hunt, T. (1993). "The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs." *EMBO Journal* **12**(5): 1979-1986.
- Nebreda, A. R., Porras, A. and Santos, E. (1993). "p21ras-induced meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in the absence of protein synthesis - MPF activation is preceded by activation of MAP and S6 kinases." *Oncogene* **8**: 467-477.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 21-32.
- Nishimoto, S. and Nishida, E. (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." *EMBO Rep* **7**(8): 782-6.
- Nishiyama, A., Tachibana, K., Igarashi, Y., Yasuda, H., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ohsumi, K. and Kishimoto, T. (2000). "A nonproteolytic function of the proteasome is required for the dissociation of Cdc2 and cyclin B at the end of M phase." *Genes Dev* **14**(18): 2344-57.
- Nishiyama, T., Ohsumi, K. and Kishimoto, T. (2007). "Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cyostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs." *Nature* **446**(7139): 1096-9.

- Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. and Sagata, N. (1992). "The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes." *EMBO Journal* **11**(7): 2433-46.
- Norbury, C., Blow, J. and Nurse, P. (1991). "Regulatory phosphorylation of the p34^{cdc2} protein kinase in vertebrates." *EMBO Journal* **10**(11): 3321-3329.
- Ohsumi, K., Koyanagi, A., Yamamoto, T. M., Gotoh, T. and Kishimoto, T. (2004). "Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytosstatic factor arrest." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12531-6.
- Okamoto, K., Nakajo, N. and Sagata, N. (2002). "The existence of two distinct Wee1 isoforms in *Xenopus*: implications for the developmental regulation of the cell cycle." *Embo J* **21**(10): 2472-84.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K. and Kishimoto, T. (2002). "Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition." *Nat Cell Biol* **4**(2): 111-6.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K. and Kishimoto, T. (1992). "Relocation and distinct subcellular localization of p34^{cdc2}-cyclin-B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes." *EMBO Journal* **11**: 1763-1772.
- Oskarsson, M., McClements, W. L., Blair, D. G., Maizel, J. V. and Vande Woude, G. F. (1980). "Properties of a normal mouse cell DNA sequence (src) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus." *Science* **207**(4436): 1222-4.
- Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C. T., Walker, E. H., Hawkins, P. T., Stephens, L., Eccleston, J. F. and Williams, R. L. (2000). "Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma." *Cell* **103**(6): 931-43.
- Palmer, A., Gavin, A. C. and Nebreda, A. R. (1998). "A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase myt1 [In Process Citation]." *Embo J* **17**(17): 5037-47.
- 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 p34^{cdc2} in a wee1⁺ dependent manner." *EMBO Journal* **10**(5): 1255-1263.
- Parker, L. L., Atherton-fessler, S. and Piwnica-worms, H. (1992). "P107(wee1) is a dual-specificity kinase that phosphorylates-p34(cdc2) on tyrosine-15." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2917-2921.
- Parker, L. L. and Piwnica-Worms, H. (1992). "Inactivation of the p34^{cdc2}-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase." *Science* **257**(5078): 1955-1957.
- Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G. and Piwnicaworms, H. (1993). "Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor wee1 by the nim1/cdr1 kinase." *Nature* **363**: 736-738.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Pelpel, K., Leibovitch, M., Fernandez, A. and Leibovitch, S. A. (2000). "Mutation of MyoD-Ser237 abolishes its up-regulation by c-Mos." *FEBS Lett* **474**(2-3): 233-7.
- 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**(3): 197-208.
- Perdiguero, E., Pillaire, M. J., Bodart, J. F., Hennesdorf, F., Frodin, M., Duesbery, N. S., Alonso, G. and Nebreda, A. R. (2003). "Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C." *Embo J* **22**(21): 5746-56.
