



HAL
open science

Contrôle de l'entrée en division méiotique par les enzymes PKA et PP2A, et leur substrat Arpp19

Tom Lemonnier

► **To cite this version:**

Tom Lemonnier. Contrôle de l'entrée en division méiotique par les enzymes PKA et PP2A, et leur substrat Arpp19. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS569 . tel-03246766

HAL Id: tel-03246766

<https://theses.hal.science/tel-03246766>

Submitted on 2 Jun 2021

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.

Sorbonne Université

ED515 – Complexité du vivant

UMR7622-Laboratoire de biologie du développement / Biologie de l'ovocyte

Thèse de doctorat de biologie cellulaire

Contrôle de l'entrée en division méiotique par les enzymes PKA et PP2A, et leur substrat Arpp19

Par **Tom Lemonnier**

Dirigée par Aude Dupré

Présentée et soutenue publiquement le 05/12/2019

Devant un jury composé de :

Dr Claude Prigent	Rapporteur
Dr Lionel Pintard	Rapporteur
Dr Evelyn Houliston	Examinatrice
Pr Sophie Louvet	Examinatrice
Dr Thierry Lorca	Examineur
Dr Aude Dupré	Directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Claude Prigent et Dr Lionel Pintard, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et remercier également mes examinateurs, Dr Evelyn Houliston, Pr Sophie Louvet et Dr Thierry Lorca pour avoir accepté de l'évaluer.

Un grand merci à Catherine Jessus pour m'avoir accepté dans son équipe pour cette thèse. Son amour et sa vision des Sciences ont été pour moi une grande source d'inspiration et de motivation, m'ayant conduit à souhaiter poursuivre mes recherches en post-doctorat.

Un merci tout particulier à ma directrice de thèse, Aude Dupré, sans qui tout ce qui est présenté dans ce manuscrit n'aurait pas été possible. Merci d'avoir conçu ce projet, de m'avoir fait confiance pour le mener à bien et de m'avoir fait comprendre que la Science ne se fait pas seul mais en équipe. Merci de m'avoir fait rentrer dans la tête l'importance de tous les contrôles et d'avoir essayé de m'apprendre la réalisation de Tris-Tricine de qualité. Désolé d'avoir souvent mis le désordre sur ta paillasse. Merci pour ces « brain storming » aux Arènes, la Science se fait aussi avec un cerveau détendu. Tu remercieras Quitterie qui m'a rappelé à l'ordre pour me dire que je devais bosser.

Un énorme merci à tous les membres de l'équipe « Biologie de l'ovocyte ». Merci Robert pour vos purifications magnifiques et votre immense patience, pour vos discussions enflammées et pour votre humour constant. Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans votre présence. Le « GC » vous salue bien bas. Merci Tran d'avoir bien accepté de partager ta paillasse avec moi. Contrairement à ce que je n'ai pas arrêté de te dire, tu ne prends pas tant de place que ça. Merci à Sandrine et Mélanie pour ne pas m'avoir laissé la possibilité d'oublier comment bien mesurer le pH d'une solution. Merci à Jean-Christophe, Marika et Rozenn pour votre bienveillance et vos conseils avisés. Une petite pensée à Julianne qui m'a bien aidé pendant les dosages. Enfin, un grand merci à M. Ozon qui m'a permis de pousser toujours plus loin mes réflexions et appris à ne pas tirer de conclusions trop hâtives.

J'aimerai aussi remercier l'équipe « Signalisation et morphogenèse » sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. En particulier, Muriel et Ronan. Muriel pour m'avoir accepté en stage de M1, moi qui ne voulais pas faire de recherche. Ronan pour m'avoir poussé à continuer, pour m'avoir pris en stage de M2 et pour avoir été là pendant les coups durs. Je n'en serais pas là si tu ne m'avais pas fait confiance.

Merci à tous mes camarades et amis doctorants, encore présents ou déjà loin. Dans le mauvais ordre : Mafalda, Camille, Inès, Pénélope D., Jennifer, Antoine, Julie, Pauline, Dylana, Pénélope T., Alexis (oui, tu fais partie du ce groupe pour moi) et tous les autres que je n'oublie pas. Merci pour ces 5 années partagées avec vous.

Merci à tous mes amis qui ne sont pas dans le domaine de la biologie pour votre soutien quotidien. Particulièrement à Claire et Quentin qui m'ont supporté durant les derniers instants de la rédaction et qui m'ont permis d'en venir à bout..

Enfin, un grand merci à ma famille qui a cru en moi dès le début de mes aventures et de m'avoir remis, parfois, dans le droit chemin... entre deux ou trois médiateurs...

...Merci

Résumé

Ma thèse a visé à comprendre comment la cellule germinale femelle, ou ovocyte, reprend la division méiotique. Dans tout le règne animal, l'ovocyte est bloqué en prophase de première division méiotique et reprend la division au moment de l'ovulation, sous l'effet d'un signal externe, le progestérone chez le xénope. Cette hormone déclenche une voie de signalisation qui aboutit après 3 à 5 heures à l'activation de la kinase Cdk1. Les premières molécules activées de Cdk1 déclenchent une boucle d'auto-amplification permettant son activation totale et l'entrée en division. Cette boucle repose sur des phosphorylations catalysées par Cdk1 et ne fonctionne que si la phosphatase qui contrecarre son activité, PP2A-B55δ, est inhibée. Cette inhibition dépend de la protéine Arpp19, un inhibiteur spécifique de PP2A-B55δ quand elle est phosphorylée sur la S67 par la kinase Greatwall.

Arpp19 a un second rôle lors de la reprise de la méiose. Chez tous les vertébrés, l'arrêt en prophase est maintenu par une forte activité de PKA. Chez le xénope, Arpp19 est phosphorylée par PKA sur un résidu distinct de celui ciblé par Greatwall, la S109. En réponse à la progestérone, l'inhibition de PKA provoque la déphosphorylation d'Arpp19, ce qui permet d'enclencher la voie de signalisation conduisant à l'activation de Cdk1. Une phosphatase est donc requise pour déphosphoryler Arpp19 sur S109 et lever le verrou exercé sur l'activation de Cdk1 en prophase.

Mon travail a visé à élucider l'identité moléculaire de cette phosphatase inconnue. Par des approches de biochimie et protéomique, j'ai identifié cette phosphatase comme étant PP2A-B55δ. Par des approches fonctionnelles dans des extraits acellulaires et des ovocytes, j'ai établi que PP2A-B55δ est active en prophase. La phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 dépend d'une balance entre les activités de PKA et PP2A-B55δ, en faveur de la kinase. En réponse à la progestérone, l'activité de PP2A-B55δ n'est pas affectée et l'inhibition de PKA suffit à la déphosphorylation d'Arpp19. PP2A-B55δ orchestre donc la levée de l'arrêt en prophase et l'entrée en phase M en agissant à deux périodes et sur deux sites distincts d'Arpp19, respectivement ciblés par PKA et Greatwall.

Abstract

My thesis aimed at understanding how the female germ cell, or oocyte, resume meiotic divisions. In the animal kingdom, the oocyte is blocked in prophase of the first meiotic division and resumes the division at time of ovulation, in response to an external signal, progesterone in *Xenopus*. This hormone triggers a signalling pathway that leads to the activation of the Cdk1 kinase after 3 to 5 hours. The first activated molecules of Cdk1 trigger a self-amplification loop allowing its total activation and division. This loop is based on phosphorylations catalyzed by Cdk1 and depends on the inhibition of the phosphatase that antagonizes Cdk1 activity, PP2A-B55δ. This inhibition depends on the protein Arpp19, a specific inhibitor of PP2A-B55δ when phosphorylated at S67 by Greatwall kinase.

Arpp19 has a second role during meiosis resumption. In all vertebrates, the prophase arrest is maintained by high PKA activity. In *Xenopus*, Arpp19 is phosphorylated by PKA on a residue distinct from Greatwall target, S109. In response to progesterone, the inhibition of PKA induces Arpp19 dephosphorylation, which activates the signalling pathway leading to Cdk1 activation. A phosphatase is therefore required to dephosphorylate Arpp19 at S109 and to unlock the Cdk1 activation pathway.

My work aimed at elucidating the molecular identity of this unknown phosphatase. Through biochemical and proteomic approaches, I have identified this phosphatase as PP2A-B55δ. By functional approaches in acellular extracts and oocytes, I have established that PP2A-B55δ is active in prophase. Arpp19 phosphorylation at S109 depends on a balance between PKA and PP2A-B55δ activities, in favor of the kinase. In response to progesterone, PP2A-B55δ activity is not affected and PKA inhibition is sufficient for Arpp19 dephosphorylation. PP2A-B55δ therefore orchestrates the release of the prophase arrest and the entry into M-phase by acting at two different periods and at two distinct residues in Arpp19, respectively facing PKA and Greatwall.

Liste des abréviations

AC : Adénylate Cyclase
AMPc : cyclic adenosine monophosphate
APC : Anaphase Promoting Complexe
Arpp19 : cAMP-regulated phosphoprotein
BubR1 : Budding unhibited by benzamidazole
CAK : CDK activating kinase
CaMKII : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
CaN : Calcineurine
Cdc : cell division cycle
Cdh1 : Cdc20 homolog 1
CDK : Cyclin dependent kinase
Chk : Checkpoint kinase
CHX : Cycloheximide
CKI : CDK inhibitor
CSF : Cytostatic factor
D-box : destruction box
Erp1 : Emi1-related protein 1
ENSA : Endosulfine
FPLC : Fast pressure liquid chromatography
GMPc : cyclic guanosine monophosphate
GPR3 :G-protein coupled receptor 3
GVBD : Germinal Vesicle Breakdown
Greatwall : Greatwall
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
KAP : Cdk activating kinase
Mad : Mitotic arrest defect
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MCC : Mitotic checkpoint complex
MEK : MAPK kinase
MI : Meiosis I
MII : Meiosis II
MPF : M-phase Promoting Factor
Myt1 : Membrane associated tyrosine and threonine 1
NEBD : Nuclear envelop breakdown
AO : Acide okadaïque
p90^{Rsk} : p90 ribosomal S6 kinase
PDE : Phosphodiesterase
Pg : Progestérone
PIP : PP1-interacting protein
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKI : PKA inhibitor
PP1 : Protein phosphatase 1

PP2A :Protein phosphatase 2A
PP2C : Protein phosphatase 2C
PPP : Phosphoprotein phosphatase
PLP : PP2A-like phosphatase
Ringo : Rapid inducer of G2/M in oocyte
STP : Sérine/threonine phosphatase
SAC : Spindle assembly checkpoint
SCF : Skp, Cullin, F-box containing complex

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Le cycle cellulaire

Figure 2 : La mitose

Figure 3 : Régulation de l'activité du complexe Cdk1-Cycline B

Figure 4 : PP2A est trimère composé d'une sous-unité catalytique C, d'une sous-unité structurale A et d'une sous-unité régulatrice B

Figure 5 : Le signal déclencheur de l'activation des complexes Cdk1-Cycline B lors de la transition G2/M

Figure 6 : La phosphorylation des substrats mitotiques

Figure 7 : La régulation de l'APC/C lors de la transition métaphase/anaphase

Figure 8 : La sortie de phase-M dépend de la déphosphorylation ordonnée des substrats mitotiques

Figure 9 : Contrôle moléculaire de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope

Figure 10 : AMPc, PKA et l'arrêt en prophase

Figure 11 : La chute des niveaux intracellulaires en AMPc et l'inhibition de PKA sont les deux événements nécessaires pour activer Cdk1 en réponse à la progestérone

Figure 12 : Rôle de la synthèse protéique dans l'activation initiale de Cdk1

Figure 13 : La boucle d'auto-amplification de l'activité de Cdk1

Figure 14 : Erp1 et l'arrêt CSF

Figure 15 : Arpp19 et la division cellulaire

Figure 16 : Mécanisme d'inhibition de PP2A-B55 par Greatwall et Arpp19

Figure 17 : La déphosphorylation d'Arpp19 sur S109 est critique pour activer Cdk1 dans l'ovocyte de xénope

Figure 18 : La double fonction d'Arpp19 dans la maturation méiotique

Figure 19 : Arpp19 et PP2A-B55 δ , deux acteurs critiques de la maturation méiotique

Figure 20 : La surexpression des sous-unités B55 δ et B56 γ ont des effets opposés sur la reprise de la méiose

Figure 21 : Mécanismes intracellulaires sous le contrôle d'Arpp19 phosphorylée sur la S109 ou déphosphorylée

Figure 22 : Arpp19-S109 phosphorylée sur la S109 empêcherait l'inhibition de PP2A-B55 δ

Figure 23 : Arpp19 phosphorylée sur la S109, un inhibiteur de la traduction ?

Tableau 1 : Effet des différents phospho-mutants d'Arpp19 sur la reprise de la méiose de l'ovocyte de xénope

Table des matières

I. Introduction : Cycle cellulaire et division	3
A. LES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE	3
1. <i>L'interphase</i>	3
2. <i>La phase-M de division cellulaire</i>	5
B. COORDINATION DES DIFFERENTES PHASES	7
1. <i>Complexes Cdk-Cycline : chefs d'orchestre du cycle cellulaire</i>	8
a) La famille des CDKs	8
b) Les différents complexes CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire.....	8
2. <i>Les mécanismes de surveillance</i>	9
C. LES DIVISIONS MEIOTIQUES DE L'OVOCYTE.....	9
II. Les kinases et les phosphatases de la phase-M	11
A. CDK1, KINASE PIVOT DE LA PHASE-M	11
1. <i>Structure de Cdk1</i>	12
2. <i>Régulation de l'activité Cdk1</i>	12
a) L'association aux Cyclines	12
b) La phosphorylation activatrice	14
c) Les phosphorylations inhibitrices	15
i. Les kinases Wee1/Myt1.....	16
ii. Les phosphatases Cdc25s.....	16
B. LES PHOSPHATASES ET LE CONTROLE DE LA PHASE-M.....	17
1. <i>Les tyrosines phosphatases</i>	17
2. <i>Les sérine/thréonine phosphatases</i>	18
a) PP1.....	18
b) PP2A.....	19
c) PP4 et PP6	21
C. CONTROLE MOLECULAIRE DE LA PHASE-M.....	23
1. <i>L'entrée en phase-M</i>	23
a) Activation des complexes Cdk1-Cycline B.....	23
i. L'équilibre Wee1/myt1 et Cdc25.....	23
ii. Greatwall et PP2A-B55δ	24
iii. Le signal déclencheur de l'entrée en phase-M	25
b) La phosphorylation des substrats mitotiques	27
2. <i>La sortie de phase-M</i>	30
a) Les dégradations protéiques	30
i. Cyclines, séparation des chromosomes et APC/C.....	31
ii. La régulation de l'APC/C.....	31
b) La déphosphorylation des substrats mitotiques	32
III. La division méiotique ovocytaire	37
A. LA MATURATION MEIOTIQUE DE L'OVOCYTE	37
1. <i>Évènements structuraux de la maturation méiotique</i>	37
2. <i>MPF et CSF, les deux activités qui rythment la maturation méiotique</i>	39
B. L'ARRÊT EN PROPHASE I.....	39
1. <i>État de Cdk1 et de ses régulateurs en prophase</i>	39
2. <i>Le verrou AMPc-PKA</i>	40
C. LA REPRISE DE LA MEIOSE	43
1. <i>Les signaux déclencheurs de la reprise de la méiose</i>	43
2. <i>La signalisation ovocytaire responsable de la reprise de la méiose</i>	45
a) La chute de l'AMPc et l'inhibition de PKA.....	45
b) La synthèse de nouvelles protéines critiques pour l'activation de Cdk1.....	49
i. Les Cyclines	49
ii. Mos.....	50
iii. RINGO/Speedy	51
iv. Deux protéines, deux voies fonctionnellement redondantes	53
3. <i>Mécanisme d'activation de Cdk1 en deux étapes</i>	53

a)	L'activation initiale de Cdk1	54
i.	L'inhibition de Myt1	55
ii.	Cdc25 : PKA et Plx1	56
b)	L'auto-amplification de Cdk1	57
i.	Régulation de Cdc25	58
ii.	Myt1	60
iii.	Inhibition de PP2A-B55 δ par Greatwall	60
D.	LA TRANSITION MI-MII ET L'ARRET CSF	61
1.	<i>La transition MI-MII</i>	61
2.	<i>Arrêt en métaphase II et fécondation</i>	63

IV. Arpp19, au cœur de la décision cellulaire d'entrer en division..66

A.	LA FAMILLE DES ENDOSULFINES	66
1.	<i>Découverte, expression et localisation</i>	66
2.	<i>Structure et sites de phosphorylation des Endosulfines</i>	67
B.	FONCTIONS DES ENDOSULFINES.....	69
1.	<i>Cycle cellulaire</i>	69
2.	<i>Entrée en quiescence</i>	71
3.	<i>Modèles post-mitotiques</i>	71
C.	ARPP19 ET LA MATURATION MEIOTIQUE	72
1.	<i>Les phosphorylations d'Arpp19 sur la S109 et la S67 en prophase et lors de la reprise de la méiose</i> <i>72</i>	
2.	<i>Analyse fonctionnelle des phosphorylations dans l'ovocyte</i>	74
a)	La phosphorylation par PKA	74
b)	La phosphorylation par Greatwall.....	76
c)	La phosphorylation par Cdk1.....	77
3.	<i>Arpp19 et l'activation de Cdk1 dans l'ovocyte de xénope</i>	78

V. Identification de la phosphatase qui cible Arpp19 lors de la reprise de la méiose.....80

A.	LES PHOSPHATASES DANS L'OVOCYTE DE XENOPE	80
B.	RESULTATS	81
1.	<i>La phosphorylation S109, un équilibre entre PKA et PPS109 en prophase</i>	81
2.	<i>PPS109 correspond à PP2A-B55</i>	82
a)	Identification de PPS109.....	82
b)	Validation de l'identité de PPS109 in vitro et in vivo	82
3.	<i>L'activité de PP2A-B55 n'est pas régulée par la progestérone dans les étapes précoces de reprise de la méiose</i>	83
C.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	84
1.	<i>PP2A-B55α/δ versus PP2A-B56</i>	86
a)	In vitro et en extraits	86
b)	B55 et B56, quelle contribution dans l'ovocyte ?	88
2.	<i>L'équilibre PKA/PP2A-B55α/δ en prophase</i>	91
3.	<i>Quels mécanismes sous le contrôle d'Arpp19 ?</i>	92
a)	Arpp19 phosphorylée par PKA peut-elle réguler l'activité de PP2A-B55 α / δ ?	92
b)	Arpp19 et la synthèse protéique	94
c)	Arpp19 et la localisation intracellulaire des acteurs de Cdk1	96

Bibliographie138

I. Introduction : Cycle cellulaire et division

Tous les organismes vivants se développent, se renouvellent et se reproduisent grâce à la division de leurs cellules. La division cellulaire mitotique (mitose) est organisée au sein d'un cycle dont la fonction est de coordonner les deux événements cruciaux à la reproduction cellulaire : la phase de synthèse d'ADN ou réplication (phase-S) lors de l'interphase puis la séparation physique de la cellule mère en deux cellules filles lors de la phase-M. Dans le vivant, la mitose sous-tend la reproduction asexuée et conduit à la multiplication dite « clonale » des cellules somatiques. Les cellules germinales, ovocytes et spermatozoïdes, se divisent selon un mode de division qui leur est spécifique, la méiose. Ce second mode de division cellulaire assure la formation de cellules haploïdes aptes à la fécondation et se trouve ainsi à la base de la reproduction sexuée des eucaryotes.

A. Les différentes phases du cycle

Le cycle cellulaire est divisé en deux phases : l'interphase et la phase-M. L'interphase correspond à une phase de croissance pendant laquelle la cellule synthétise l'ensemble des composants nécessaires à son fonctionnement (organites, ARNs, ribosomes, protéines). Elle est elle-même subdivisée en trois phases : la phase-G1 (G pour « Gap »), la phase-S et la phase-G2 (Figure 1).

1. L'interphase

L'interphase s'organise autour d'une phase-S encadrée par les phases G1 et G2. Lors de la phase-S, les chromosomes, porteurs de l'information génétique, sont dupliqués en deux chromatides sœurs maintenues attachées en vue de leur transmission dans les deux cellules filles à l'issue de la phase-M. Outre la réplication de l'ADN, la phase-S prépare également la cellule aux grands bouleversements architecturaux qui interviendront lors de la phase-M avec, notamment, la duplication du centrosome. Le centrosome est l'un des principaux centres de nucléation des microtubules et est constitué de deux centrioles et de matériel péricentriolaire. En interphase, le réseau microtubulaire irradie à partir du centrosome, situé contre le noyau, vers la périphérie de la cellule. Lors de la phase-S, le centrosome est dupliqué permettant la formation des deux futurs pôles du fuseau de division.

Les phases G1 et G2 préparent la cellule à entrer dans la phase suivante et vérifient que la phase précédente s'est déroulée correctement grâce à des mécanismes de rétrocontrôle.

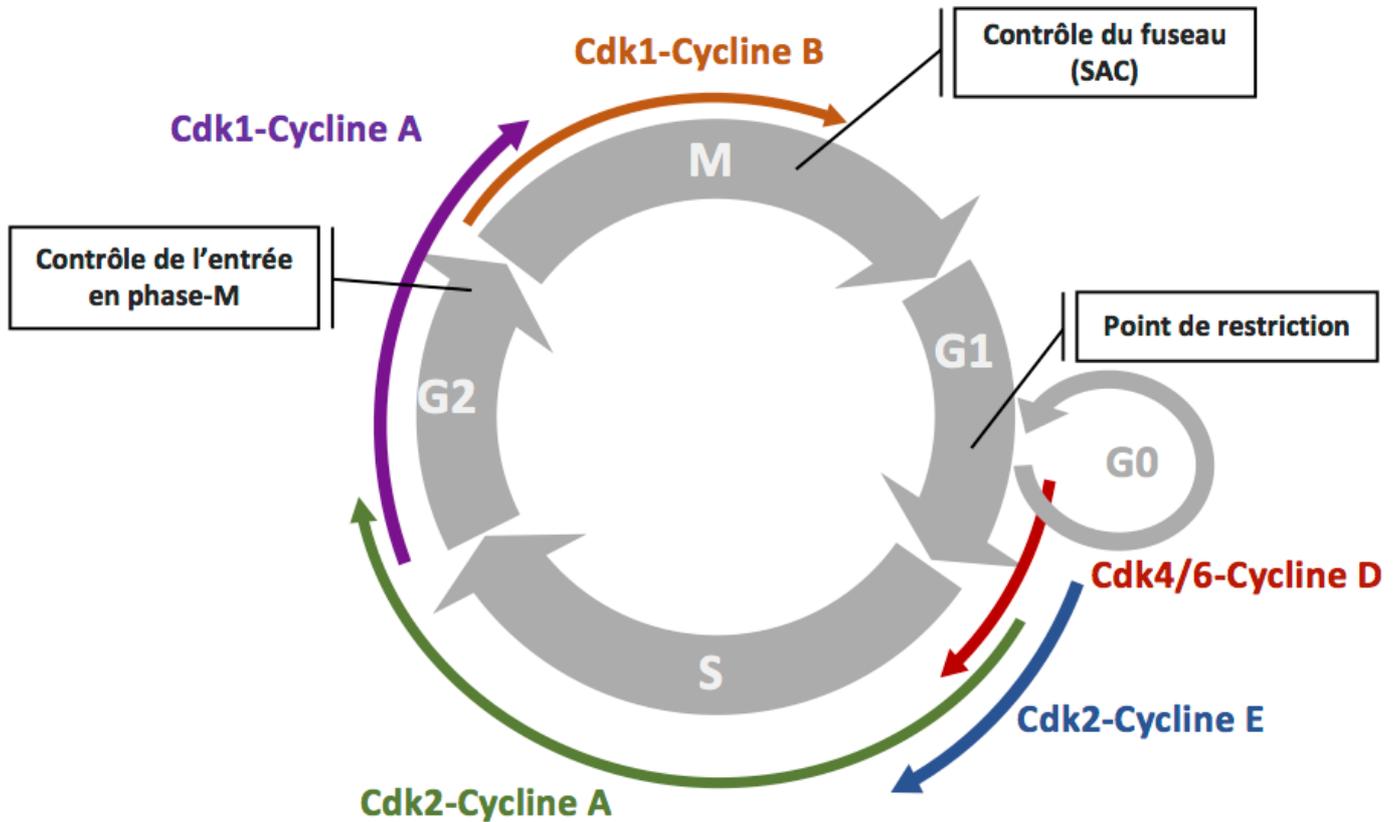


Figure 1 : Le Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire mitotique est composé de 4 phases distinctes : la phase de synthèse de l'ADN (phase-S), la phase de division physique de la cellule (phase-M) et deux phases intermédiaires, dites « Gap », préparant la cellule pour les phases suivantes (G1 et G2). La progression ordonnée dans le cycle est contrôlée par différents moteurs moléculaires, les complexes CDK-Cycline, et par des mécanismes de surveillance qui vérifient le bon déroulement des différentes phases. Le point de restriction est actif en phase-G1. L'entrée en phase-M est contrôlée lors de la phase-G2 et la sortie de phase-M est conditionnée par le point de contrôle du fuseau ou SAC pour Spindle-Assembly Checkpoint.

Lors de la phase-G1, la cellule détermine si les conditions nutritives et environnementales sont favorables pour son entrée irréversible dans un nouveau cycle cellulaire et organise la survenue de la phase-S. En phase-G2, la cellule vérifie l'intégrité et la réplication totale de l'ADN et met en place les différents processus cellulaires qui seront requis pour sa division. La phase-G2 permet donc de surveiller la dynamique des événements intervenus lors de la phase-S et de s'assurer de sa bonne synchronisation avec la phase-M.

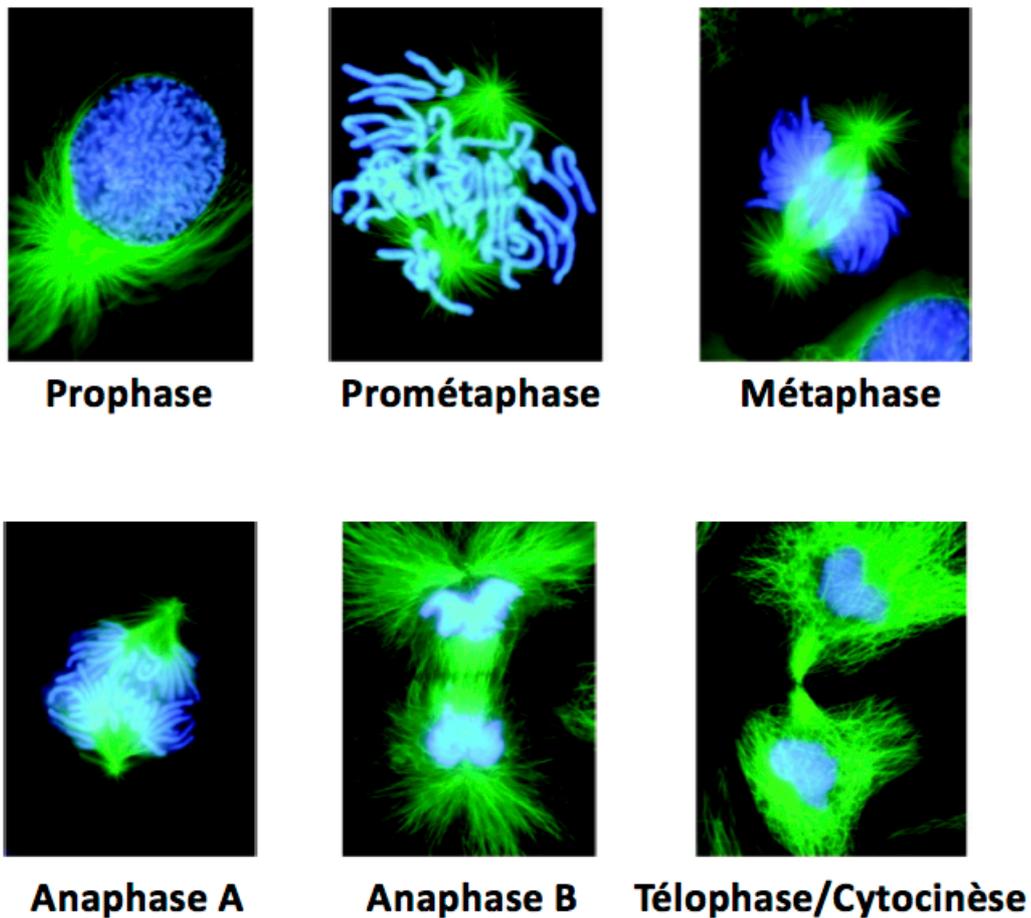
Lorsque les conditions environnementales ou physiologiques ne sont pas propices à la prolifération ou à la survie, la cellule peut entrer en quiescence ou phase-G0. Cette décision est prise en sortie de phase-M, juste avant la transition G1/S. En phase-G0, les cellules ne répliquent plus leur matériel biologique et ne se divisent plus. Seules les fonctions biologiques et métaboliques requises pour sa survie sont assurées. Lorsque les conditions redeviennent favorables, la cellule peut alors se réengager dans le cycle cellulaire ou lancer un programme de différenciation. Si les conditions ne sont pas favorables, elle initie un processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose.

La durée de chaque phase du cycle est à peu près constante au sein d'un même type cellulaire mais varie entre organismes et types cellulaires. Ainsi, après la fécondation, les cellules embryonnaires se multiplient avec une synchronicité et une rapidité remarquables en alternant phase-S et phase-M en absence de phases G1 et G2.

2. La phase-M de division cellulaire

La phase-M correspond à la division physique de la cellule mère en deux cellules filles. Comme décrit précédemment, deux types de division cellulaire coexistent dans le mode vivant : la mitose et la méiose. Bien que les objectifs de la mitose et de la méiose soient distincts, production de deux cellules filles génétiquement identiques *versus* formation de gamètes fécondables génétiquement différents, ces deux modes de division cellulaire ont des étapes et des mécanismes de contrôle en commun. Certains de ces mécanismes ont été adaptés pour assurer les spécificités de la division cellulaire méiotique, en particulier la séparation des chromosomes homologues et l'absence de phase-S intercalaire.

Sur la base d'observations cytologiques, la mitose est classiquement divisée en quatre phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 2). En prophase, les chromosomes se condensent et s'individualisent. L'attachement le long des bras des chromatides sœurs disparaît et seul l'appariement au niveau des centromères est conservé. Ce processus s'accompagne de la formation des kinétochores qui permettront lors de la mitose d'attacher les chromosomes aux microtubules du fuseau de division. Les deux centrosomes



D'après Rieder et Kodjakov, 2003

Figure 2 : La mitose

La mitose est divisée en 4 grandes phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télaphase. Lors de la prophase, les chromosomes se condensent et s'individualisent. Après la rupture de l'enveloppe nucléaire, la cellule entre en métaphase. Les chromosomes sont attachés aux microtubules du fuseau par leur kinétochores (prométaphase) puis s'alignent sur la plaque équatoriale. En anaphase, les chromatides sœurs sont ségrégués vers les deux pôles du fuseau (anaphase A) puis les deux pôles s'éloignent (anaphase B). La séparation physique des deux cellules filles débute en télaphase et se termine par la cytokinèse pendant laquelle les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme.

Bleu : ADN ; vert : microtubules

migrent de part et d'autre du noyau, préfigurant les deux pôles du futur fuseau de division. En début de métaphase, ou prométaphase, l'enveloppe nucléaire se rompt et les membranes cellulaires internes, Golgi et réticulum endoplasmique, se fragmentent en vésicules. Les microtubules se réorganisent sous la forme de trois réseaux microtubulaires : les microtubules kinétochoriens (assurent la liaison centromères/pôle du fuseau), interpolaire (entre les deux pôles pour maintenir la bipolarité) et astraux (émanant du pôle du fuseau vers le cortex cellulaire où ils vont s'ancrer) pour former le fuseau de division bipolaire. Les premiers chromosomes sont alors capturés par des microtubules et se mettent à osciller sur le plan médian du fuseau d'un pôle à l'autre. Une fois que tous les chromosomes sont correctement attachés de manière bipolaire, ils s'alignent au niveau de la plaque équatoriale du fuseau. La cellule est alors en métaphase. L'anaphase débute avec la perte de la cohésion centromérique et la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens. Les chromatides sœurs sont ainsi séparées et migrent vers les pôles opposés de la cellule (anaphase A). Les pôles du fuseau s'éloignent ensuite l'un de l'autre grâce à la polymérisation des microtubules interpolaire (anaphase B). La membrane plasmique commence à s'invaginer au niveau du plan équatorial, prélude au sillon de division. Lorsque les chromatides ont atteint les pôles du fuseau, la télophase marque le début de la division physique des deux cellules filles. Les chromosomes se décondensent. L'enveloppe nucléaire se reforme autour des deux lots de chromosomes et le sillon de division se contracte pour la cytokinèse.

B. Coordination des différentes phases

Pour assurer la formation et la viabilité des deux cellules filles, les différentes phases du cycle mitotique s'enchaînent selon un ordre strict et irréversible : G1, S, G2 puis M. Cet ordre est déterminé par deux mécanismes intracellulaires qui assurent la parfaite synchronisation des différentes phases les unes aux autres : les activités CDKs (Cyclines-dependent kinases) et les mécanismes de surveillance ou rétrocontrôles. Les CDKs sont les moteurs principaux du cycle cellulaire et à chaque phase est associée une ou deux CDKs. En agissant l'une après l'autre, elles permettent la réalisation des différentes phases de manière ordonnée (Figure 1). Les mécanismes de surveillance vérifient le bon déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire, et lorsqu'un défaut est détecté, bloquent sa progression en inhibant l'activité des CDKs et lancent des systèmes de réparation. Ils coordonnent ainsi les différentes phases les unes aux autres pour maintenir la stabilité du génome.

1. Complexes Cdk-Cycline : chefs d'orchestre du cycle cellulaire

a) La famille des CDKs

Les CDKs sont des sérine/thréonine kinases très conservées au cours de l'évolution agissant sous la forme de complexes protéiques associés à une sous-unité régulatrice, la Cycline. Si de nombreuses CDKs ont été identifiées chez les eucaryotes, toutes ne régulent pas le cycle cellulaire. Ainsi, chez la levure, six différentes CDKs sont connues (Malumbres, 2014) mais seules Cdc28 chez *S. cerevisiae* et Cdc2 chez *S. pombe*, les homologues de Cdk1 des eucaryotes supérieurs, sont nécessaires et suffisantes pour la progression dans le cycle cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, une vingtaine de CDKs ont été mises en évidence et présentent donc une diversité de fonction bien plus grande (Cao *et al.*, 2014). Certaines sont directement impliquées dans l'avancée du cycle cellulaire : Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6 et Cdk7, alors que d'autres contrôlent des processus biologiques spécifiques tels que la transcription ou la différenciation d'un type tissulaire particulier.

b) Les différents complexes CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire

L'enchaînement des phases au cours du cycle cellulaire dépend de l'association successive de différentes CDKs à différentes Cyclines qui sont souvent spécifiques à une CDK donnée (Nasmyth, 1993). En début de phase G1, la cellule est dépourvue de Cycline. Si les conditions nutritives et environnementales sont favorables à sa prolifération, des signaux extracellulaires initient la synthèse de Cycline D qui s'associe à Cdk4 et/ou Cdk6, les complexes Cdk4-Cycline D et Cdk6-Cycline D présentant des activités redondantes. Ces néo-complexes Cdk4/6-Cycline D lancent la transcription des gènes requis pour la phase-S, en particulier celle de la Cycline E puis de la Cycline A (Weinberg, 1995). Les complexes Cdk2-Cycline E orchestrent l'entrée en phase-S. Les complexes Cdk2-Cycline A assurent la réplication de l'ADN et déclenchent simultanément la transcription de la Cycline B. En phase-G2, la Cycline A puis la Cycline B s'associent à Cdk1, les complexes Cdk1-Cycline B étant maintenus inactifs. Quand les mécanismes de surveillance ont achevé de contrôler la qualité de l'ADN répliqué, les complexes Cdk1-Cycline B sont activés et déclenchent l'entrée puis la progression dans la phase-M. En fin de métaphase, les complexes Cdk1 sont progressivement inactivés pour permettre la sortie de la phase-M et le retour en interphase (Figure 1).

2. Les mécanismes de surveillance

Les mécanismes de surveillance interviennent à trois moments clés du cycle cellulaire : en phase-G1, en phase-G2 et en métaphase. En phase-G1, le point « R » (pour restriction) chez les eucaryotes supérieurs ou START chez la levure contrôle les conditions environnementales, la taille et la composition cellulaire, ce qui détermine si la cellule peut s'engager dans un nouveau cycle. En phase-G2, la réplication et l'intégrité de l'ADN sont contrôlées. En métaphase, le point de contrôle du fuseau (ou SAC pour Spindle-Assembly Checkpoint) vérifie l'attachement bilatéral des chromosomes au fuseau mitotique. Ce rétrocontrôle prévient ainsi toute ségrégation asymétrique des chromatides, susceptible de générer des cellules-filles aneuploïdes. Enfin, certains de ces mécanismes sont activés tout au long du cycle cellulaire lorsque l'ADN est endommagé, en particulier avant, pendant et après la réplication de l'ADN.

Ces rétrocontrôles font intervenir des protéines « senseurs » qui détectent les anomalies et activent deux types de voies : l'une conduit à la réparation des anomalies et l'autre inhibe les complexes CDK-Cycline. Le cycle cellulaire est ainsi temporairement bloqué pour donner le temps de réparer l'anomalie détectée. Si les dommages sont trop importants, la cellule s'engage vers l'apoptose. Curieusement, certains types cellulaires sont dépourvus de ces points de surveillance, comme les premiers cycles embryonnaires qui suivent la fécondation.

C. Les divisions méiotiques de l'ovocyte

Contrairement à la mitose, les deux divisions méiotiques s'enchaînent en absence d'une phase-S intercalaire et la première division méiotique (méiose I) conduit à la séparation des paires de chromosomes homologues qui se sont appariés lors des premiers stades de la prophase I. Elle est dite réductionnelle. La seconde division méiotique (méiose II) est proche d'une mitose : elle sépare les chromatides sœurs, et est dite équationnelle. Ces deux particularités de la méiose, séparation des chromosomes homologues et absence de synthèse d'ADN, réduisent de moitié la ploïdie et conduisent à la formation de cellules haploïdes.

La division cellulaire méiotique est intégrée dans un processus de spécialisation des cellules germinales. Chez les femelles, la formation du gamète se fait lors de l'ovogénèse. Les cellules germinales femelles ou ovogonies colonisent les gonades embryonnaires et prolifèrent par mitose. Dans l'ovaire, cette prolifération perdure pendant toute la vie de l'individu à l'exception des mammifères où elle se limite à la vie fœtale. L'entrée en méiose est précédée par une longue phase-S dite pré-méiotique. Les ovogonies deviennent des ovocytes lors de l'entrée en prophase de 1^{ère} division méiotique (prophase I), une phase particulièrement longue et divisée en

différents stades : leptotène, zygotène, pachytène, siège des recombinaisons homologues, et diplotène auquel les cellules se bloquent. Les chromosomes homologues, partiellement décondensés, restent attachés entre eux par les chiasmas. L'arrêt en prophase est universel dans l'ensemble du règne animal et sa durée varie selon les espèces, allant de plusieurs semaines chez les invertébrés à plusieurs années chez les vertébrés (2-3 ans chez le xénope, 20 à 40 ans chez la femme). A l'exception des vivipares (les mammifères essentiellement), l'ovocyte subit pendant l'arrêt en prophase une phase de croissance phénoménale, la vitellogenèse, au cours de laquelle il accumule les ressources énergétiques, les protéines et les ARNm qui seront requis pour la reprise de la méiose et le développement de l'embryon après la fécondation. Au moment de l'ovulation, l'ovocyte bloqué en prophase I reprend la méiose sous l'effet de signaux hormonaux. Il achève la méiose I puis progresse en méiose II. Cette étape, appelée maturation méiotique, est la dernière étape de l'ovogénèse et sera plus amplement détaillée dans le chapitre III puisque mes travaux de thèse ont porté sur sa régulation.

II. Les kinases et les phosphatases de la phase-M

La régulation de la division cellulaire fait intervenir deux mécanismes majeurs indépendants de la transcription puisqu'éteinte pendant cette phase : le turn-over de régulateurs protéiques, qui repose sur leur synthèse et leur dégradation, et des modifications post-traductionnelles réversibles, en particulier les phosphorylations. Depuis la découverte de Cdk1 dans les années 1980, cette kinase a longtemps été considérée comme la clé de voûte de la division cellulaire, qu'elle soit mitotique et méiotique. Sous forme phosphorylée, les substrats de Cdk1 et des kinases qui se trouvent sous son contrôle orchestrent les événements structuraux nécessaires à la division de la cellule, de la rupture de l'enveloppe nucléaire à la formation et au fonctionnement du fuseau de division. Lors de la transition métaphase/anaphase, son activité chute pour permettre la ségrégation des chromosomes, la séparation physique des deux cellules-filles puis le retour en interphase de chacune d'entre elle. Ce modèle de régulation de la division cellulaire a été revisité dans les années 2010 avec la découverte que l'inactivation de Cdk1, bien que nécessaire à la sortie de la phase-M, n'est cependant pas suffisante pour le retour en interphase. En effet, les substrats phosphorylés en phase-M doivent être également déphosphorylés par des phosphatases en sortie de phase-M. Ces phosphatases ont longtemps été vues comme possédant une activité basale non régulée qui ne contrecarrait pas l'activité de Cdk1, estimée alors prédominante. Leur activité permettait alors la déphosphorylation des substrats quand Cdk1 était inactivée. Il est donc apparu que les phosphatases sont des acteurs régulés tout aussi cruciaux que Cdk1 pour le contrôle de la division cellulaire, Comme nous allons le voir dans ce chapitre, ces deux activités, phosphatases et kinases, sont intimement liées et leur régulation antagoniste est indispensable pour l'entrée et la sortie de phase-M.