- Perez-Mongiovi, D., Beckhelling, C., Chang, P., Ford, C. C. and Houliston, E. (2000). "Nuclei and microtubule asters stimulate maturation/M phase promoting factor (MPF) activation in *Xenopus* eggs and egg cytoplasmic extracts." *J Cell Biol* **150**(5): 963-74.
- Peter, M., Castro, A., Lorca, T., Le Peuch, C., Magnaghi-Jaulin, L., Doree, M. and Labbe, J. C. (2001). "The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes." *Nat Cell Biol* **3**(1): 83-7.
- Peter, M., Labbe, J. C., Doree, M. and Mandart, E. (2002). "A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK." *Development* **129**(9): 2129-39.
- Peters, J. M. (2002). "The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond." *Mol Cell* **9**(5): 931-43.
- Pfleger, C. M. and Kirschner, M. W. (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." *Genes Dev* **14**(6): 655-65.
- Picard, A., Labbe, J.-C., Barakat, H., Cavadore, J.-C. and Doree, M. (1991). "Okadaic acid mimics a nuclear component required for cyclin B-cdc2 kinase microinjection to drive starfish oocytes into M phase." *J. Cell Biol.* **115**: 337-344.

- Pines, J. and Hunter, T. (1991). "Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport." *J. Cell Biol.* **115**: 1-17.
- Poon, R. Y. C., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T. and Shuttleworth, J. (1993). "The cdc2-related protein p40(mo15) is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33(cdk2) and p34(cdc2)." *EMBO Journal* **12**: 3123-3132.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. A. (1993). "Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro." *Mol. Cell Biol.* **13**(4): 2546-2553.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A. (2002). "Interactions between Ras1, dMyc, and dPI3K signaling in the developing *Drosophila* wing." *Genes Dev* **16**(17): 2286-99.
- Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C. and Maller, J. L. (1998a). "Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*." *Mol Cell Biol* **18**(7): 4262-71.
- Qian, Y. W., Erikson, E. and Maller, J. L. (1998b). "Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1." *Science* **282**(5394): 1701-4.
- Qian, Y. W., Erikson, E. and Maller, J. L. (1999). "Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1." *Mol Cell Biol* **19**(12): 8625-32.
- Reimann, J. D., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J. M. and Jackson, P. K. (2001). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." *Cell* **105**(5): 645-55.
- Reimann, J. D. and Jackson, P. K. (2002). "Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs." *Nature* **416**(6883): 850-4.
- Rempel, R. E., Sleight, S. B. and Maller, J. L. (1995). "Maternal *Xenopus* Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase." *Journal of Biological Chemistry* **270**(12): 6843-6855.
- Repasky, G. A., Chenette, E. J. and Der, C. J. (2004). "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" *Trends Cell Biol* **14**(11): 639-47.
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K. and Sharma, S. C. (2002). "Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization." *Recent Prog Horm Res* **57**: 195-220.
- Rime, H., Huchon, D., Jesus, C., Goris, J., Merlevede, W. and Ozon, R. (1990). "Characterization of MPF activation by okadaic acid in *Xenopus* oocyte." *Cell Differentiation and Development* **29**(1): 47-58.
- Rime, H., Talbi, N., Popoff, M. R., Suziedelis, K., Jesus, C. and Ozon, R. (1998). "Inhibition of small G proteins by clostridium sordellii lethal toxin activates cdc2 and MAP kinase in *xenopus* oocytes." *Dev Biol* **204**(2): 592-602.
- Rime, H., Yang, J., Jesus, C. and Ozon, R. (1991). "MPF is activated in growing immature *Xenopus* oocytes in the absence of detectable tyrosine dephosphorylation of P34cdc2." *Experimental Cell Research* **196**(2): 241-5.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. and Downward, J. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." *Nature* **370**(6490): 527-32.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. and Downward, J. (1996). "Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation." *Embo J* **15**(10): 2442-51.
- Roy, L. M., Haccard, O., Izumi, T., Lattes, B. G., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L. (1996). "Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus*." *Oncogene* **12**(10): 2203-2211.