A. Cdk1, kinase pivot de la phase-M

L'histoire de Cdk1 débute avec les travaux de Masui et Markert en 1971 qui découvrent un facteur doté d'une activité déclenchant la reprise de la division des ovocytes bloqués en prophase, blocage assimilé à un arrêt G2/M. Ils le nomment MPF pour M-phase Promoting Factor (Masui and Markert, 1971). L'identification moléculaire des protéines responsables de cette activité a été le fruit d'approches complémentaires de biochimie, de génétique, de biologie cellulaire (fusion cellulaire ou transfert de cytoplasme hétérologue chez la levure, l'étoile de mer, l'oursin, la grenouille, le xénope, les cellules humaines...). L'ensemble de ces approches

a établi que l'activité MPF est responsable de l'entrée en phase-M chez tous les eucaryotes et est portée par un hétérodimère composé de deux protéines : la kinase Cdk1 et une sous-unité régulatrice, la Cycline B (Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1990; Gautier *et al.*, 1988; Labbe *et al.*, 1989a; Labbe *et al.*, 1989b). Ces 20 années de découvertes ont également mis à jour les trois mécanismes principaux de contrôle de l'activité de Cdk1: (1) son association à une sous-unité régulatrice, la Cycline A ou la Cycline B, (2) une phosphorylation activatrice sur le résidu T161, et (3) deux phosphorylations inhibitrices sur T14 et Y15 lorsqu'elle est associée à la Cycline (Figure 3). Les CDKs peuvent également être inhibées par leur liaison à des protéines inhibitrices, les CKIs (CDK Inhibitor). Ces protéines régulent essentiellement la transition G1/S et interviennent en réponse aux dommages à l'ADN mais ne sont que peu fonctionnelles en tant que régulateurs de la phase-M. Elles ne seront donc pas abordées dans ce manuscrit.

1. Structure de Cdk1

L'analyse cristallographique de Cdk2 a permis de comprendre la structure tridimensionnelle des CDKs (Jeffrey *et al.*, 1995). Dans leur conformation inactive, ces protéines sont organisées en deux lobes : un petit lobe N-terminal et un grand lobe C-terminal. Le premier lobe possède la séquence caractéristique des CDKs, le motif PSTAIRE. Ces deux lobes sont connectés par une région flexible contenant le site de liaison de l'ATP, la P-loop, et une boucle d'activation, la T-loop, à proximité du site de phosphorylation, T160 de Cdk2 et T161 de Cdk1. Lorsque Cdk1 et Cdk2 sont inactives, la P-loop est bloquée par la T-loop. L'activation des CDKs se fait par des changements conformationnels de la T-loop puis de la P-loop qui permettent aux substrats des CDKs et à l'ATP d'accéder au site actif de la kinase.

2. Régulation de l'activité Cdk1

a) L'association aux Cyclines

La famille des Cyclines contient environ 30 membres qui possèdent tous une séquence caractéristique, la "Cycline box". Ils possèdent également des motifs de dégradation par le protéasome dont la D-box et la KEN-box et des séquences de localisation nucléaire et d'export nucléaire. Les Cyclines sont classées en trois groupes : le groupe I pour les Cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Cycline A, Cycline B, Cycline D, Cycline E), le groupe

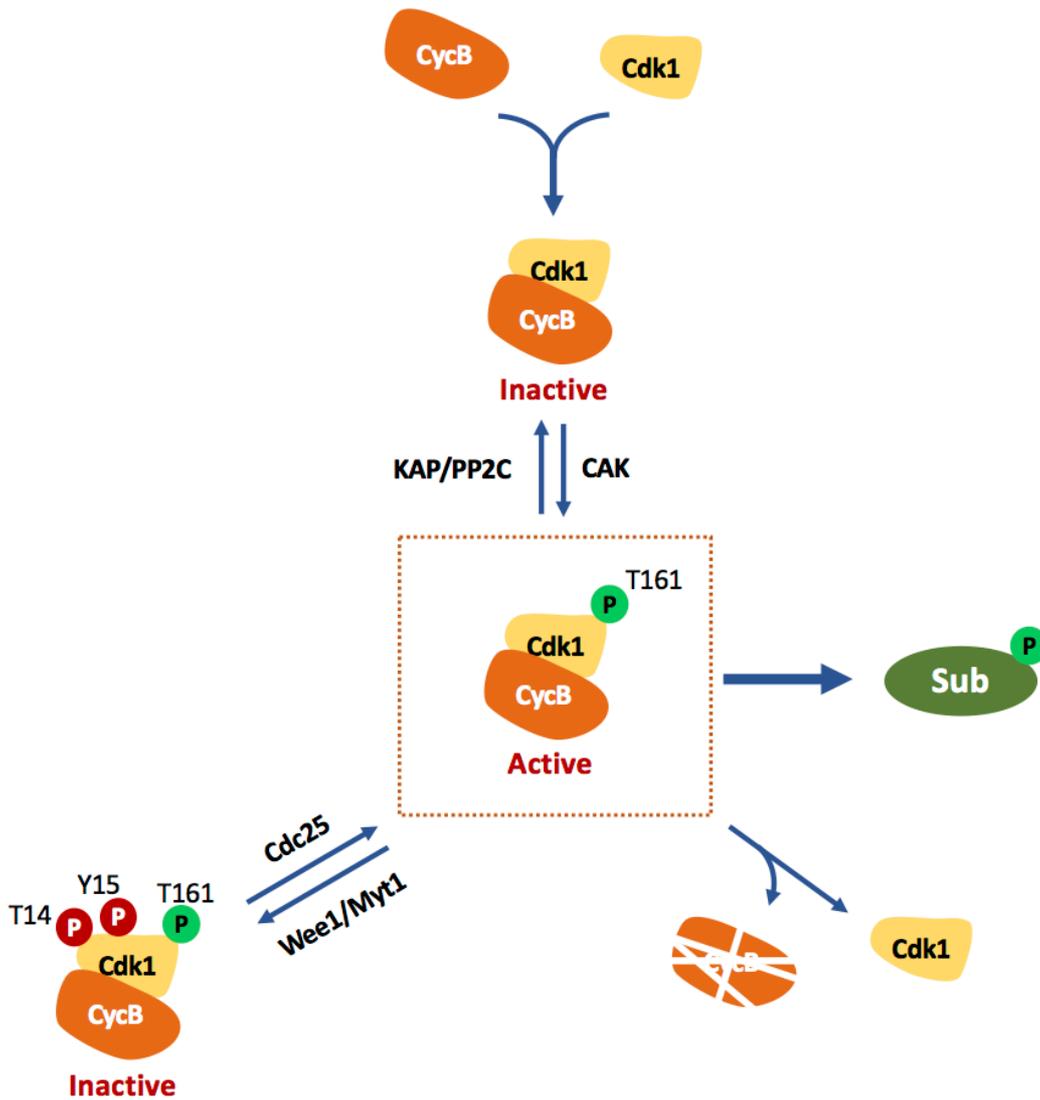


Figure 3 : Régulation de l'activité du complexe Cdk1-Cycline B

L'activité de Cdk1 est régulée par son interaction avec la Cycline B et par des mécanismes de phosphorylation qui cible les résidus T161, T14 et Y15 de Cdk1. La phosphorylation sur la T161 est activatrice et dépend de la balance d'activités entre la kinase CAK et les phosphatases KAP et PP2C. Les phosphorylations sur T14 et Y15 sont inhibitrices et sont catalysées par les kinases Wee1 et Myt1. Ces résidus sont déphosphorylés lors de la transition G2/M, suite à l'activation de la phosphatase Cdc25. Les complexes Cdk1-Cycline B sont alors actifs et phosphorylent les substrats mitotiques afin d'orchestrer l'entrée et la progression en mitose. En métaphase, les complexes Cdk1-Cycline B sont inactivés car les Cyclines mitotiques sont dégradées par le protéasome. CycB : Cycline B ; Sub : Substrats

II qui correspond principalement aux partenaires de Cdk5 et le groupe III qui représente les Cyclines impliquées dans la régulation de la transcription.

Cdk1 est exprimée de manière constante au cours du cycle cellulaire. Elle s'associe respectivement à la Cycline A de la phase-S à la prométaphase et aux Cyclines B qui s'accumulent progressivement de la fin de la phase-S jusqu'en début de mitose (Lindqvist *et al.*, 2009). L'accumulation des Cyclines B est contrôlée par des processus ciblant leur transcription et leur traduction. Leur stabilité et leur dégradation sont également très régulées, par l'E3 ubiquitine ligase APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) qui ubiquitine les Cyclines et les adresse au protéasome. L'APC/C est inhibé par phosphorylation sous le contrôle des complexes Cdk2-Cycline A dès la phase-S, ce qui évite la dégradation des Cyclines B pendant la phase-G2 (Yamano, 2019). L'association des Cyclines avec les CDKs fait intervenir la « Cycline box » et le motif PSTAIRE et provoque un premier changement conformationnel dans la CDK, qui libère la T-loop du site actif (Jeffrey *et al.*, 1995). La libération du site actif n'est cependant pas suffisante pour l'activation totale de Cdk1 et de Cdk2 *in vivo* et ces protéines doivent être phosphorylées sur un résidu activateur, respectivement T161 et T160 pour Cdk1 et Cdk2.

b) La phosphorylation activatrice

Le déplacement de la T-loop permet de libérer les résidus activateurs, T160 de Cdk2 et T161 de Cdk1, qui deviennent alors accessibles aux kinases responsables de leur phosphorylation, les CAKs (CDK activating kinases). Cette phosphorylation provoque un second changement conformationnel dans la sous-unité CDK et permet au substrat d'accéder au site actif et à la molécule d'ATP. Bien qu'essentielle pour l'activation de la grande majorité des CDKs, dont Cdk1 et Cdk2 (Connell-Crowley *et al.*, 1993; Ducommun *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992 ; Morgan, 1997), certains complexes échappent néanmoins à cette régulation. C'est le cas notamment des complexes Cdk7-Cycline H qui sont activés en absence de cette phosphorylation activatrice et de Cdk8 qui ne possède pas ce résidu dans sa séquence (Morgan, 1997).

Chez les eucaryotes supérieurs, la CAK est un trimère formé de Cdk7, de la Cycline H et de Mat1 (Ménage à trois 1) (Nigg, 1996). Cette CAK est exclusivement nucléaire et cible les CDKs spécifiquement impliqués dans le cycle cellulaire dont Cdk1 complexée aux Cyclines et Cdk2 qu'elle soit associée ou non aux Cyclines (Fisher and Morgan, 1994; Merrick *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 1992). Une seconde CAK cytoplasmique, Cak1 ou Civ1 (pour CAK *in vivo*), a

été caractérisée chez la levure et phosphoryle *in vivo* la forme monomérique de Cdc28 (Thuret *et al.*, 1996). Une activité cytoplasmique capable de phosphoryler Cdk1 monomérique sur T161 a été mise en évidence dans l'ovocyte de xénope et son identité moléculaire est inconnue (De Smedt *et al.*, 2002).

A l'opposé des activités CAKs, la KAP (CDK associated protein, aussi appelée Cdi1, pour Cyclin-dependent kinase inhibitor 1) et la phosphatase dépendante du Mg^{2+} , PP2C, sont les deux phosphatases qui déphosphorylent le résidu activateur de Cdk1 et Cdk2. KAP appartient à la famille des phosphatases à double spécificité, les DUSPs (Dual Specificity Phosphatases). Elle catalyse la déphosphorylation de Cdk1, Cdk2 et Cdk3 uniquement sous leur forme monomérique (Gyuris *et al.*, 1993; Hannon *et al.*, 1994). PP2C est la phosphatase principale ciblant l'équivalent T161 de Cdc28, Cdk1 et Cdk2/Cdk6 chez, respectivement, la levure, le xénope et l'homme (Cheng *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 1999; De Smedt *et al.*, 2002). La régulation des CAKs, de KAP et de PP2C au cours du cycle cellulaire reste encore mal comprise. Cependant, l'activité des CAKs étant constante, et la phosphorylation de l'équivalent T161 se mettant en place dès que les complexes entre CDKs et Cyclines se forment, les complexes Cdk1-Cycline B sont donc activables dès leur apparition en fin de phase-S et auraient le potentiel de provoquer l'entrée en mitose de manière prématurée si un mécanisme inhibiteur n'était pas simultanément mis en place.

c) Les phosphorylations inhibitrices

De fait, simultanément à la phosphorylation activatrice, les complexes Cdk1-Cycline B sont inhibés par phosphorylation de Cdk1 sur Y15 chez la levure et T14 et Y15 chez les eucaryotes supérieurs (Gould and Nurse, 1989; Krek and Nigg, 1991; Norbury *et al.*, 1991). Ces résidus sont localisés au niveau du site de liaison de l'ATP et ne sont exposés au milieu intracellulaire qu'en présence de Cyclines, ce qui rend leur phosphorylation dépendante de l'association CDKs-Cyclines (Morgan, 1997). La phosphorylation de ces résidus dépend de la balance d'activités entre les kinases de la famille Wee1/Myt1 et les phosphatases à double-spécificité Cdc25. La régulation opposée de Wee1/Myt1 et de Cdc25 permet aux complexes Cdk1-Cycline B d'être inhibés en interphase puis déphosphorylés et donc actifs lors de la transition G2/M.

i. Les kinases Wee1/Myt1

Wee1 est la première kinase ciblant Y15 à avoir été caractérisée chez la levure et dans des extraits de xénope (McGowan and Russell, 1993; Mueller *et al.*, 1995b; Parker *et al.*, 1992; Parker and Piwnicka-Worms, 1992). Chez les eucaryotes supérieurs, la phosphorylation de T14 et de Y15 fait intervenir une seconde kinase, Myt1 (Booher *et al.*, 1997; Fattaey and Booher, 1997; Liu *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1995b). Cette kinase a été identifiée dans des extraits de xénope et correspond à une protéine membranaire associée au réticulum endoplasmique (Kornbluth *et al.*, 1994; Mueller *et al.*, 1995b). Elle est retrouvée chez de nombreuses espèces (homme, souris, étoile de mer, drosophile, *C. elegans* et xénope) et semble impliquée dans la transition G2/M des cellules germinales mâles et femelles ainsi que dans les cellules en prolifération (Burrows *et al.*, 2006; Cornwell *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999b; Okumura *et al.*, 2002). Wee1 et Myt1 phosphorylent leur substrat lors de son association avec la Cycline B et ne reconnaissent pas sa forme monomérique. En l'absence d'activité de Cdc25, Wee1 et Myt1 phosphorylent et inactivent Cdk1 tout au long de la phase-G2 au fur et à mesure que la Cycline B s'accumule. Les complexes Cdk2-Cycline A ne seraient pas de bons substrats de Wee1 et Myt1, expliquant leur activité en phase-S.

ii. Les phosphatases Cdc25s

En phase-G2, Cdc25 est inactive. Son activation est requise pour déclencher la phase-M. Chez les mammifères, trois isoformes de Cdc25 ont été caractérisées : Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C. Ces phosphatases ont des profils d'expression variables selon le type cellulaire et la phase du cycle et présentent des localisations intracellulaires distinctes tout au long du cycle cellulaire. Il a donc été initialement proposé que ces enzymes possèdent des spécificités de substrats différentes vis à vis des différents complexes CDKs-Cyclines et interviennent chacune à certaines phases du cycle cellulaire. Ainsi, Cdc25A est exprimée en fin de G1 jusqu'en fin de phase-M où elle est dégradée. Elle serait impliquée dans la transition G1/S et la progression en phase-S en agissant sur les complexes Cdk2-Cycline E et Cdk2-Cycline A (Hoffmann *et al.*, 1994; Jinno *et al.*, 1994). A noter que les phosphorylations inhibitrices de Cdk2-Cycline E et Cdk2-Cycline A ne sont observées que dans des contextes de mise en place d'un checkpoint, et non pas lors d'un cycle physiologique, pour stopper le cycle en cas d'anomalie. La régulation de la phase-S ne repose donc pas sur un contrôle par phosphorylation inhibitrice de Cdk2 mais sur la transcription des Cyclines A et E. Cdc25B s'accumule en phase-S et son niveau d'expression devient maximal en fin de phase-G2. Cette phosphatase est cytoplasmique et

participerait à l'activation des complexes Cdk1-Cycline B localisés au niveau des centrosomes lors de la transition G2/M (Jackman *et al.*, 2003). Enfin, Cdc25C présente une expression constante tout au long du cycle cellulaire. Elle est cytoplasmique en interphase et est délocalisée dans le noyau en début de mitose. Cette isoforme est considérée comme celle qui régule l'activité des complexes Cdk1-Cycline B en mitose. Elle serait l'homologue fonctionnel de l'unique forme de Cdc25 présente chez les non-mammaliens (les trois isoformes du xénope sont issues de duplications récentes du même gène, et ne sont pas les homologues des Cdc25A-C de mammifère). Son invalidation chez *S. pombe*, dans des extraits de xénope et dans les cellules humaines bloque l'entrée en phase-M (Boutros *et al.*, 2006; Donzelli *et al.*, 2002; Gould and Nurse, 1989; Millar *et al.*, 1991a; Millar *et al.*, 1991b). Cependant, un certain degré de redondance fonctionnelle existe entre les différentes Cdc25 mammaliennes, comme en atteste le knock-out de Cdc25B et de Cdc25C chez la souris (Chen *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2005). Les embryons ne présentent pas de retard de croissance et la progression des cellules dérivées de ces embryons dans le cycle cellulaire est normale (Chen *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2005). Cdc25A est donc capable de compenser la perte de fonction de Cdc25B et Cdc25C au cours du cycle cellulaire. La suite du manuscrit sera consacrée à l'activité mitotique de Cdc25.

B. Les phosphatases et le contrôle de la phase-M

Les phosphatases qui antagonisent les kinases, jouent un double rôle prédominant dans le contrôle de la division cellulaire. Certaines étant responsables de la déphosphorylation des substrats mitotiques, leur activité s'oppose donc à l'entrée en phase-M et participe au retour en interphase. En outre, certaines phosphatases, distinctes de Cdc25, participent indirectement à l'activation de Cdk1. Le génome humain contient 189 gènes qui codent pour des phosphatases (Chen *et al.*, 2017). Ces phosphatases sont classées en trois grandes familles : les Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs), qui déphosphorylent les résidus tyrosines, les Sérine/Thréonine Phosphatases (STPs) qui déphosphorylent les résidus sérines et thréonines, et les Dual Specificity Phosphatases (DUSPs) capables de déphosphoryler les trois résidus. Les principales phosphatases impliquées dans le contrôle de la division, mitotique ou méiotique, appartiennent à la famille des STPs, en particulier PP1 et PP2A.

1. Les tyrosines phosphatases

Les PTPs agissent sous la forme d'enzymes monomériques dont le site actif est caractérisé par une séquence consensus HCX₅R (Bollu *et al.*, 2017). Ces PTPs ont été

subdivisées en plusieurs sous-familles sur la base de leur localisation intracellulaire, de leur spécificité de substrat et de leur fonction. La localisation intracellulaire a permis de classer les PTPs en deux groupes : les Récepteurs de type PTP localisés à la membrane plasmique et les PTPs cytoplasmiques. Sur la base de leur spécificité de substrat, on distingue également deux sous-familles : les CTSPs (classical tyrosine-specific phosphatases), qui ciblent spécifiquement les résidus tyrosine phosphorylés, et les phosphatases à double spécificité (DUSPs), qui ciblent les sérines, thréonines et tyrosines phosphorylées. Les PTPs régulent les grandes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération comme les voies Ras/MEK/MAPK et Pi3K/Akt et participent aux processus oncogéniques en réponse aux facteurs de croissance. Seules KAP, Cdc25 et Cdc14 chez la levure qui appartiennent toutes à la famille des DUSPs sont connues pour réguler l'entrée et la sortie de phase-M (Wurzenberger and Gerlich, 2011).

2. Les sérine/thréonine phosphatases

Les STPs sont divisées en trois familles : les PPPs (PhosphoProtein Phosphatases), les PPMs (Protein Phosphatase Metal-dependent) et les HADs (HaloAcid Dehydrogenases). De ces trois familles, les PPPs sont les principaux régulateurs de la division cellulaire, avec cependant PP2C qui appartient aux PPMs.