- Roy, L. M., Swenson, K. I., Walker, D. H., Gabrielli, B. G., Li, R. S., Piwnicka-Worms, H. and Maller, J. L. (1991). "Activation of p34^{cdc2} kinase by cyclin A." *J. Cell. Biol.* **113**(3): 507-514.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987). "Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog." *Cell* **49**(4): 559-67.
- Sadler, K. C. and Ruderman, J. V. (1998). "Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes." *Dev Biol* **197**(1): 25-38.
- Sadler, S. E. (1991). "Inhibitors of phosphodiesterase-III block stimulation of *Xenopus-laevis* oocyte ribosomal S6-kinase activity by insulin-like growth factor-I." *Mol. Endocrinol.* **5**: 1947-1954.
- Sadler, S. E. and Maller, J. L. (1981). "Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein." *J. Biol. Chem.* **256**(12): 6368-73.
- Sadler, S. E. and Maller, J. L. (1983). "Inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase by progesterone and 2', 5'-dideoxyadenosine is associated with slowing of guanine nucleotide exchange." *J. Biol. Chem.* **258**: 7935-7941.
- Sadler, S. E. and Maller, J. L. (1987). "In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1." *J. Biol. Chem.* **262**(22): 10644-50.

- Sadler, S. E. and Maller, J. L. (1989). "A similar pool of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes is stimulated by insulin, insulin-like growth factor 1, and [Val12,Thr59]Ha-ras protein." *J. Biol. Chem.* **264**(2): 856-61.
- Sadler, S. E., Schechter, A. L., Tabin, C. J. and Maller, J. L. (1986). "Antibodies to the ras gene product inhibit adenylate cyclase and accelerate progesterone-induced cell division in *Xenopus laevis* oocytes." *Mol. Cell. Biol.* **6**(2): 719-22.
- Sagata, N. (1997). "What does Mos do in oocytes and somatic cells?" *Bioessays* **19**(1): 13-21.
- Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S. D. and Vande Woude, G. F. (1989a). "The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation." *Science* **245**(4918): 643-6.
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. and Vande Woude, G. F. (1988). "Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." *Nature* **335**(6190): 519-525.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F. and Ikawa, Y. (1989b). "The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs." *Nature* **342**(6249): 512-8.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-101.
- Schmidt, A., Duncan, P. I., Rauh, N. R., Sauer, G., Fry, A. M., Nigg, E. A. and Mayer, T. U. (2005). "Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity." *Genes Dev* **19**(4): 502-13.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." *Genes Dev* **16**(13): 1587-609.
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A. and Mayer, T. U. (2006). "Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1213-8.
- Schorderet-slatkine, S. (1972). "Action of progesterone and related steroids on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. An *in vitro* study." *Cell Differ.* **1**: 179-189.
- Sharrocks, A. D., Yang, S. H. and Galanis, A. (2000). "Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases." *Trends Biochem Sci* **25**(9): 448-53.
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. and Der, C. J. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." *Trends Cell Biol* **10**(4): 147-54.
- Solomon, M. J., Lee, T. and Kirschner, M. W. (1992). "Role of phosphorylation in p34^{cdc2} activation - Identification of an activating kinase." *Molecular Biology of the Cell* **3**: 13-27.
- Spevak, W., Keiper, B. D., Stratowa, C. and Castanon, M. J. (1993). "*Saccharomyces-cerevisiae* cdc15 mutants arrested at a late stage in anaphase are rescued by xenopus cdnas encoding n-ras or a protein with beta-transducin repeats." *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4953-4966.
- Spindler, B., Mastroberardino, L., Custer, M. and Verrey, F. (1997). "Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia." *Pflugers Arch* **434**(3): 323-331.