La famille des PPPs regroupe les phosphatases PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 et PP7. A l'inverse des PTPs, ces phosphatases agissent sous la forme de complexes multimériques, ou holoenzymes, composés d'une sous-unité catalytique associée à des sous-unités régulatrices et/ou structurales. Les sous-unités catalytiques des PPPs possèdent des domaines catalytiques extrêmement proches qui ne présentent qu'une faible spécificité de substrat *in vitro*. Dans un contexte physiologique, la spécificité de substrat de la sous-unité catalytique est déterminée par son association à différentes sous-unités régulatrices, capables de réguler également la localisation intracellulaire des différentes PPPs. En raison du grand nombre de sous-unités régulatrices et des multiples isoformes exprimées pour chacune des sous-unités chez les vertébrés notamment, cette combinatoire est à l'origine de centaines d'holoenzymes différentes. Parmi tous ces complexes, les isoformes de PP1 et PP2A sont responsables de 80% des activités de déphosphorylation lors de la division cellulaire et ont été les plus étudiées.

a) PP1

PP1 est un bon exemple illustrant la complexité de la régulation des PPPs chez les vertébrés. Il existe quatre isoformes pour la sous-unité catalytique de PP1 (PP1c) : PP1 α , β , γ 1

et γ_2 , ces deux dernières étant exprimées spécifiquement dans les testicules. La spécificité de substrat ainsi que la localisation cellulaire des PP1c sont régulées par leur association à des protéines régulatrices, les PIPs (PP1-interacting proteins). Les PIPs possèdent des domaines non structurés, une caractéristique retrouvée dans de nombreux inhibiteurs des PPPs. Ils interagissent avec PP1c par l'intermédiaire de motifs bien caractérisés, les domaines SLiMs (short linear motifs) de 4 à 10 acides aminés, dont le motif RVxF présent dans plus de 70% des PIPs connues. Chez les eucaryotes, plus de 200 PIPs ont été décrits à ce jour, produisant ainsi une grande diversité d'holoenzymes PP1-PIP présentant chacune une spécificité de substrat et une régulation particulière. La régulation par les PIPs influe sur l'adressage des substrats à l'enzyme, la localisation cellulaire ou inhibe directement l'activité de PP1c en agissant comme des pseudo-substrats (Brautigan and Shenolikar, 2018; Hendrickx *et al.*, 2009). Enfin, l'activité de PP1c est directement régulée par phosphorylation sur T320 (Dohadwala 1994, Kown 1997, Liu 1999). Ce résidu est déphosphorylé par PP1c elle-même et phosphorylé par Cdk1 et Cdk2 au cours du cycle cellulaire. Cette phosphorylation inhibe l'activité de PP1 (Dohadwala *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999a).

b) PP2A

PP2A est un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique (PP2A-C), d'une sous-unité structurale (PP2A-A) et d'une sous-unité régulatrice (PP2A-B) (Figure 4). Chez les eucaryotes supérieurs, PP2A-C est exprimée sous deux isoformes, α et β , qui présentent 97% d'homologie de séquence. Chez les vertébrés, il existe 16 sous-unités PP2A-B réparties en 4 sous-familles : B/B55 (PR55) avec 4 isoformes (α , β , γ , δ), B'/B56 (PR61) avec 5 isoformes (α , β , γ , δ , ϵ), B''/B72 avec 4 isoformes et B'''/Striatin avec 3 isoformes (Nasa and Kettenbach, 2018). La plupart de ces différentes isoformes sont cependant spécifiques aux vertébrés, en particulier pour les sous-unités B55 et B56 (Booker and DeLong, 2017).

PP2A-C sous forme monomérique n'a pas d'activité phosphatase. Pour être active, elle s'associe à PP2A-A par l'intermédiaire de motifs répétés en tandem HEAT (huntingtin-elongation-A subunit target of rapamycin) présents chez PP2A-A. Le dimère PP2A-A/C constitue le cœur de l'enzyme mais son activité est très peu spécifique. La spécificité de substrat ainsi que la localisation intracellulaire sont déterminées par l'association d'une sous-unité régulatrice au dimère. Cette association implique particulièrement PP2A-A et l'extrémité C-terminale de PP2A-C, qui possède une séquence très conservée entre les résidus 304 et 309, le motif TPDYL, qui stabilise l'holoenzyme (Janssens *et al.*, 2008). Ce motif est soumis à

plusieurs modifications post-traductionnelles qui, selon la sous-unité régulatrice concernée, sont nécessaires ou non à la formation du trimère. En particulier, la méthylation de la L309 est requise pour l'interaction de PP2A-A/C avec B55 alors qu'elle est sans effet sur l'association aux autres sous-unités régulatrices. A l'inverse, la phosphorylation des résidus T304 et Y307 déstabilise la formation de l'holoenzyme PP2A-B55 en faveur de PP2A-B56 et de PP2A-B72. Si ces modifications sont importantes pour la formation et la régulation de l'activité de PP2A *in vivo*, elles ne semblent pas nécessaires *in vitro* (Ikehara *et al.*, 2007; Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2007).

La reconnaissance des substrats qui sont déphosphorylés par PP2A fait intervenir différents motifs consensus. Ces motifs sont spécifiques à certains isoformes de PP2A et ont été récemment identifiés par des approches *in silico*, bioinformatique et de protéomique. Il semble donc maintenant possible de prédire sur la base de la séquence l'ensemble des substrats qui seront déphosphorylés par une phosphatase donnée au cours du cycle. Ainsi, les sous-unités B56 reconnaissent le motif SLiMs "LxxIxE", alors que B55 cible préférentiellement des substrats arborant de part et d'autre du résidu à déphosphoryler des motifs polybasiques chargés positivement (Cundell *et al.*, 2016; Hertz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). De plus, la phosphorylation de résidus adjacents à ces motifs peut augmenter la liaison de PP2A au substrat, contrôlant ainsi les interactions entre phosphatases et substrats localement et temporellement. Par exemple, PP2A-B56 interagit au niveau des kinétochores avec la protéine du SAC, BubR1, car son motif LxxIxE est uniquement phosphorylé dans les molécules de BubR1 localisées à cet endroit (Elowe *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2013). Enfin, certains sites de liaison pour les PPPs sont créés suite à la phosphorylation du substrat, comme cela a été décrit pour la phosphatase PP2A-B56 et son substrat Erp1 dans l'ovocyte de xénope (Isoda *et al.*, 2011) (voir Chapitre III). Outre les motifs de reconnaissance de substrats, les isoformes de PP2A présentent des affinités et donc des activités différentielles de déphosphorylation des résidus sérines et thréonines, qui sont fonction de la séquence adjacente au site de déphosphorylation. Ainsi, PP2A-B55 cible préférentiellement les phospho-thréonines plutôt que les phospho-sérines, une caractéristique généralement conservée pour les autres PPPs (Godfrey *et al.*, 2017). L'ensemble de ces régulations permettent ainsi à une isoforme donnée de PP2A de déphosphoryler des substrats de manière non seulement spécifique mais avec des cinétiques différentielles afin d'assurer la parfaite synchronisation tant spatiale que temporelle des événements de la division cellulaire (Cundell *et al.*, 2016; Godfrey *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2017).

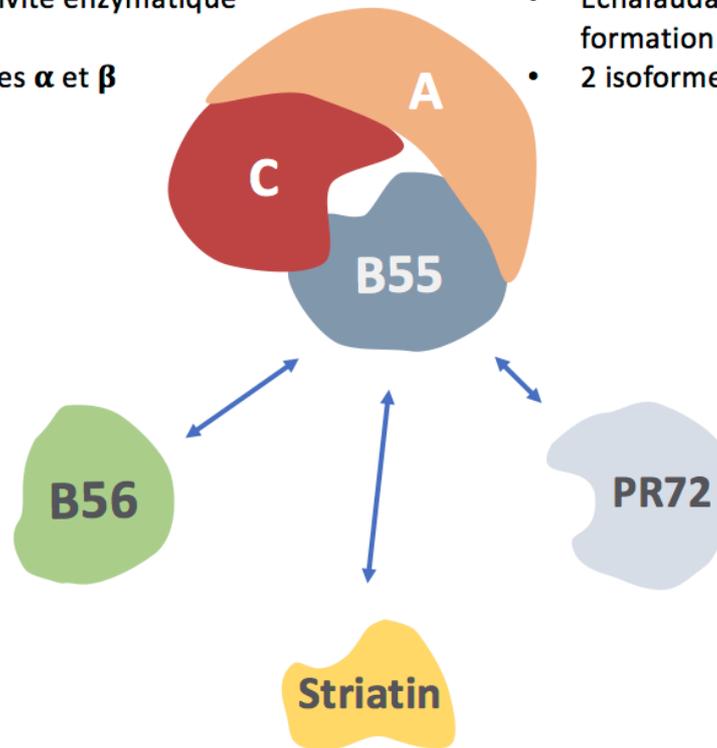
c) PP4 et PP6

PP4 et PP6 sont également impliquées dans la division cellulaire mais leur structure, leur fonction et leur régulation sont moins bien comprises. En raison de la forte homologie de séquence avec PP2A, environ 60% chez l'homme (Tomiyama and Ichimura, 2019), PP4 et PP6 sont classées dans la sous-famille des PLPs (PP2A-like phosphatases). Comme PP2A, elles agissent sous la forme d'hétérodimères ou d'hétérotrimères en s'associant à une ou deux sous-unités régulatrices (Nasa and Kettenbach, 2018). En interphase, PP4 est associée à la chromatine dans le noyau et au niveau des centrosomes. Au cours du cycle cellulaire, son activité a été impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADN (Chowdhury *et al.*, 2008; Villoria *et al.*, 2019), la réponse cellulaire à l'ADN endommagé (Lee *et al.*, 2012; Nakada *et al.*, 2008), la maturation des centrosomes ainsi que la nucléation et l'organisation des microtubules chez les mammifères, la drosophile et *C. elegans* (Helps *et al.*, 1998; Sumiyoshi *et al.*, 2002; Toyooka *et al.*, 2008). Par ailleurs, elle régulerait la perte de cohésion des chromosomes chez la levure en mitose (Biro *et al.*, 2017). *In vitro*, PP4 est capable de déphosphoryler Cdc20, Cdc25A et Cdc25B par l'intermédiaire d'un motif consensus de liaison FxxP (Ueki *et al.*, 2019).

PP6 a été impliquée dans la réparation de l'ADN, le développement lymphocytaire, la tumorigenèse et la régulation de la taille des organes (Ohama, 2019). Lors du cycle cellulaire, son inactivation conduit à trois phénotypes principaux plus ou moins prononcés selon le modèle étudié : un blocage en phase-G1, un arrêt en phase-S et une mitose anormale (Ohama, 2019). En particulier, PP6 participerait à la ségrégation des chromosomes, une fonction qui semble conservée de la levure jusqu'à l'homme. Ainsi, elle contrôle la phosphorylation activatrice d'Aurora A dans les cellules humaines et régule l'organisation du fuseau et la dynamique des microtubules lors de l'anaphase chez *C. elegans* (Afshar *et al.*, 2010; Hammond *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2010). Chez la souris, elle préserve l'intégrité de l'ADN dans les ovocytes en prophase et contribue à la sortie de l'arrêt en métaphase II (Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2015). En termes d'activation de Cdk1, aucune donnée de la littérature n'indique que ces deux phosphatases participent à l'entrée de la division cellulaire.

- ❖ **Sous-unité catalytique C :**
 - Faible activité enzymatique seule
 - 2 isoformes α et β

- ❖ **Sous-unité structurale A :**
 - Echafaudage pour la formation de l'holoenzyme
 - 2 isoformes α et β



- ❖ **Sous-unités régulatrices B :**
 - Spécificité de substrat
 - Régulation spatiale
 - 4 grandes familles : B55 (B55), B56 (B56'), PR72 (B'') et striatin (B''')

Figure 4 : PP2A est trimère composé d'une sous-unité catalytique C, d'une sous-unité structurale A et d'une sous-unité régulatrice B

Les sous-unités régulatrices B déterminent la spécificité de substrat et/ou la localisation intracellulaire des holoenzymes PP2A.

C. Contrôle moléculaire de la phase-M

1. L'entrée en phase-M

Lors de l'entrée en phase-M, l'activation des kinases, en particulier celle de Cdk1, permet la phosphorylation des régulateurs directs de Cdk1, Myt1/Wee1 et Cdc25, et des substrats mitotiques qui gouvernent les événements structuraux de la division. L'inhibition simultanée des phosphatases qui contrebalancent les activités kinases agit ainsi à deux niveaux distincts dans le contrôle moléculaire de la phase-M : l'activation totale des complexes Cdk1-Cycline B accumulés lors de la phase-G2 et le maintien des substrats mitotiques sous forme phosphorylée.

a) Activation des complexes Cdk1-Cycline B

L'activation des complexes Cdk1-Cycline B débute au niveau des centrosomes et dans le noyau (Lindqvist *et al.*, 2009). Dans les cellules humaines, l'analyse par FRET et vidéo-microscopie d'un substrat spécifiquement phosphorylé par les complexes Cdk1-Cycline B1 a par ailleurs permis d'établir que l'activation de ces complexes débute dans les 20 minutes qui précèdent la rupture de l'enveloppe nucléaire pour induire l'entrée en prophase (Gavet and Pines, 2010a, b). Leur activité augmente ensuite fortement jusqu'en métaphase et coordonne les événements structuraux de l'entrée en phase-M comme la rupture de l'enveloppe nucléaire (Gavet and Pines, 2010a, b). Comme mentionné dans la partie A.2.c, l'activation des complexes Cdk1-Cyclines B requiert la déphosphorylation de Cdk1 sur T14 et Y15 suite à l'activation de Cdc25 et à l'inhibition simultanée des kinases Wee1/Myt1 lors de la transition G2/M. Ce mécanisme est principalement gouverné par les premières molécules actives de Cdk1 et est connu sous le nom de boucle d'auto-amplification (voir chapitre III).

i. L'équilibre Wee1/myt1 et Cdc25

En phase-G2, Wee1/Myt1 sont actives alors que Cdc25 est inactive. Lors de la transition G2/M, l'inhibition de Wee1/Myt1 et l'activation de Cdc25 permettent la déphosphorylation de Cdk1 sur T14 et Y15 et donc l'activation des complexes Cdk1-Cycline B. Ces deux classes d'enzymes antagonistes sont régulées par phosphorylation de manière opposée lors de l'entrée en mitose. Wee1/Myt1 sont actives sous forme hypophosphorylée en interphase et inactivées par phosphorylation en mitose (Gaffre *et al.*, 2011; McGowan and Russell, 1993; Mueller *et al.*, 1995a). A l'inverse, Cdc25C est hypophosphorylée et inactive en phase-G2 et passe sous

un état hyperphosphorylé et actif en mitose (Gabrielli *et al.*, 1997; Gaffre *et al.*, 2011; Karaïskou *et al.*, 1998; Karaïskou *et al.*, 1999). Que ce soit pour Wee1/Myt1 ou Cdc25C, ces phosphorylations sont principalement catalysées par Cdk1 (Booher *et al.*, 1997; Gaffre *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 1995a; Mueller *et al.*, 1995b; Tang *et al.*, 1993). Outre leur action sur les activités enzymatiques de Cdc25C et Wee1/Myt1, elles modifient leur localisation intracellulaire et favorisent l'activation des premiers complexes Cdk1-Cycline B au niveau du noyau et des centrosomes (Booher *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1995a ; Mueller *et al.*, 1995b; Tang *et al.*, 1993). En régulant ses propres régulateurs par phosphorylation, Cdk1 contribue à l'amplification de son activité et la maintient ainsi à un niveau élevé tout au long de la mitose. Outre Cdk1, d'autres kinases activatrices participent à la boucle d'auto-amplification en ciblant également les régulateurs directs de Cdk1 comme Aurora, Plk1 (Polo Kinase 1) et la MAPK.

ii. *Greatwall et PP2A-B55δ*

Conjointement, les phosphatases qui contrecarrent les activités kinases mitotiques, en particulier celle de Cdk1, sont inhibées. Ceci permet notamment la régulation efficace de Wee1/Myt1 et Cdc25 car il n'y a plus d'enzyme s'opposant à leur phosphorylation par Cdk1. Chez le xénope, la phosphatase qui antagonise Cdk1 correspond à une isoforme bien spécifique de PP2A, PP2A-B55δ. Cette phosphatase est active en phase-G2 et inhibée lors de la transition G2/M (Mochida *et al.*, 2009). Son inactivation est indirectement sous le contrôle de l'activité de Cdk1 qui, par phosphorylation, active la kinase Greatwall. En retour, Greatwall phosphoryle ses deux substrats, membres de la famille des Endosulfines, ENSA (α -endosulfine) et Arpp19 (cAMP-regulated phosphoprotein of 19 kDa), sur un résidu très conservé, la S67/S64 (xénope/homme) (Castilho *et al.*, 2009; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008). Une fois phosphorylées, les protéines ENSA et Arpp19 sont converties en de puissants inhibiteurs spécifiques de PP2A-B55δ qui se lient directement à la phosphatase et titre son activité en servant de substrats préférentiels (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014). Le rôle régulateur exercé par la voie Greatwall/ARPP-ENSA/PP2A-B55δ sur la division a été découvert à partir d'extraits acellulaires de xénope et chez la drosophile et sont conservés dans la plupart des modèles expérimentaux avec cependant certaines spécificités (pour revue, Vigneron *et al.*, 2016). L'invalidation complète de Greatwall par ARN interférence dans les cellules humaines provoque un arrêt en phase-G2 (Adhikari *et al.*, 2014; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2013; Archambault *et al.*, 2007; Burgess *et al.*, 2010; Voets and Wolthuis, 2010). En revanche, le knock-out conditionnel de Greatwall dans les cellules

humaines, la drosophile ou les ovocytes des souris n'affecte pas la rupture de l'enveloppe nucléaire mais conduit à des défauts majeurs dans la condensation des chromosomes, la séparation des chromatides sœurs et la cytokinèse (Adhikari *et al.*, 2014; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2013; Archambault *et al.*, 2007; Burgess *et al.*, 2010; Voets and Wolthuis, 2010). Ces différents effets peuvent être expliqués par le degré d'inactivation de l'expression de Greatwall (Vigneron *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'isoforme de PP2A-B55 qui contrecarre Cdk1 varie également selon le modèle expérimental puisque le niveau d'expression des B55 est fonction des espèces et des types cellulaires. Chez l'homme, il correspondrait à l'isoforme PP2A-B55 α (Castilho *et al.*, 2009; Mochida *et al.*, 2009). Cette voie régulatrice Greatwall, Arpp19/ENSA et PP2A-B55 sera plus amplement détaillée dans le chapitre IV.

iii. Le signal déclencheur de l'entrée en phase-M

Le déclenchement de la boucle d'auto-amplification repose sur un niveau seuil d'activité du complexe Cdk1-Cycline B. Comment cette amorce d'activité Cdk1 peut-elle naître ? Il a été récemment proposé que le signal déclencheur corresponde aux complexes Cdk1-Cycline A qui phosphorylent plusieurs protéines régulatrices impliquées dans l'activation des complexes Cdk1-Cycline B : Wee1, Plk1 et Greatwall (Figure 5). Les complexes Cdk1-Cycline A sont actifs avant et indépendamment des complexes Cdk1-Cycline B (Fung *et al.*, 2007; Hégarat *et al.*, 2018). De plus, ils ne sont pas ou partiellement phosphorylés sur Y15 chez le xénope et l'homme (Clarke *et al.*, 1992; Vigneron *et al.*, 2018). Dans les cellules humaines, l'invalidation de la Cycline A par ARN interférence prolonge la phase-G2 ou bloque les cellules dans cette phase, en corrélation avec une augmentation de la phosphorylation de Cdk1 sur Y15 (Fung *et al.*, 2007; Hégarat *et al.*, 2018) (Clarke *et al.*, 1992; Vigneron *et al.*, 2018). L'arrêt en phase-G2 induit suite à l'absence de Cycline A est alors fonction de Wee1 et/ou de l'axe Plk1-Cdc25 (Fung *et al.*, 2007 ; Hégarat *et al.*, 2018; Vigneron *et al.*, 2018). Les complexes Cdk1-Cycline A inhibent Wee1 par phosphorylation sur T239 (Li *et al.*, 2010). Ils activent également la kinase Plk1 qui inhibe Wee1/Myt1 et active Cdc25 par phosphorylation (Gheghiani *et al.*, 2017; Lobjois *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 2003; Roshak *et al.*, 2000). L'axe Plk1-Cdc25 dépend d'une kinase additionnelle, Aurora A, et de son co-activateur, la protéine Bora (Macurek *et al.*, 2008). Aurora A active Plk1 par phosphorylation sur un résidu activateur, T210, dès la phase-G2. La phosphorylation par Cdk1-Cycline A sur S110 de Bora permet à cette dernière de

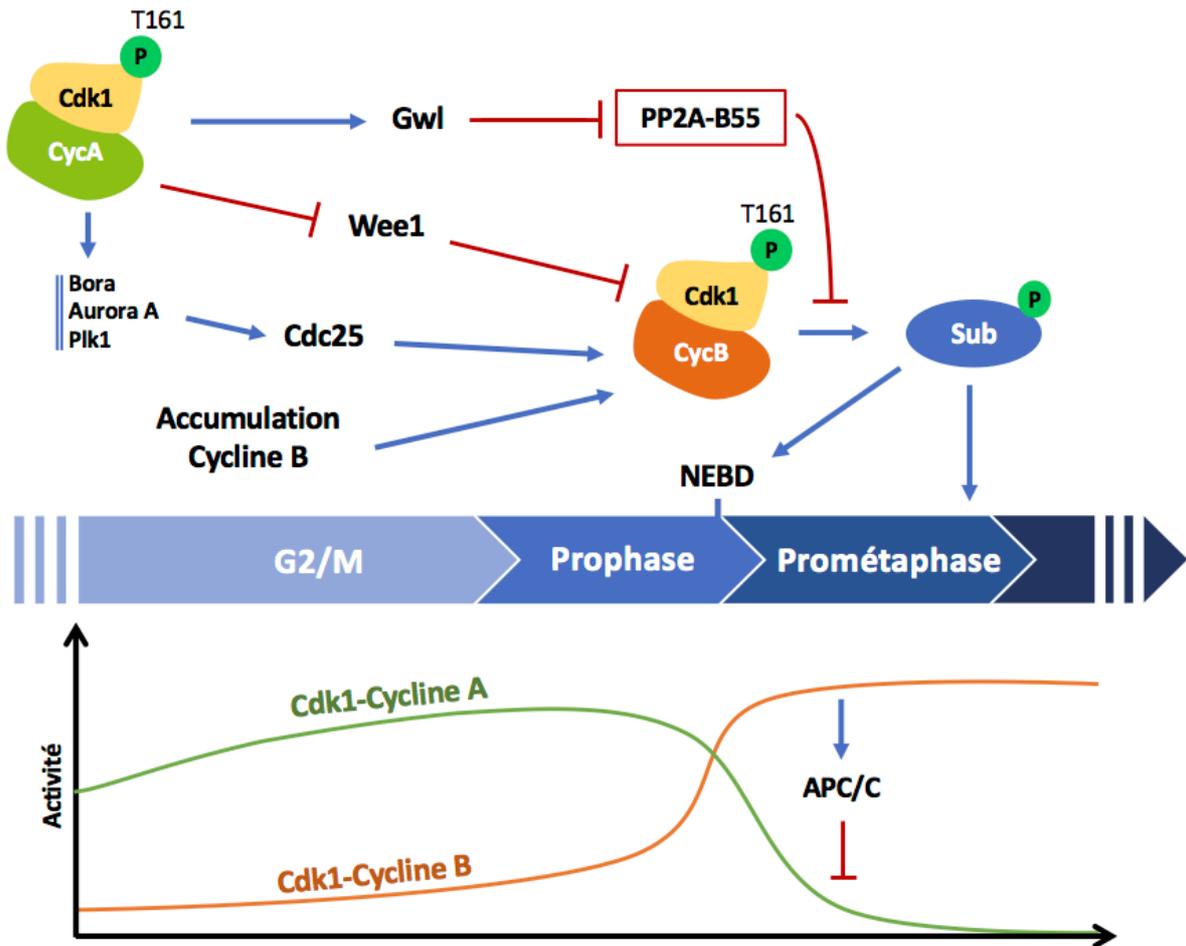


Figure 5 : Le signal déclencheur de l'activation des complexes Cdk1-Cycline B lors de la transition G2/M.

Lors de la transition G2/M, l'activation initiale des complexes Cdk1-Cycline B dépend de l'accumulation des Cyclines B et de l'activité des complexes Cdk1-Cycline A. Ces complexes sont activés avant les complexes Cdk1-Cycline B et initient l'entrée en phase-M en inhibant la kinase Wee1 et en activant la phosphatase Cdc25 par l'intermédiaire de l'axe Aurora A-Bora-Plk1. de plus, ils activent la kinase Greatwall, permettant le début de l'inactivation de la phosphatase qui contrecarre l'activité de Cdk1, PP2A-B55. Ces mécanismes activent quelques complexes Cdk1-Cyclines B, qui en retour déclenchent la boucle d'auto-amplification pour leur activation totale. Une fois actifs, les complexes Cdk1-Cycline B phosphorylent les substrats mitotiques. Ils induisent la rupture de l'enveloppe nucléaire puis la progression en métaphase. En début de mitose, les complexes Cdk1-Cyclines sont également responsables de l'activation de l'E3 ubiquitine ligase, APC/C, qui provoque la dégradation de la Cycline A par le protéasome.

CycB : Cycline B ; Sub : substrats ; Gwl: Greatwall, NEBD : Nuclear Enveloppe BreakDown

stimuler l'activation de Plk1 par Aurora A (Chan *et al.*, 2008; Macurek *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2008a; Seki *et al.*, 2008b; Tavernier *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2016; Vigneron *et al.*, 2018). Enfin, une étude récente suggère que Cdk1-Cycline A est également capable d'activer la kinase Greatwall par phosphorylation, induisant ainsi l'inactivation de PP2A-B55 (Hégarat *et al.*, 2018). Les complexes Cdk1-Cyclines A, en agissant sur Wee1, Cdc25 et Greatwall, activent ainsi quelques complexes Cdk1-Cyclines B en favorisant leur déphosphorylation sur les résidus inhibiteurs T14 et Y15. Cela déclenche la boucle d'auto-amplification qui conduit à leur activation totale et au déclenchement et à la progression de la phase-M (Figure 5).

b) La phosphorylation des substrats mitotiques

L'activation de Cdk1 et des kinases partenaires, comme Plk1 et Aurora, permet le réarrangement structural de la cellule nécessaire à la phase-M. Ces modifications sont principalement portées par l'activité de Cdk1 qui phosphoryle des centaines de substrats par l'intermédiaire du motif consensus S/TPxxR/K (Rhind and Russell, 2012). Cdk1 est impliquée dans la condensation de la chromatine, la dissociation et fragmentation du Golgi et du réticulum endoplasmique et la rupture de l'enveloppe nucléaire via la phosphorylation des lamines. Elle orchestre également la réorganisation structurale du cytosquelette d'actine et des microtubules et initie la séparation et la maturation des centrosomes, deux événements requis pour la mise en place du fuseau mitotique. De plus, elle phosphoryle des composants clés du kinétochore et des protéines du SAC, coordonnant ainsi l'attachement des chromosomes aux microtubules kinétochoriens et l'inhibition de la séparation des chromatides sœurs tant que les centromères ne sont pas attachés de manière bipolaire au fuseau (Petroni *et al.*, 2016) (voir partie 2.a.i). En association avec Cdk1, les kinases Plk1, Aurora A, Aurora B et Mps1 contribuent à la phosphorylation des substrats mitotiques localement (Figure 6). Ces kinases présentent des localisations spécifiques et phosphorylent donc des substrats distincts lors de l'entrée en phase-M. Aurora A contrôle la séparation des centrosomes et la dynamique de formation du fuseau de division alors qu'Aurora B régule l'attachement des kinétochores aux microtubules (Antanaviciute *et al.*, 2018; Willems *et al.*, 2018). La kinase Plk1 participe à la maturation des centrosomes et à l'assemblage du fuseau de division. De plus, les sites phosphorylés par Cdk1 permettent de recruter Plk1 sur divers substrats de Cdk1, Plk1 phosphorylant à son tour ces mêmes protéines et amplifiant ainsi l'effet des phosphorylations catalysées par Cdk1.

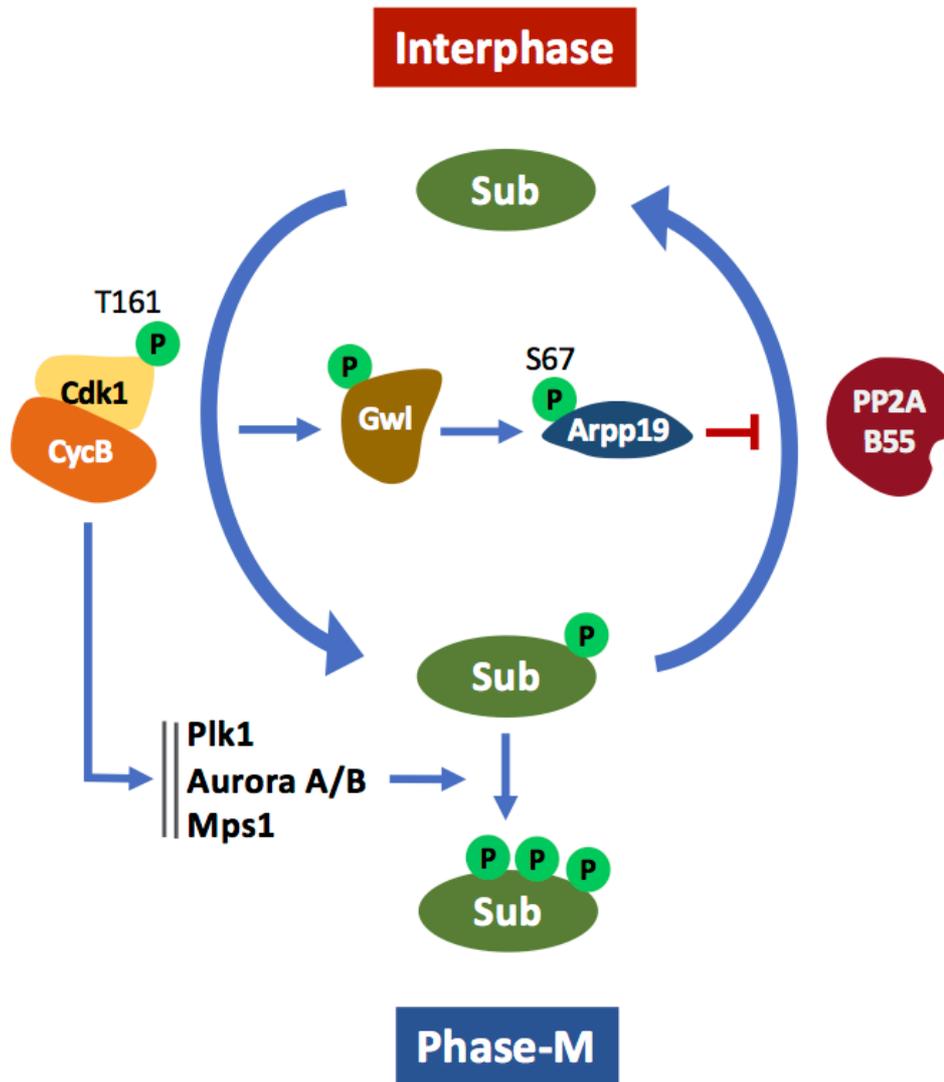


Figure 6 : La phosphorylation des substrats mitotiques

La phosphorylation des substrats mitotiques est un processus réversible et dynamique qui gouverne les événements structuraux de la division cellulaire. En interphase, ces substrats ne sont pas phosphorylés. Lors de la transition G2/M, leur phosphorylation résulte de l'activation de multiples kinases, dont Cdk1, et de l'inhibition de phosphatases. PP2A-B55 est la phosphatase majeure qui antagonise l'activité de Cdk1 sur les substrats mitotiques. Lors de l'entrée en mitose, les complexes Cdk1-Cyclines B actifs provoquent l'activation de la kinase Greatwall. Greatwall phosphoryle alors ses substrats Arpp19 et ENSA sur la S67 (xénope), ce qui les convertit en inhibiteurs spécifiques de PP2A-B55. L'activation de Cdk1 associée à l'inactivation de PP2A-B55 assure ainsi la phosphorylation des substrats mitotiques par Cdk1 et est indispensable pour la progression en phase-M. Par ailleurs, les kinases Plk1, Aurora (A et B) et Mps1 contribuent à la phosphorylation des substrats mitotiques localement.

Gwl: Greatwall ; Sub: Substrats

Simultanément, l'inhibition des phosphatases assure le contrôle spatio-temporel de l'entrée en mitose qui devient irréversible à partir de la rupture de l'enveloppe nucléaire (Potapova *et al.*, 2011). Comme nous l'avons déjà vu, l'inhibition de PP2A-B55 par la voie Gwl-Arpp19/ENSA/PP2A est requise non seulement pour l'activation complète des complexes Cdk1-Cycline B mais aussi pour ne pas contrecarrer les phosphorylations des substrats mitotiques de Cdk1 (Castilho *et al.*, 2009; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2009; Mochida *et al.*, 2010) (Figure 6). Cependant, toutes les isoformes de PP2A ne sont cependant pas inhibées lors de l'entrée en phase-M. L'activité de PP2A-B56 est requise localement pour réguler la phosphorylation de substrats impliqués dans la dynamique des événements associés aux chromosomes et au fuseau mitotique ainsi qu'au maintien de la cohésion centromérique jusqu'en métaphase (Kitajima *et al.*, 2006; Riedel *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2013). En particulier, PP2A-B56 est recrutée aux kinétochores par la protéine Shugoshin et maintient la cohésion au niveau centromérique en empêchant à ce niveau précis la phosphorylation des cohésines par Plk1, un mécanisme responsable de la dissociation des cohésines le long des bras des chromosomes en prophase (Kitajima *et al.*, 2006; Riedel *et al.*, 2006; Tang and Wang, 2006; Tang *et al.*, 2006).

PP1 est également inhibée par sa phosphorylation sur T320 (Dohadwala *et al.*, 1994; Grallert *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2009). Cette phosphorylation est catalysée par Cdk1, contribuant à favoriser la phosphorylation des substrats de Cdk1 (Dohadwala *et al.*, 1994; Grallert *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2009). Cependant, dans de nombreux modèles expérimentaux, la fraction nucléaire de PP1 reste active jusqu'en métaphase (Dohadwala *et al.*, 1994; Grallert *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2009). Cette fraction active de PP1 est notamment responsable de la déphosphorylation de Cdc25 sur son résidu inhibiteur S287 (numérotation chez le xénope, S216 chez l'homme), une phosphorylation connue pour induire la séquestration cytoplasmique de la phosphatase en réponse à des dommages à l'ADN et un blocage de l'entrée en phase-M (Izumi and Maller, 1993; Margolis *et al.*, 2006a; Margolis *et al.*, 2006b; Margolis *et al.*, 2003; Rempel *et al.*, 1995). De plus, elle régule la localisation intracellulaire d'acteurs de l'entrée en mitose comme Aurora B, Mps1 et Plk1 afin d'orchestrer la maturation et la séparation des centrosomes, la formation et la dynamique du fuseau de division ainsi que la stabilisation de l'attachement entre microtubules et kinétochores et l'inhibition du SAC en sortie de phase-M (Heim *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Margolis *et al.*, 2006b; Nijenhuis *et al.*, 2014) (Meraldi and Nigg, 2001). Ces résultats suggèrent que l'activation de PP1 est requise pour les premières étapes de la phase-M et que son inhibition

par Cdk1 n'interviendrait qu'en métaphase. En accord avec cette hypothèse, l'analyse quantitative par phosphoprotéomique de la phosphorylation de PP1 sur T320 indique que PP1 est seulement phosphorylée à 60% dans les cellules arrêtées en prométaphase (Olsen *et al.*, 2010). Il est donc possible que certaines holoenzymes de PP1, localisées dans le noyau et dont la nature moléculaire n'est pas clairement identifiée, échappent à l'inhibition exercée par Cdk1 pour contrecarrer localement les activités d'Aurora B, de Plk1 et de Cdk1.

L'ensemble de ces données suggère que seule l'inhibition de PP2A-B55 est cruciale pour la progression en mitose, afin d'assurer l'activation de Cdk1 et une phosphorylation efficace des substrats de Cdk1. L'activité des autres phosphatases, dont PP1 et PP2A-B56, reste indispensable pour réguler localement la dynamique des événements structuraux de l'entrée en phase-M.

2. La sortie de phase-M

La sortie de phase-M est déclenchée par la dégradation protéolytique des Cyclines qui éteint l'activité de Cdk1 et provoque la dégradation d'autres kinases comme Aurora et Plk1. Cependant, certaines de ces kinases restent actives localement, en association avec la réactivation programmée des phosphatases et orchestrent le retour en interphase.

a) Les dégradations protéiques

Une fois les chromosomes alignés et correctement attachés au fuseau de division mitotique de manière bipolaire, l'anaphase débute et ségrège les chromatides sœurs vers les deux pôles du fuseau. La sortie de la phase-M dépend alors de la dégradation de plusieurs protéines : les Cyclines B mitotiques, ce qui inactive Cdk1, la Sécurine et les cohésines. La Sécurine est essentielle au maintien de la cohésion centromérique entre les chromatides sœurs jusqu'en métaphase car elle inhibe par liaison la protéine responsable du clivage des cohésines centromériques, la Séparase. En début d'anaphase, la dégradation de la Sécurine libère la Séparase. Elle clive alors les cohésines centromériques. Les chromatides sœurs, n'étant plus attachées l'une à l'autre, peuvent être tractées vers les pôles par la dépolymérisation active des microtubules kinétochoriens. La dégradation des Cyclines mitotiques combinée à celle de la Sécurine permet ainsi de coordonner l'inactivation de Cdk1 avec la séparation des chromatides sœurs. Cette coordination est conservée de la levure jusqu'à l'homme et dépend de l'activité de l'E3 ubiquitine ligase APC/C, également appelée Cyclosome.

i. Cyclines, séparation des chromosomes et APC/C

Lors de la transition métaphase/anaphase, la dégradation des Cyclines B est sous le contrôle de l'APC/C. L'APC/C est composé d'une quinzaine de sous-unités et catalyse le transfert d'ubiquitine sur des protéines cibles à l'aide de deux enzymes, une enzyme d'activation, E1, et une enzyme de conjugaison, E2. L'activité de l'APC/C dépend de sa liaison à deux activateurs, Cdc20/fizzy et Cdh1/fizzy-related. En phase-G2 et en début de mitose, l'APC/C est associé à Cdc20. Lors de l'entrée en anaphase, l'APC/C se lie à Cdh1, ce qui déclenche la dégradation de Cdc20. APC/C^{Cdh1} reste alors actif jusqu'en phase-G1. Cdc20 et Cdh1 agissent comme des protéines adaptatrices assurant la liaison et la spécificité de substrat du Cyclosome. Elle reconnaissent, avec des affinités distinctes, des séquences spécifiques de dégradation ou motifs « dégrons », les plus connues étant la D-box (Destruction-box; RxxLxxxN) et la KEN-box (KENxxxN) qui sont présentes dans les Cyclines mitotiques. Plus récemment, d'autres motifs de reconnaissance ont été identifiés, tels que l'ABBA box dans la Cycline A, la CRY-box ou l'O-box (Yamano, 2019). La présence de ces motifs additionnels modifierait la spécificité des substrats susceptibles d'être ubiquitinés par l'APC/C et permettrait notamment la dégradation ordonnée des substrats mitotiques lors de la progression en mitose (Yamano, 2019). En particulier, une fraction de l'APC/C^{Cdc20} est active en prophase et dégrade la Cycline A sans affecter les Cyclines B et la Sécurine, suggérant une reconnaissance différentielle de ces substrats en début de mitose (den Elzen and Pines, 2001; Di Fiore and Pines, 2010).

ii. La régulation de l'APC/C

L'APC/C étant au cœur de la dégradation protéique tout au long du cycle cellulaire, son activité est étroitement régulée par de multiples mécanismes qui affectent son interaction avec Cdc20 et Cdh1. Ces dernières sont régulées également par protéolyse mais également par des phosphorylations sous le contrôle de Cdk1 (Figure 7).

Le premier mécanisme inhibiteur de l'APC/C et de la transition métaphase/anaphase est le SAC qui détecte les problèmes d'attachement entre kinétochores et microtubules jusqu'en métaphase (pour revue, voir Lara-Gonzalez *et al.*, 2012). En absence d'attachement ou lorsque que la tension exercée entre les deux kinétochores est trop faible, la kinase Aurora B centromérique phosphoryle les protéines du kinétochore externe, le complexe KMN (KNL1-MIS12-NDC80) (Ji *et al.*, 2015; Welburn *et al.*, 2010). La kinase Mps1 est alors recrutée aux kinétochores et induit la formation du complexe MCC (Mitotic Checkpoint Complex) qui est

composé des protéines Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20 (Ji *et al.*, 2015; Maiato *et al.*, 2004; Maiato and Sunkel, 2004 ; Welburn *et al.*, 2010). Le complexe MCC inhibe directement l'activité d'APC^{Cdc20} et bloque son association à Cdc20, qui se comporte alors comme un pseudo-substrat pour empêcher l'ubiquitination d'autres substrats de l'APC/C (Alfieri *et al.*, 2016; Hoyt *et al.*, 1991; Li and Murray, 1991; Sudakin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016) (Figure 7).