- Stacey, D. W., Roudebush, M., Day, R., Mosser, S. D., Gibbs, J. B. and Feig, L. A. (1991). "Dominant inhibitory Ras mutants demonstrate the requirement for Ras activity in the action of tyrosine kinase oncogenes." *Oncogene* **6**(12): 2297-304.
- Stambolic, V. and Woodgett, J. R. (2006). "Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration." *Trends Cell Biol* **16**(9): 461-6.
- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. and Hancock, J. F. (1994). "Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane." *Science* **264**(5164): 1463-1467.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A. and Peters, J. M. (2002). "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase." *Mol Cell* **9**(3): 515-25.
- Symons, M. (1996). "Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond." *Trends Biochem Sci* **21**(5): 178-81.
- Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T. and Kishimoto, T. (2000). "c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14301-6.
- Taieb, F., Thibier, C. and Jessus, C. (1997). "On cyclins, oocytes, and eggs." *Mol Reprod Dev* **48**(3): 397-411.
- Taieb, F. E., Gross, S. D., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L. (2001). "Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes." *Curr Biol* **11**(7): 508-13.
- Takahashi, K., Mitsui, K. and Yamanaka, S. (2003). "Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells." *Nature* **423**(6939): 541-5.
- Tang, Z. H., Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1993). "Two distinct mechanisms for negative regulation of the weel protein kinase." *EMBO Journal* **12**: 3427-3436.
- Tanoue, T., Yamamoto, T. and Nishida, E. (2002). "Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases." *J Biol Chem* **277**(25): 22942-9.
- Thibier, C., De Smedt, V., Poulhe, R., Huchon, D., Jessus, C. and Ozon, R. (1997). "In vivo regulation of cytostatic activity in *Xenopus* metaphase II- arrested oocytes." *Dev Biol* **185**(1): 55-66.

- Tian, J., Kim, S., Heilig, E. and Ruderman, J. V. (2000). "Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14358-63.
- Tokumoto, M., Nagahama, Y., Thomas, P. and Tokumoto, T. (2006). "Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation." Gen Comp Endocrinol **145**(1): 101-8.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." EMBO Rep **3**(4): 341-8.
- Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 205-15.
- Tso, J., Thibier, C., Mulner, O. and Ozon, R. (1982). "Microinjected progesterone reinitiates meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(18): 5552-6.
- Tunquist, B. J., Eysers, P. A., Chen, L. G., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L. (2003). "Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytotstatic factor-mediated metaphase arrest." J Cell Biol **163**(6): 1231-42.
- Tunquist, B. J. and Maller, J. L. (2003). "Under arrest: cytotstatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs." Genes Dev **17**(6): 683-710.
- Tunquist, B. J., Schwab, M. S., Chen, L. G. and Maller, J. L. (2002). "The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytotstatic factor." Curr Biol **12**(12): 1027-33.
- Uhlmann, F. (2003). "Chromosome cohesion and separation: from men and molecules." Curr Biol **13**(3): R104-14.
- Urano, T., Emkey, R. and Feig, L. A. (1996). "Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation." Embo J **15**(4): 810-6.
- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-76.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. and Waterfield, M. D. (2001). "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." Annu Rev Biochem **70**: 535-602.
- Verde, F., Berrez, J. M., Antony, C. and Karsenti, E. (1991). "Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein." J. Cell Biol. **112**: 1177-1187.
- Verde, F., Labbe, J., Doree, M. and Karsenti, E. (1990). "Regulation of microtubules dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs." Nature **343**: 233-238.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J. and Maro, B. (1996). "Mos Is Required For Map Kinase Activation and Is Involved In Microtubule Organization During Meiotic Maturation In the Mouse." Development **122**(3): 815-822.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. and Cooper, J. A. (1993). "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." Cell **74**(1): 205-14.
- Vorlaufer, E. and Peters, J. M. (1998). "Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis [In Process Citation]." Mol Biol Cell **9**(7): 1817-31.