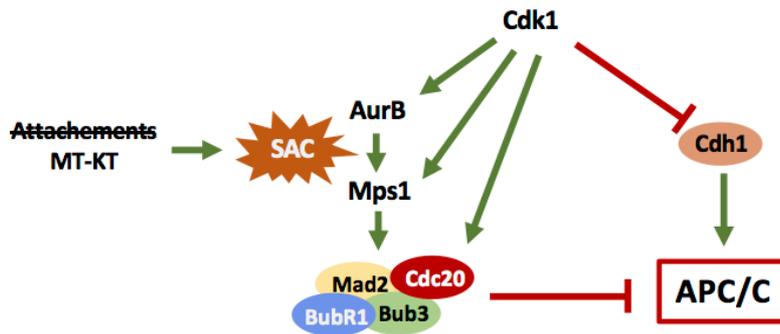
Les phosphorylations de Cdh1 et de Cdc20 catalysées par Cdk1 coopèrent avec le SAC pour inhiber l'APC/C. Elles bloquent l'association de Cdh1 à APC/C et favorisent l'interaction de Cdc20 avec Mad2 (D'Angiolella *et al.*, 2003; D'Angiolella *et al.*, 2007; Yudkovsky *et al.*, 2000 {D'Angiolella, 2003 #13392}) Elles inhibent ainsi l'activation de l'APC^{Cdh1} mais ne rendent pas compte de la fraction de l'APC^{Cdc20} qui est active en début de mitose. Pour être activateur de l'APC/C, Cdh1 et Cdc20 doivent être déphosphorylées. De manière intéressante, le site de phosphorylation de Cdc20 ciblé par Cdk1 correspond à une thréonine alors qu'il s'agit d'une sérine chez Cdh1. L'identité des phosphatases qui ciblent ces résidus n'est pas encore connue mais l'hypothèse que deux phosphatases distinctes puissent induire leur déphosphorylation avec des cinétiques distinctes permettrait *in fine* à APC^{Cdc20} et APC^{Cdh1} d'être activés au bon moment pendant la mitose (Hein *et al.*, 2017; Mochida *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Outre Cdh1 et Cdc20, Cdk1 régule également l'activité du SAC en phosphorylant de nombreuses protéines-clés du SAC, en particulier Aurora B et Mps1, pour localiser ces deux protéines aux centromères et aux kinétochores et stimuler l'activation de Mps1 (Hayward *et al.*, 2019a; Morin *et al.*, 2012). La Cycline B1 est également localisée aux kinétochores non-attachés et interagit avec Mad1 dans les cellules humaines (Alfonso-Perez *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2008; Hayward *et al.*, 2019a). L'activité des complexes Cdk1-Cycline B pourrait ainsi faire partie intégrante du SAC en assurant sa mise en place en début de la mitose et son maintien jusqu'à la métaphase (Hayward *et al.*, 2019b).

Lorsque l'alignement des chromatides sœurs est achevé et que leur mise sous tension microtubulaire est équilibrée, le SAC est inactivé, ce qui lève l'inhibition exercée sur l'APC/C, et induit la dégradation des Cyclines et de la Sécurine.

b) La déphosphorylation des substrats mitotiques

Sans réactivation des phosphatases, le retour en interphase ne s'effectue pas. Les phosphatases concernées déphosphorylent de manière sélective et avec des cinétiques différentielles les substrats mitotiques selon la nature du résidu à déphosphoryler. Elles ordonnent ainsi les événements structuraux du retour en interphase : l'anaphase, la télophase,

➤ **Métaphase**



➤ **Transition métaphase/anaphase**

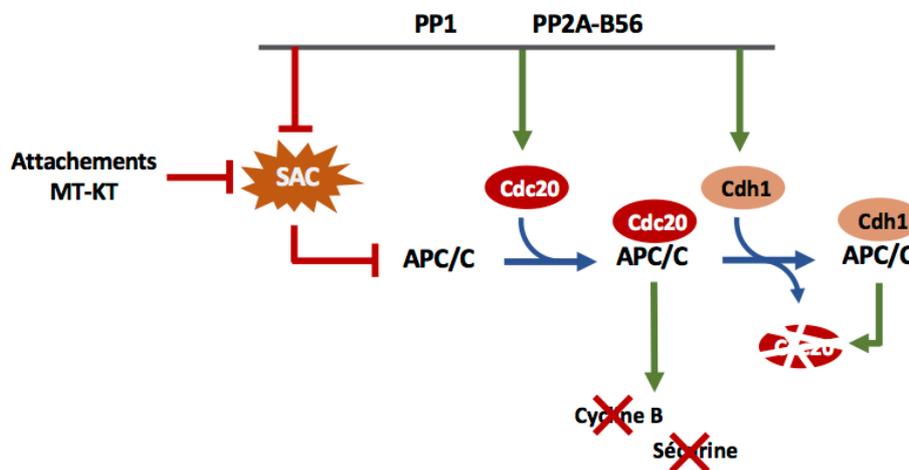


Figure 7 : La régulation de l'APC/C lors de la transition métaphase/anaphase

En métaphase, l'APC/C est inhibé pour permettre l'attachement des chromosomes au microtubules kinétochoriens. Tant que les chromosomes ne sont pas attachés de manière bipolaire au fuseau, le SAC (Spindle Assembly Checkpoint) est actif et inhibe l'APC/C par l'intermédiaire du complexe MCC. Ce complexe, composé des protéines Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20, est activé par les kinases Aurora B et Mps1 et inhibe l'APC/C par interaction directe. Par ailleurs, Cdk1 participe à l'activation du SAC en phosphorylant Aurora B, Mps1 et Mad2, ce qui favorise l'interaction de cette dernière avec Cdc20. Elle phosphoryle aussi Cdh1 pour bloquer son interaction avec l'APC/C.

Lorsque les chromosomes sont correctement attachés aux pôles du fuseau de division, le SAC est inactivé sous l'action des phosphatases PP1 et PP2A-B56. Ces enzymes inactivent les protéines du SAC et déphosphorylent Cdc20, ce qui conduit à la réactivation de l'APC/C. Les Cyclines B et la Sécurine sont alors dégradées pour déclencher la sortie de la métaphase et la séparation des chromatides sœurs. Cdh1 est également déphosphorylée. Elle s'associe alors avec l'APC/C pour dégrader Cdc20 et assurer la progression en anaphase.

MT : microtubule ; KT : kinétochore ; AurB : Aurora B

la cytokinèse, la reformation de l'enveloppe nucléaire puis la décondensation des chromosomes (Cundell *et al.*, 2013; Cundell *et al.*, 2016; Mochida *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2010; Wurzenberger and Gerlich, 2011) (Nilsson, 2019) (Figure 8). De plus, bien que certaines kinases soient dégradées en sortie de phase-M, une fraction d'entre elles reste stable et active localement, comme Plk1 et Aurora A qui sont localisées sur le plan équatorial du fuseau puis à l'anneau contractile. Ces activités kinasiques locales associées à la réactivation des phosphatases participent à la coordination du retour en interphase.

Chez les eucaryotes supérieurs, PP1 et PP2A-B55 sont les phosphatases majeures de la sortie de la phase-M. La phosphatase Cdc14 joue un rôle majeur pour la sortie de phase-M chez la levure. Son rôle chez les eucaryotes supérieurs n'étant pas conservé, elle ne sera pas décrite. Dès la métaphase, PP1 est inhibée par sa phosphorylation sur T320 située dans son site catalytique. Cette phosphorylation, catalysée par Cdk1 en mitose, est l'objet d'une auto-déphosphorylation. Le rôle de la déphosphorylation de la T320 en sortie de mitose a été démontré en substituant ce résidu en un résidu phosphomimétique, ce qui maintient PP1 sous une forme inactive et bloque les cellules en métaphase (Dohadwala *et al.*, 1994; Grallert *et al.*, 2015). En sortie de phase-M, PP1 est réactivée suite à l'inactivation de Cdk1, par auto-déphosphorylation spontanée. Elle contribue alors à la déphosphorylation des substrats mitotiques (Hayward *et al.*, 2019b; Hayward *et al.*, 2019c; Nilsson, 2019; Wu *et al.*, 2009) Kwon *et al.*, 1997). Également, elle initie la réactivation de PP2A-B55 δ , qui conduira à la déphosphorylation de l'ensemble des substrats mitotiques. En effet, PP1 déphosphoryle Greatwall sur un résidu activateur, la T883, ce qui fait chuter l'activité de la kinase (Heim *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2016). Une fraction de PP2A-B55 δ est alors réactivée. Comme PP2A-B55 δ déphosphoryle Greatwall sur des résidus supplémentaires ainsi que son substrat, Arpp19, sur la S67, elle se retrouve libérée de l'action inhibitrice de Greatwall/Arpp19 et est totalement réactivée (Heim *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2016) (Williams *et al.*, 2014). Chez la levure, PP1 est également capable de se lier à PP2A-B55 par l'intermédiaire de la sous-unité régulatrice B55 qui possède un motif RVxF. PP1 participe ainsi directement à la réactivation de PP2A-B55 δ (Grallert *et al.*, 2015). Une fois réactivée, PP2A-B55 déphosphoryle alors la sous-unité B56 permettant à cette dernière de se lier et d'être totalement déphosphorylée par PP1, ce qui conduit à la réactivation de cette isoforme (Grallert *et al.*, 2015). Une telle action en cascade de différentes phosphatases agissant sur l'activité les unes des autres pour assurer la sortie de phase-M n'a pas encore été mise en évidence chez les eucaryotes supérieurs. Cependant, la B55 humaine possède le site de

reconnaissance à PP1, suggérant que ce mécanisme pourrait être conservé chez d'autres espèces (Grallert *et al.*, 2015). Enfin, la réactivation de ces phosphatases, PP1, PP2A-B55 et PP2A-B56, participe à l'activation de l'APC/C via la déphosphorylation de Cdc20 et à l'extinction du SAC en ciblant Aurora B, Mps1, Bub1 et les protéines du kinétochore (Hayward *et al.*, 2019b; Hayward *et al.*, 2019c; Nilsson, 2019; Wu *et al.*, 2009) ; (Hein *et al.*, 2017) .

Ainsi, l'entrée, la progression et la sortie de la phase-M sont orchestrées par le jeu de trois grandes classes de protéines : des kinases, des phosphatases et la machinerie de dégradation via l'ubiquitine qui permet d'éteindre l'activité des kinases, en particulier de Cdk1, en sortie de phase-M. Les données récentes de la littérature montrent que les phosphatases, considérées pendant longtemps comme constitutivement actives, doivent être étroitement contrôlées tout au long de la division cellulaire pour assurer sa régulation temporelle et spatiale. Par ailleurs, il apparaît que ces phosphatases sont interconnectées et capables de se réguler les unes les autres, comme cela a été décrit pour le réseau des kinases de la division cellulaire.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au contrôle de la division méiotique par la protéine Arpp19 dans l'ovocyte de xénope. Comme en mitose, cette protéine inhibe PP2A-B55 dans l'ovocyte et agit dans le mécanisme d'activation de Cdk1 indispensable à la reprise de la méiose. De manière surprenante, Arpp19 est phosphorylée par la kinase dépendante de l'AMPc, PKA, en prophase et bloque la reprise de la méiose. En réponse à la stimulation hormonale, Arpp19 est déphosphorylée et autorise l'activation de Cdk1. Le but de mon projet a été d'identifier et de caractériser la phosphatase responsable de la déphosphorylation d'Arpp19 lors de la reprise de la méiose. Ce projet m'a permis d'aborder le rôle et la régulation des kinases PKA, Greatwall et Cdk1 combinés à une analyse approfondie des différentes phosphatases dans l'ovocyte. Je vais donc maintenant introduire la division méiotique ovocytaire et son contrôle par Cdk1. Ce chapitre sera suivi d'une introduction sur le rôle d'Arpp19 et la fonction des phosphatases dans la maturation méiotique, nécessaires à la compréhension des questions qui sous-tendent mon sujet de thèse, des approches choisies et des résultats.

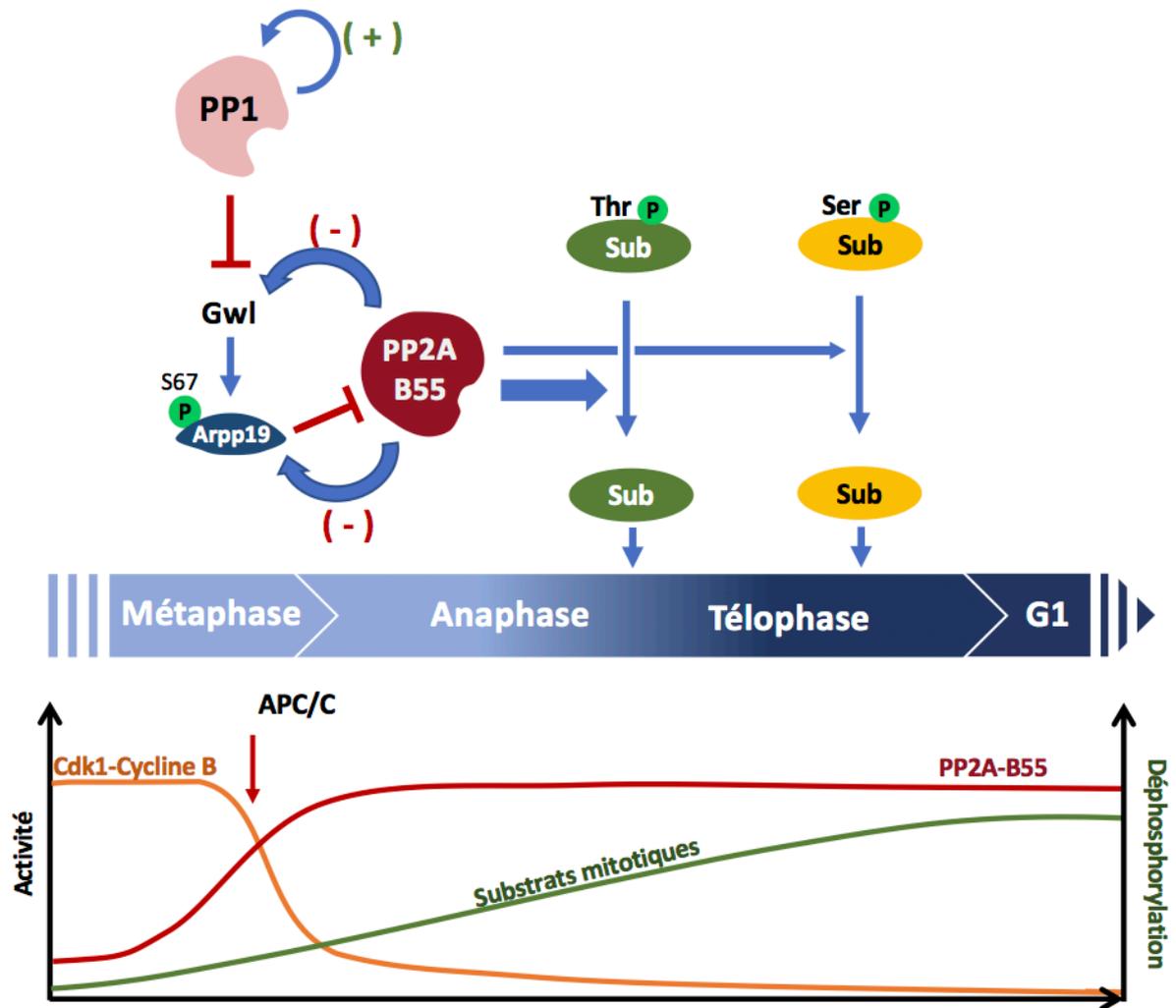


Figure 8 : La sortie de phase-M dépend de la déphosphorylation ordonnée des substrats mitotiques

La sortie de la phase-M dépend de l'inactivation de Cdk1 suite à la dégradation des Cyclines B et de la réactivation des phosphatases. Ces deux événements permettent la déphosphorylation des substrats mitotiques et le retour en interphase.

Deux phosphatases sont essentielles à la sortie de la phase-M : PP1 et PP2A-B55. L'inactivation de Cdk1 réactive PP1 qui en retour, cible Greatwall et l'inactive par déphosphorylation. Le module Greatwall/Arpp19 est progressivement éteint, ce qui permet la réactivation de PP2A-B55. PP1 et PP2A-B55 déphosphorylent alors les substrats mitotiques de manière coordonnée. Leur spécificité vis-à-vis des résidus thréonines et sérines phosphorylés étant distincte, cela permettrait d'orchestrer de manière séquentielle les dernières étapes de la division cellulaire : l'anaphase, la télophase puis la cytokinèse.

III. La division méiotique ovocytaire

A. La maturation méiotique de l'ovocyte

Dans les ovaires, les ovocytes sont bloqués en prophase de première division méiotique. Les ovocytes prêts à reprendre la division méiotique ont réalisé la vitellogenèse et ont atteint leur taille maximale. Comme chez toutes les espèces, l'ovocyte est devenu l'une des plus grosses cellules de l'organisme, voire la plus grosse. Chez le xénope, la vitellogenèse est divisée en six stades selon des critères de taille et de pigmentation ovocytaire, allant du stade I (50-300 μm) au stade VI (1,2 mm). Seuls les ovocytes de stade V et VI sont "compétents", c'est-à-dire capables de reprendre la division méiotique en réponse au stimulus hormonal. Ils sont facilement reconnaissables avec un hémisphère animal brun et un hémisphère végétatif non-pigmenté (Dumont, 1972) (Figure 9).

1. Évènements structuraux de la maturation méiotique

La maturation méiotique est déclenchée au moment de l'ovulation par une hormone stéroïde chez le xénope, la progestérone. Le premier événement morphologique observé après la stimulation hormonale est la rupture de l'enveloppe nucléaire ou GVBD pour Germinal Vesicle Breakdown. Chez le xénope, GVBD est facilement visualisée par l'apparition d'une tache dépigmentée au pôle animal de la cellule (Figure 9). La rupture de l'enveloppe nucléaire marque l'entrée en métaphase de première division méiotique (méiose I). Lors de la transition métaphase I/anaphase I, l'ovocyte sépare les chromosomes homologues et se divise de manière asymétrique en expulsant le premier globule polaire. Le fuseau de la seconde division méiotique (méiose II) se forme très rapidement en absence de phase-S intermédiaire et de prophase. L'ovocyte se bloque à ce stade de métaphase de méiose II, comme chez tous les vertébrés (Figure 9). Le stade au cours duquel le deuxième arrêt intervient varie selon les espèces invertébrées. Il intervient en métaphase de méiose I chez les insectes et les mollusques ou au stade de pronucléus, équivalent à une phase G1 qui suit l'achèvement de la méiose II, chez les échinodermes comme l'oursin et l'étoile de mer, ou certains cnidaires comme la méduse *Clytia*. Ce second arrêt n'est levé que s'il y a fécondation. Il permet donc d'attendre la fécondation sans activation parthénogénétique.

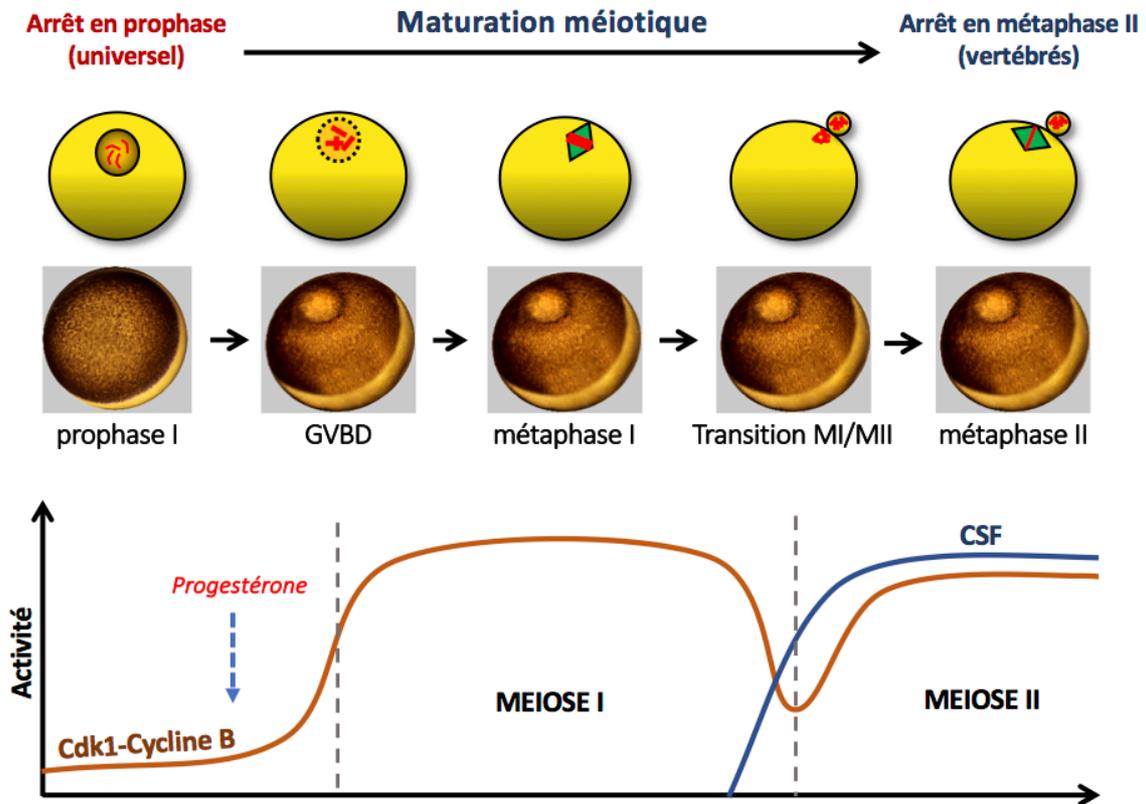


Figure 9 : Contrôle moléculaire de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope

Dans l'ensemble du règne animal, les ovocytes sont bloqués en prophase de première division méiotique (Prophase I) dans l'ovaire. Chez le xénope, la reprise de la méiose est induite en réponse à la progestérone au moment de l'ovulation. L'ovocyte progresse alors dans la première division méiotique (méiose I) puis enchaîne la seconde division (méiose II) en absence de phase-S intercalaire. Il se bloque alors en métaphase de méiose II (métaphase II), un arrêt commun à tous les vertébrés.

Cette transition de la prophase à la métaphase II est appelée maturation méiotique et dépend de deux vagues d'activation des complexes Cdk1-Cycline B. La reprise de la méiose est visualisée par l'apparition d'une tâche dépigmentée au pôle animal qui correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD). L'arrêt en métaphase II dépend de l'activité du facteur CSF (cytostatique) qui maintient l'activité de Cdk1 à un niveau stable et élevé.

2. MPF et CSF, les deux activités qui rythment la maturation méiotique

Comme pour la mitose, la progression dans la maturation méiotique dépend de l'activité de Cdk1 qui subit deux vagues d'activation conditionnant la première puis la seconde division (Figure 9). La première phase d'activation de Cdk1 déclenche GVBD et permet à l'ovocyte de progresser jusqu'à la métaphase I. Son activité chute alors pour déclencher l'anaphase I et l'expulsion du premier globule polaire, puis réaugmente de nouveau, déclenchant une entrée immédiate en métaphase de méiose II. Entre les deux divisions, il n'y a pas de télophase, de reformation de noyau, de réplication de l'ADN, ni de mise en place d'un stade de prophase de méiose II. Les chromosomes restent condensés et se réorganisent au sein d'un fuseau de métaphase. L'ovocyte se bloque à ce stade grâce à l'activité du facteur CSF (Cytostatic Factor) qui maintient l'activité de Cdk1 à un niveau stable et élevé chez les vertébrés (Figure 9). Chez les espèces qui se bloquent au stade pronucléus, l'activité de Cdk1 chute de nouveau et reste à un niveau faible assuré par le CSF jusqu'à la fécondation. L'activité CSF a été découverte chez l'amphibien en même temps que l'activité MPF par Masui et Markert (Masui and Markert, 1971). Sa mise en évidence repose sur le transfert de cytoplasme d'ovocytes donneurs bloqués en métaphase II dans le blastomère d'un embryon au stade deux cellules, ce qui induit l'arrêt de la division cellulaire en métaphase dans le blastomère injecté (Masui and Markert, 1971).

B. L'arrêt en prophase I

1. État de Cdk1 et de ses régulateurs en prophase

Dans l'ovocyte de xénope bloqué en prophase, Cdk1 est stockée sous deux formes inactives : une forme monomérique dont 20% est phosphorylée sur T161, et des complexes Cdk1-Cycline B qui sont phosphorylés sur T161, T14 et Y15 (De Smedt *et al.*, 2002; Hohegger *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 1991). Chez le xénope, 5 isoformes de Cyclines B ont été mises en évidence : B1, B2, B3, B4 et B5 (Hohegger *et al.*, 2001). Les isoformes B1 et B4 sont quasiment identiques et semblent spécifiques aux amphibiens. La situation est la même pour les Cyclines B2 et B5. De fait, les Cyclines B1 et B4 d'une part, et les Cyclines B2 et B5 d'autre part se comportent comme si elles étaient une même protéine, du point de vue de leur fonction et de leur régulation. La Cycline B3 est une forme pseudo-embryonnaire qui ne semble pas exprimée en prophase alors que l'expression des autres Cyclines B varie tout au long de la maturation méiotique (Hohegger *et al.*, 2001). En prophase, Cdk1 est majoritairement associée

à B2 et B5, les isoformes B1 et B4 n'étant que faiblement ou pas exprimées (Frank-Vaillant *et al.*, 1999; Hohegger *et al.*, 2001). Pour simplifier, j'utiliserai par la suite le terme Cycline B2 (et non B2 et B5) et Cycline B1 (et non B1 et B4). Enfin, les données de la littérature suggèrent que la Cycline A n'est pas ou très peu présente en prophase (Kobayashi *et al.*, 1991).

Les complexes Cdk1-Cyclines B2 se forment pendant toute la durée de l'arrêt en prophase grâce à une synthèse basale de Cycline B2 (Gautier and Maller, 1991). Ces Cyclines s'associent aux molécules de Cdk1 libre et les complexes Cdk1-Cyclines B2 formés sont immédiatement inhibés par les kinases Wee1/Myt1, actives en prophase. Chez le xénope, et contrairement à la souris, seule Myt1 est présente en prophase ; Wee1 n'est synthétisé qu'après GVBD (Nakajo *et al.*, 2000). L'activité de Myt1 est cruciale pour l'arrêt en prophase puisque son inhibition par l'agent pharmacologique PD0166285 est capable d'induire la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale, bien qu'avec une cinétique plus lente que les contrôles et sans atteindre 100% de reprise de la méiose (Gaffre *et al.*, 2011). En revanche, en présence d'une concentration sous-luminaire de progestérone de 0,01 μ M, qui ne déclenche pas le reprise de la méiose, l'inhibition de Myt1 permet d'activer Cdk1 dans tous les ovocytes (Gaffre *et al.*, 2011). A l'inverse, l'injection de la protéine recombinante Myt1 dans l'ovocyte ralentit fortement la reprise de la méiose en réponse à la progestérone (Gaffre *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2010). L'enzyme antagoniste de Myt1, la phosphatase Cdc25, est maintenue inactive tout au long de l'arrêt en prophase. Elle est sous une forme hypotphosphorylée et phosphorylée sur la S287 inhibitrice (Duckworth *et al.*, 2002). Dans l'ovocyte, cette phosphorylation est catalysée par la protéine kinase dépendante de l'AMPc, PKA, et non par les kinases Chk1 et Chk2 qui sont activées en réponse à l'ADN endommagé dans les cellules somatiques. Cette phosphorylation par PKA contribue à sa séquestration dans le cytoplasme et est conservée dans les ovocytes en prophase chez la souris (Yang *et al.*, 1999); (Duckworth *et al.*, 2002; Pirino *et al.*, 2009b). Chez cette espèce, Wee1 est également phosphorylée par PKA, ce qui stimule son activité et participerait au mécanisme de blocage en prophase (Han *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2010).

2. Le verrou AMPc-PKA

Chez tous les vertébrés, le blocage de l'ovocyte en prophase dépend d'une concentration élevée en AMPc qui maintient PKA active, interdisant l'activation du MPF (Rime *et al.*, 1992) (Figure 10). Chez le xénope, la concentration intracellulaire en AMPc a été estimée à 1 μ M (O'Connor and Smith, 1976). Ce niveau en AMPc résulte d'un équilibre entre sa production à partir d'ATP par les adénylates cyclases (AC) et de sa dégradation en AMP par les phosphodiésterases (PDEs). Chez le xénope, l'AMPc est produit par une AC ovocytaire encore

mal caractérisée et par les cellules folliculaires connectées à l'ovocyte par des jonctions gap. Chez la souris, la forte concentration en AMPc dépend de l'inhibition de la PDE3 ovocytaire par le GMPc issu des cellules folliculaires et par un récepteur transmembranaire ovocytaire, GPR3. Ce récepteur constitutivement actif stimule l'activité AC par l'intermédiaire d'une petite protéine Gs (pour revue, voir Pan and Li, 2019).

PKA est un hétérotétramère composé de deux sous-unités catalytiques (PKAc) et de deux sous-unités régulatrices (PKAr) qui possèdent le site de liaison à l'AMPc. PKAr inhibe l'activité de PKAc lorsque les deux types de sous-unités sont associées. En présence d'AMPc, PKAc est dissociée de PKAr et donc active. Lors de la reprise de la méiose chez les vertébrés, les premiers événements moléculaires connus déclenchés par la stimulation hormonale sont la chute de la concentration intracellulaire en AMPc suivie par l'inhibition de l'activité de PKA (Figure 10). Les expériences consistant à moduler la concentration en AMPc ou l'activité de PKA ont permis d'établir que ces deux événements sont nécessaires et suffisants pour l'activation de Cdk1 (voir partie C.2.a).

Bien que le module AMPc/PKA représente un verrou à l'activation de Cdk1 commun à tous les vertébrés, cette étape de signalisation n'est pas conservée chez toutes les espèces. Ainsi chez les insectes, l'étoile de mer et de nombreux nématodes, l'AMPc n'a aucun rôle dans l'arrêt en prophase ou la reprise de la méiose. Cependant, chez *C. elegans*, l'augmentation de l'AMPc dans les cellules somatiques qui entourent l'ovocyte participe au déclenchement de la méiose ovocytaire (Huelgas-Morales and Greenstein, 2018). De manière étonnante, chez certaines espèces d'hydrozoaires, d'ascidies et d'annélides, le module AMPc/PKA a une fonction opposée à celle observée chez les vertébrés : l'augmentation de l'AMPc et l'activation de PKA dans l'ovocyte sont nécessaires pour induire la reprise de la méiose (Deguchi *et al.*, 2011; Quiroga Artigas Gonzalo *et al.*, 2019).

La voie de signalisation déclenchée par l'inhibition de PKA et qui s'achève avec l'activation de Cdk1 reste mal connue, en partie parce que les substrats de PKA n'ont pas été clairement identifiés. Par ailleurs, cette voie de signalisation n'implique pas les mêmes acteurs selon les espèces. Ainsi, dans les ovocytes de souris qui réalisent GVBD en 20 minutes, les régulateurs de Cdk1, Wee1 et Cdc25, sont directement régulés par PKA. Le changement d'activité entre Wee1 et Cdc25 à la suite de l'inhibition de PKA pourrait expliquer la genèse directe d'une activité minimale de Cdk1 par l'activation du faible stock de complexes inactifs

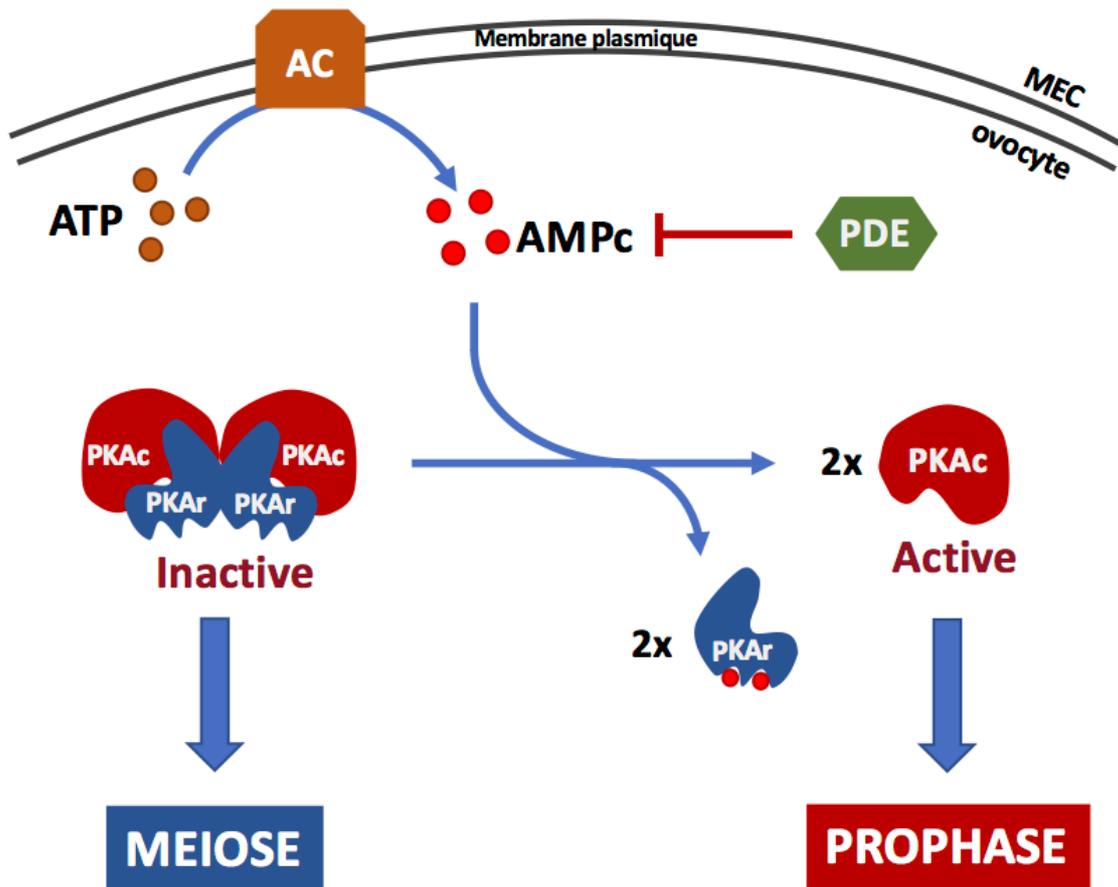


Figure 10 : AMPC, PKA et l'arrêt en prophase

Chez tous les vertébrés, l'arrêt de l'ovocyte en prophase dépend de niveaux élevés en AMP cyclique (AMPC) qui active la protéine kinase dépendante de l'AMPC, PKA. Chez le xénope, l'AMPC est produit par une adénylate Cyclase (AC) ovocytaire mal caractérisée et est issue des cellules folliculaires. Les phosphodiétréases (PDEs) responsable de la dégradation de l'AMPC en AMP ne sont pas régulées. L'AMPC maintient l'activité de PKA élevée en bloquant l'association entre sa sous-unité catalytique, PKAc, et sa sous-unité régulatrice, PKAr. L'activité de PKA maintient l'arrêt en prophase selon un mécanisme encore inconnu.

Cdk1-Cycline B. Cette activité minimale est alors capable de déclencher GVBD sans recourir à d'autres acteurs. En revanche, elle n'est pas suffisante pour permettre l'élaboration d'un fuseau de métaphase I (Ledan *et al.*, 2001). Cette seconde étape de la métaphase I dépend chez la souris d'une augmentation de l'activité Cdk1 qui est fonction la synthèse de Cycline B.

Chez le xénope, Wee1 n'est pas exprimée en prophase et Cdc25 ne semble pas être le substrat majeur de PKA responsable de son action négative sur l'activation de Cdk1 (voir partie C.2.a). L'activation de Cdk1, et celle de Cdc25, se produisent plusieurs heures après l'inhibition de PKA qui est observée quant à elle dans les 10 à 30 minutes après l'ajout de progestérone. Le substrat ou les substrats de PKA responsables de la reprise de la méiose agissent donc précocement, bien en amont de l'activation de Cdk1. La petite protéine Arpp19 a été proposée comme responsable de l'arrêt en prophase comme nous allons le détailler dans le chapitre IV (Dupré *et al.*, 2014). Enfin, l'identité du substrat de PKA est encore inconnue chez les espèces où l'AMPC et PKA ont un effet positif sur la reprise de la méiose.

Enfin, l'une des grandes questions non résolue est de comprendre si le maintien en prophase dépend d'un verrou qu'il suffit de lever, la reprise de la méiose consisterait simplement à débloquer une étape limitante qui assurerait par défaut l'arrêt en prophase ; ou si un double mécanisme est à l'œuvre. Selon cette hypothèse, la prophase serait maintenue par un mécanisme actif qui serait contourné lors de la reprise de la méiose. Cette conception change la façon d'aborder les substrats de PKA. Sont-ils actifs sous forme phosphorylée pour maintenir un arrêt en prophase ou sont-ils actifs sous forme déphosphorylée pour lancer une voie de signalisation conduisant à l'activation de Cdk1 ? Faut-il rechercher des interacteurs de leur forme phosphorylée ou de leur forme déphosphorylée ? Dans le doute, probablement les deux !

C. La reprise de la méiose

1. Les signaux déclencheurs de la reprise de la méiose

Chez les vertébrés, l'ovulation est initiée par une gonadotrophine, l'hormone lutéinisante (LH), qui agit sur les cellules folliculaires et déclenche l'ovulation. De manière indirecte, la LH induit de manière concomitante la reprise des divisions méiotiques. Chez le xénope, en réponse à la LH, les cellules folliculaires sécrètent une hormone stéroïde, la progestérone, à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire (Haccard *et al.*, 2012; Masui, 1967). *In vitro*, la progestérone induit la maturation à des concentrations de cet ordre de grandeur et est quasiment inefficace aux concentrations nanomolaires qui sont celles de l'hormone circulante dans le sang. En outre, *in vitro*, de nombreux stéroïdes sont capables de déclencher la reprise

de la méiose, à l'exception notable des oestrogènes. La progestérone agit donc par l'intermédiaire d'un récepteur de faible spécificité et de faible affinité. Par ailleurs, et contrairement aux récepteurs nucléaires classiques des stéroïdes connus pour moduler l'expression des gènes, ce récepteur est localisé au niveau des membranes intracellulaires et active une voie de signalisation non-génomique et indépendante du noyau. L'identification de ce récepteur a fait l'objet de nombreuses recherches et même si de multiples publications ont proposé différents candidats, aucune représentation convaincante de la réception moléculaire du signal de la maturation n'a encore émergé chez le xénope.

Chez les mammifères, la situation est tout-à-fait différente. Le déclenchement de la reprise de la méiose ne dépend pas de la survenue d'un signal positif mais de l'arrêt de l'action négative qui était exercée par les cellules folliculaires entourant l'ovocyte. Chez la souris, la LH agit sur les récepteurs des cellules de la granulosa pour diminuer rapidement les niveaux en GMPc selon deux voies complémentaires. La production de GMPc diminue suite à la déphosphorylation et à l'inactivation de la guanylyl cyclase NPR2 et l'hydrolyse du GMPc est augmentée par activation de la PDE5. La diminution des GMPc dans les cellules granulosa entraîne alors la diffusion rapide du GMPc hors de l'ovocyte puis la fermeture des jonctions gap entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. La diminution de la concentration en GMPc dans l'ovocyte permet la réactivation des PDEs et la dégradation subséquente de l'AMPc pour la reprise de la méiose (pour revue, voir Pan and Li, 2019).

Chez les invertébrés, différents types de molécules sont impliqués dans l'initiation de la maturation méiotique. Chez l'étoile de mer, il s'agit d'une base nucléique purique dérivée de l'adénine par méthylation, la 1-Méthyladénine (1-MeAde) (Ikegami *et al.*, 1967; Kanatani, 1969). Chez la méduse *C. Hemisphaerica*, l'ovulation et la reprise de la méiose sont déclenchées par l'exposition des gonades à un signal lumineux. Ce signal lumineux est capté par un photorécepteur de type « Opsine » exprimé par les cellules somatiques. Ces dernières sécrètent alors dans le milieu extracellulaire un neuropeptide PRPamide qui déclenche la reprise de la méiose ovocytaire en se liant à un récepteur couplé à G α s pour stimuler la production d'AMPc (Quiroga Artigas *et al.*, 2018; Takeda *et al.*, 2018) (Quiroga Artigas Gonzalo *et al.*, 2019).

Enfin, chez certaines espèces d'invertébrés, comme le nématode *Ascaris*, certains annélides, mollusques ou éponges, la reprise de la méiose est déclenchée par la fécondation. Le spermatozoïde lance alors la voie d'activation de Cdk1. Chez ces espèces, les deux divisions méiotiques ovocytaires se réalisent complètement et il n'y a pas de second arrêt : le noyau du spermatozoïde, stocké dans le cytoplasme ovocytaire pendant les deux divisions méiotiques, se

convertit en pronucléus à la fin de ces dernières et les cycles embryonnaires démarrent immédiatement.