- Wang, R., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Ashorn, C. L., Gallick, G. E., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W. and Kuang, J. (2007). "Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition." Cell **128**(6): 1119-32.
- Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N., Lichenstein, H. S., Zukowski, M. and Yao, Z. (1997). "Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(38): 23668-74.
- Warne, P. H., Vician, P. R. and Downward, J. (1993). "Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro." Nature **364**(6435): 352-5.
- Wasserman, W. J. and Masui, Y. (1975). "Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." Exp. Cell Res. **91**: 381-388.
- Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T. and Osada, H. (2005). "Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11663-8.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T. and Osada, H. (2004). "M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4419-24.
- Watanabe, N., Broome, M. and Hunter, T. (1995). "Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle." Embo J **14**(9): 1878-91.
- Weber, A., Langhanki, L., Sommerer, F., Markwarth, A., Wittekind, C. and Tannapfel, A. (2003). "Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck." Oncogene **22**(30): 4757-9.

- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-85.
- Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A. and Hunter, T. (1999). "The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression." J Cell Sci **112** (Pt 19): 3361-71.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005). "The Ras superfamily at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 5): 843-6.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. (2002). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 14-21.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. (2007). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Cell Biol.
- White, M. A., Nicolette, C., Minden, A., Polverino, A., Van Aelst, L., Karin, M. and Wigler, M. H. (1995). "Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation." Cell **80**(4): 533-41.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (1998). "Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals." Trends Biochem Sci **23**(12): 481-5.
- Whitmire, E., Khan, B. and Coue, M. (2002). "Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes." Nature **419**(6908): 722-5.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
- Wittmann T, Hyman A, Desai A. (2001) "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. " Nat Cell Biol. (1):E28-34. Review.
- Wolthuis, R. M. and Bos, J. L. (1999). "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 112-7.
- Wolthuis, R. M., de Ruiter, N. D., Cool, R. H. and Bos, J. L. (1997). "Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf." Embo J **16**(22): 6748-61.
- Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F., Moen, T. C. and Bos, J. L. (1998). "Ras-dependent activation of the small GTPase Ral." Curr Biol **8**(8): 471-4.
- Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M. and Blenis, J. (1992). "Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases - map kinase, raf-1, and rsk." Cell **68**: 1041-1050.
- Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T. and Feig, L. A. (1997). "An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1." J Biol Chem **272**(50): 31230-4.
- Yamamoto, T. M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K. and Kishimoto, T. (2005). "APC/C-Cdc20-mediated degradation of cyclin B participates in CSF arrest in unfertilized *Xenopus* eggs." Dev Biol **279**(2): 345-55.
- Yamano, H., Tsurumi, C., Gannon, J. and Hunt, T. (1998). "The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor." Embo J **17**(19): 5670-8.
- Yang, J., Bardes, E. S., 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**(14): 2131-43.
- 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**(8): 2174-83.
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D. and Whitmarsh, A. J. (2003a). "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades." Gene **320**: 3-21.
- Yang, W. H., Lutz, L. B. and Hammes, S. R. (2003b). "Xenopus laevis ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in *Xenopus* ovarian androgen production." J Biol Chem **278**(11): 9552-9.
- Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H. and Raynal, P. (2002). "A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid." J Biol Chem **277**(24): 21167-78.
- Zhou, G., Bao, Z. Q. and Dixon, J. E. (1995). "Components of a new human protein kinase signal transduction pathway." J Biol Chem **270**(21): 12665-9.
- Zhu, L., Ohan, N., Agazie, Y., Cummings, C., Farah, S. and Liu, X. J. (1998). "Molecular cloning and characterization of *Xenopus* insulin-like growth factor-1 receptor: Its role in mediating insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation and expression during embryogenesis." Endocrinology **139**(3): 949-954.
- Zhu, Y., Bond, J. and Thomas, P. (2003a). "Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2237-42.
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. and Thomas, P. (2003b). "Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2231-6.