2. La signalisation ovocytaire responsable de la reprise de la méiose

Chez le xénope, la progestérone déclenche une voie de signalisation qui aboutit en 3 à 5h à l'activation de Cdk1. Cette signalisation est depuis longtemps perçue comme une suite d'évènements moléculaires agissant de manière linéaire : la chute de la concentration intracellulaire en AMPc est suivie par l'inhibition de PKA, qui elle-même régule positivement la synthèse de nouvelles protéines spécifiques à partir d'ARNm stockés dans l'ovocyte. La synthèse de ces protéines particulières conduit alors à l'activation de Cdk1, suivie par GVBD et la métaphase I. Cette dépendance de la reprise de la méiose vis à vis de la traduction n'est pas conservée chez toutes les espèces. De nombreux invertébrés et certains vertébrés, comme les petits rongeurs, dont la souris, réalisent GVBD en absence de toute synthèse protéique. Cependant, chez la souris, celle-ci devient nécessaire après GVBD pour organiser le fuseau de division de métaphase I (Ledan *et al.*, 2001). Après la métaphase I, la synthèse de nouvelles protéines est indispensable pour la progression de l'ovocyte dans la seconde division méiotique quelle que soit l'espèce considérée.

a) La chute de l'AMPc et l'inhibition de PKA

Dans l'ovocyte de xénope, l'un des premiers évènements intracellulaires bien décrit et déclenché par la progestérone est une chute de 20% de l'AMPc suite à l'inhibition de l'AC, sans intervention d'une régulation de l'activité des PDEs (Mulner *et al.*, 1980; Mulner *et al.*, 1979; Sadler and Maller, 1981; Sadler and Maller, 1983). La chute de l'AMPc intervient dans la demi-heure qui suit la stimulation hormonale (Cicirelli and Smith, 1985; Maller *et al.*, 1979; Mulner *et al.*, 1979; Thibier *et al.*, 1982) (Nader *et al.*, 2016). Elle est immédiatement suivie par l'inhibition totale de PKA qui demeure ensuite inactive tout au long de la maturation méiotique (Wang and Liu, 2004) (Figure 11).

La chute de l'AMPc et l'inhibition de PKA sont nécessaires et suffisantes pour déclencher la reprise de la méiose et activer Cdk1 chez le xénope. En effet, le maintien artificiel de niveaux élevés en AMPc (inhibition des PDEs avec le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) ou la théophylline ; ou activation des ACs par la forskoline et la toxine cholérique) ou la surexpression de la sous-unité PKAc bloquent la reprise de la méiose en réponse à la progestérone (Maller *et al.*, 1979; Mulner *et al.*, 1979; Sadler and Maller, 1983). A l'inverse,

l'inhibition directe de PKAc en injectant PKAr ou son inhibiteur protéique, PKI (PKA inhibitor), induit la reprise de la méiose et l'activation de Cdk1 en absence de stimulation hormonale (Huchon *et al.*, 1981b; Maller and Krebs, 1977) (Figure 11). De manière surprenante, il a été proposé que l'activité de PKAc ne soit cependant pas nécessaire pour l'activation de Cdk1. En effet, la surexpression d'une forme inactive de PKA, le mutant K72R, est capable d'inhiber la reprise de la méiose induite par la progestérone (Schmitt and Nebreda, 2002), suggérant que PKA exerce son action inhibitrice sur la maturation méiotique, indépendamment de son activité catalytique, en séquestrant des acteurs clés de l'activation de Cdk1. Depuis, il a été établi que le mutant K72R n'est pas totalement inactif et qu'il séquestre PKAr, interdisant ainsi la chute d'activité PKA induite par la progestérone. Il agit donc en maintenant un fort taux d'activité PKA, ce qui explique l'inhibition de la méiose (Eyers *et al.*, 2005). L'activité catalytique de PKA est donc bien au centre de son action inhibitrice sur la division méiotique. Plus récemment, il a été proposé que la progestérone à de fortes concentrations soit capable d'induire l'activation de Cdk1 indépendamment de la chute des niveaux intracellulaires en AMPc et de l'inhibition de PKA (Nader *et al.*, 2016). Cette conclusion est principalement basée sur le fait que l'injection de PKI n'est pas capable d'induire la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale alors que, dans ce même article, 25% des ovocytes atteignent néanmoins GVBD (Nader *et al.*, 2016). Il est donc possible que la progestérone à des doses sub-luminaires (10 μ M) puisse déclencher un mécanisme alternatif à la chute des niveaux en AMPc et à l'inhibition de PKA. Comme proposé par les auteurs, ce mécanisme serait fonction du trafic intracellulaire vésiculaire et du métabolisme des lipides, deux processus modifiés lors de la reprise de la méiose (Coll *et al.*, 2007; De Smedt *et al.*, 1995; Morrill and Kostellow, 1998; Mulner-Lorillon *et al.*, 1995; Nader *et al.*, 2016; Nader *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces résultats établissent cependant clairement que l'inhibition de PKA est cruciale pour l'activation de Cdk1 et ouvrent la voie à de nouvelles questions. Comment PKA peut-elle être inactivée totalement alors que le niveau intracellulaire en AMPc ne chute que de 20% ? Les expériences réalisées avec PKI indiquent que cet inhibiteur induit la reprise de la méiose de manière dose-dépendante (Huchon *et al.*, 1981b). De même, l'efficacité de la reprise de la méiose, estimée par la vitesse d'apparition de GVBD, est fonction de la concentration externe en progestérone. Chez une même femelle, GVBD apparaît plus rapidement en réponse à une concentration de 10 μ M de progestérone qu'à la dose physiologique de 1 μ M. Des concentrations de l'ordre de 10 nM sont incapables d'induire GVBD. Mais lorsqu'une pré-incubation en présence de 10 nM de progestérone est suivie par l'addition de 1

μM de progestérone, GVBD survient de manière accélérée par rapport aux contrôles n'ayant pas été pré-incubés avec l'hormone. Enfin, l'inhibition de PKA par PKI facilite la reprise de la méiose en réponse à la progestérone (Nader *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que le degré d'inhibition de PKAc détermine la vitesse d'activation de Cdk1, qui est fonction de l'amplitude de la chute en AMPc, elle-même proportionnelle à la concentration externe en progestérone. Si l'inhibition de PKA est en revanche totale, les différentes concentrations en progestérone et l'injection de PKI en présence de progestérone ne devraient pas influencer sur la vitesse d'apparition de GVBD. En lien avec cette première question, les expériences d'activation et d'inactivation de PKA suggèrent que cette kinase bloque l'activation de Cdk1 en phosphorylant un ou plusieurs substrats dans l'ovocyte de xénope. En réponse à la progestérone, la déphosphorylation précoce de ce(s) substrat(s) dans l'heure qui suit la stimulation hormonale lance alors la voie de signalisation qui autorise plusieurs heures plus tard l'activation de Cdk1. Chez le xénope, l'un de ces substrats correspond à Arpp19 (Voir chapitre IV) (Dupré *et al.*, 2014). Cette protéine est phosphorylée par PKA en prophase. Sa déphosphorylation en réponse à la progestérone est partielle, de l'ordre de 40 à 50%. Elle dépend de l'inhibition de PKA et est proportionnelle à la concentration externe en progestérone, en accord avec une inhibition partielle de l'activité de PKA à une concentration de $1\mu\text{M}$ (Dupré *et al.*, 2014). Enfin, certaines données de la littérature suggèrent que les niveaux intracellulaires en AMPc chutent de manière transitoire lors de la reprise de la méiose (Maller *et al.*, 1979; Nader *et al.*, 2016; Cicirelli and Smith, 1985). Si tel est le cas, pourquoi PKA n'est-elle donc pas réactivée lors de la maturation méiotique chez le xénope ? Chez la souris et le porc, la localisation de PKA est cruciale pour la reprise de la méiose et dépend de son association aux protéines de la famille des AKAPs (A kinase-anchoring protein) (Newhall *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2013). Lors des premières étapes de la reprise de la méiose dans l'ovocyte de souris, l'association de PKAc à AKAP1 délocalise la kinase du cytoplasme vers la surface des mitochondries (Newhall *et al.*, 2006). Cette relocalisation de PKA agit comme un "switch" dans la reprise de la méiose car elle permet à PKA de ne plus être soumise à sa régulation par l'AMPc. Ce type de mécanisme pourrait être fonctionnel chez le xénope, ce qui contribuerait à maintenir PKAc inactive tout au long de la maturation.

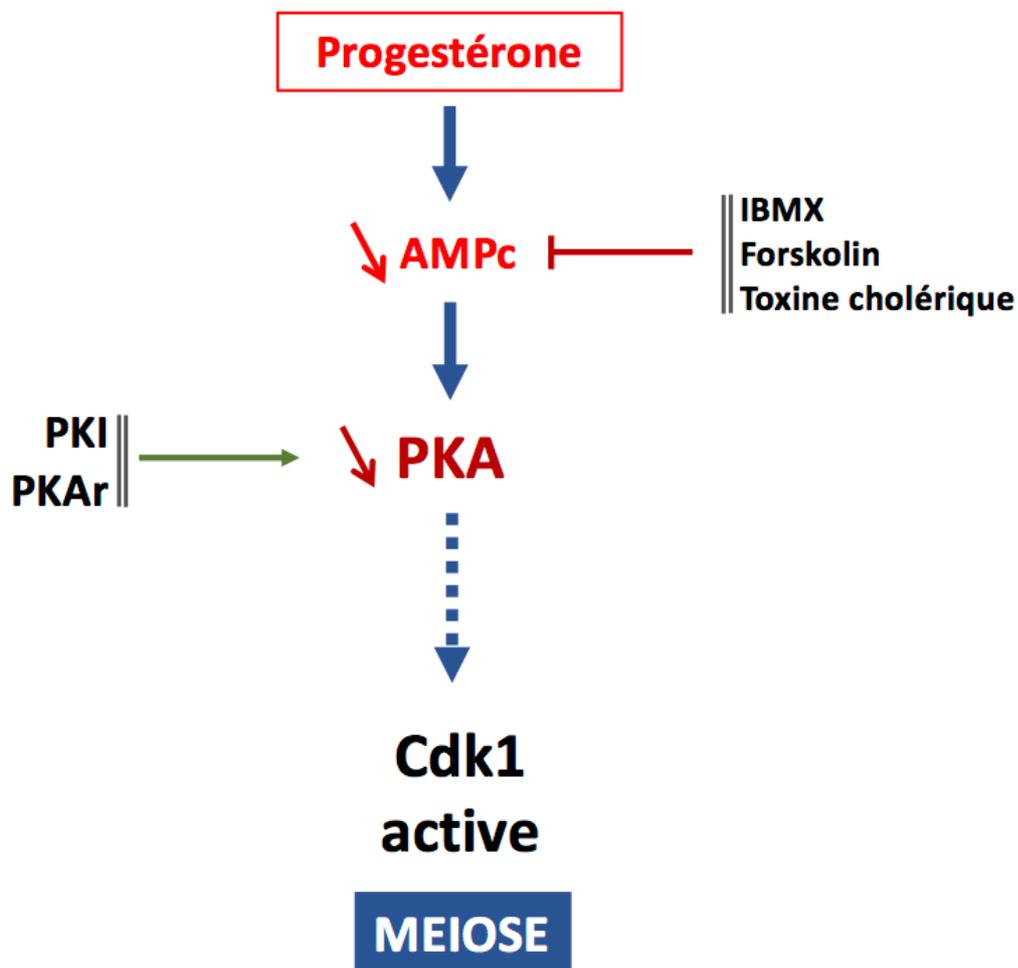


Figure 11 : La chute des niveaux intracellulaires en AMPc et l'inhibition de PKA sont les deux évènements nécessaire pour activer Cdk1 en réponse à la progestérone

La progestérone déclenche une voie de signalisation de plusieurs heures qui aboutit à l'activation de Cdk1 et à l'entrée en métaphase I. Cette hormone agit par l'intermédiaire d'un récepteur encore inconnu et provoque la chute de la concentration intracellulaire en AMPc dans les 30 minutes. La chute des niveaux en AMPc conduit à l'inhibition de l'activité de PKA, deux évènements nécessaires et suffisants pour la reprise de la méiose. Ainsi, le maintien de niveaux élevés en AMPc avec de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), de la forskolin ou de la toxine cholérique bloque la reprise de la méiose en réponse à la progestérone. A l'inverse, l'inhibition de PKA en surexprimant sa sous-unité régulatrice, PKAr, ou son inhibiteur spécifique, PKI, provoque la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale.

b) La synthèse de nouvelles protéines critiques pour l'activation de Cdk1

Bien que la cascade moléculaire qui relie PKA à Cdk1 reste mal connue, l'inhibition de PKA régule positivement la traduction de certaines protéines spécifiques dans l'ovocyte de xénope. Chez le xénope, de nombreuses protéines sont synthétisées lors de la reprise de la méiose et différents groupes peuvent être distingués sur le plan temporel et fonctionnel : quelques protéines requises pour activer Cdk1 ; des protéines régulant la transition entre les deux divisions méiotiques puis l'arrêt en métaphase II ; des protéines participant aux premiers cycles embryonnaires après la fécondation. Ajoutons que la traduction est maintenue à un faible niveau en prophase et que l'activité traductionnelle globale de l'ovocyte, concernant l'ensemble des ARNm, est stimulée d'un facteur 5 à 10 à partir de GVBD. Cette stimulation dépend de Cdk1, contribuant à alimenter un stock global de protéines utiles à la vie des cellules embryonnaires.

On attend des protéines dont la synthèse est requise pour activer Cdk1 que l'inhibition de leur traduction (par des oligonucléotides antisens) bloque la reprise de la méiose en réponse à la progestérone ou l'inhibition de PKA par PKI. A l'inverse, l'injection de ces protéines sous forme recombinante, éventuellement active, doit provoquer la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale et indépendamment de la synthèse protéique. Enfin, la traduction de ces nouvelles protéines doit survenir avant et indépendamment de l'activation de Cdk1. Ce type d'expériences a conduit à l'identification de trois protéines présumées requises pour l'activation de Cdk1 : la Cycline B1, la kinase Mos et la protéine Ringo.

i. Les Cyclines

En réponse à la progestérone ou à l'inhibition de PKA, le niveau d'expression de la Cycline B2 (et B5) n'est pas modifié alors que la Cycline B1 (et B4) s'accumule, indépendamment de l'activation de Cdk1 (Haccard and Jessus, 2006) (Frank-Vaillant *et al.*, 1999; Hochegger *et al.*, 2001); (Kobayashi *et al.*, 1991). En revanche, la Cycline B1 ne s'accumule pas en réponse à la progestérone si l'activité PKA est maintenue à un niveau élevé (Frank-Vaillant *et al.*, 1999); (Haccard and Jessus, 2006). L'accumulation de la Cycline B1 est donc fonction de la chute d'activité de PKA et intervient en amont de l'activation de Cdk1 (Figure 12). D'autre part, l'injection de Cycline B recombinante active Cdk1 indépendamment de la progestérone et de la synthèse protéique (Huchon *et al.*, 1993). La Cycline B remplit donc tous les critères en tant que protéine nouvellement synthétisée et initiatrice de la reprise de la

méiose. De manière surprenante cependant, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre les ARNm codants pour les Cyclines B1, B2, B4 et B5 n'empêche pas l'activation de Cdk1 induite par la progestérone ou PKI (Hochegger *et al.*, 2001) (Haccard and Jessus, 2006). Ces résultats indiquent qu'une autre protéine synthétisée est capable d'initier l'activation de Cdk1, en l'absence de synthèse de Cycline. Cette autre protéine pourrait correspondre aux seules Cyclines non-ciblées par les antisens, la Cycline B3 et la Cycline A. La Cycline B3 possède de fortes similarités avec la Cycline A et joue un rôle-clé dans l'initiation de l'anaphase lors des premiers cycles embryonnaires chez la drosophile, lors de la division méiotique de l'ovocyte de souris et dans la spermatogenèse chez plusieurs espèces (Hochegger *et al.*, 2001) (Karasu *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2002; Refik-Rogers *et al.*, 2006; Yuan and O'Farrell, 2015). Il a cependant été montré que la Cycline B3 n'était pas exprimée dans l'ovocyte de xénope (Hochegger *et al.*, 2001). Elle ne peut donc pas compenser la perte des autres Cyclines B. Concernant la Cycline A, son injection provoque l'activation de Cdk1 indépendamment de la progestérone et de la synthèse protéique, très probablement grâce à son association à la forme monomérique de Cdk1 (Roy *et al.*, 1991). Elle serait faiblement exprimée en prophase et s'accumulerait au moment de GVBD, à un niveau moindre comparé aux Cyclines B (Kobayashi *et al.*, 1991). L'inhibition de cette accumulation par des oligonucléotides antisens ne bloque pas l'activation de Cdk1 en réponse à la progestérone (Kobayashi *et al.*, 1991). L'ensemble de ces observations exclut le fait qu'elle puisse suppléer à l'absence d'autres Cyclines et jouer un rôle-clé dans l'activation de Cdk1, même si sa fonction mérite d'être réanalysée, en écho avec les récents travaux sur l'entrée en phase-M dans les cellules humaines (Hégarat *et al.*, 2018).

ii. Mos

La protéine Mos est une sérine/thréonine kinase spécifique de la lignée germinale qui appartient à la famille des MAP kinase kinase kinase (ou MEK kinase) (pour revue, Dupré *et al.*, 2011). Elle phosphoryle et active MEK qui phosphoryle et active la MAPK. En retour, la MAPK phosphoryle et active, entre autres, la protéine p90^{Rsk}. Mos n'est pas exprimée dans l'ovocyte bloqué en prophase. Chez le xénope, elle est synthétisée en réponse à la progestérone mais ne s'accumule que si Cdk1 est active. En effet, cette kinase stabilise Mos par phosphorylation de la S3 (Castro *et al.*, 2001 ; Frank-Vaillant *et al.*, 1999). L'injection de Mos actif, ou des acteurs de la voie Mos/MEK/MAPK/ p90^{Rsk} sous une forme constitutivement active, induit l'activation de Cdk1 en absence de progestérone et de synthèse protéique (Dupré *et al.*, 2011). A l'inverse, l'inhibition de sa traduction avec des oligonucléotides antisens bloque la reprise de la méiose en réponse à la progestérone (Sagata *et al.*, 1988). L'ensemble de ces

résultats avait donc fait émerger la synthèse de Mos et l'activation de la voie Mos/MAPK comme des acteurs incontournables de l'activation de Cdk1 chez le xénope (Figure 12). Ces résultats étaient en contradiction avec les résultats obtenus chez la souris où les KO Mos ou son inhibition par des oligonucléotides ne bloquaient pas la maturation méiotique. Chez cette espèce, le phénotype remarquable généré par l'absence de Mos est l'absence d'arrêt en métaphase II et la réalisation de divisions surnuméraires évoquant une situation parthénogénétique (Dupré *et al.*, 2011).

Chez le xénope, il a par la suite été établi que l'inhibition pharmacologique de MEK retarde l'activation de Cdk1 mais ne la bloque pas et que la voie Mos/MAPK n'est pas activée en réponse à la progestérone lorsque l'activation de Cdk1 est directement bloquée par la protéine p21^{Cip1} (Frank-Vaillant *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2000). Dans ces conditions, Mos ne s'accumule pas, contrairement à la Cycline B1 (Frank-Vaillant *et al.*, 1999). Ces résultats indiquaient que si la synthèse de Mos est requise pour activer Cdk1, sa seule cible, la MAPK ne l'est pas. L'injection d'oligonucléotides morpholinos antisens a finalement permis d'exclure Mos en tant qu'unique protéine synthétisée responsable de la reprise de la méiose (Dupré *et al.*, 2002; Haccard and Jessus, 2006). L'utilisation de morpholinos bloque efficacement la synthèse de Mos et l'activation de la MAPK mais les ovocytes reprennent la méiose en réponse à la progestérone ou à PKI, même si la cinétique de la maturation est retardée (Dupré *et al.*, 2002; Haccard and Jessus, 2006). Si les Cyclines et Mos ne sont pas les agents en jeu, quelle peut être la protéine dont la synthèse est requise pour l'activation de Cdk1 en réponse à la progestérone ?

iii. RINGO/Speedy

Le dernier candidat proposé correspond à la protéine RINGO/Speedy (rapid inducer of G2/M in oocyte) (Ferby *et al.*, 1999; Lenormand *et al.*, 1999). Chez le xénope, RINGO/Speedy est synthétisée en réponse à la progestérone (Lenormand *et al.*, 1999). Si l'inhibition de sa traduction avec des antisens oligonucléotides ralentit la reprise de la méiose, elle ne la bloque pas (Ferby *et al.*, 1999; Lenormand *et al.*, 1999). A l'inverse, sa surexpression dans des ovocytes en prophase induit la reprise de la méiose indépendamment de la progestérone et des synthèses protéiques (Ferby *et al.*, 1999; Lenormand *et al.*, 1999). RINGO/Speedy active Cdk1 par un mécanisme original. Elle s'associe à Cdk1 monomérique, l'activité des complexes Cdk1-RINGO ne requiert pas la phosphorylation de Cdk1 sur T161 et ces complexes ne sont pas

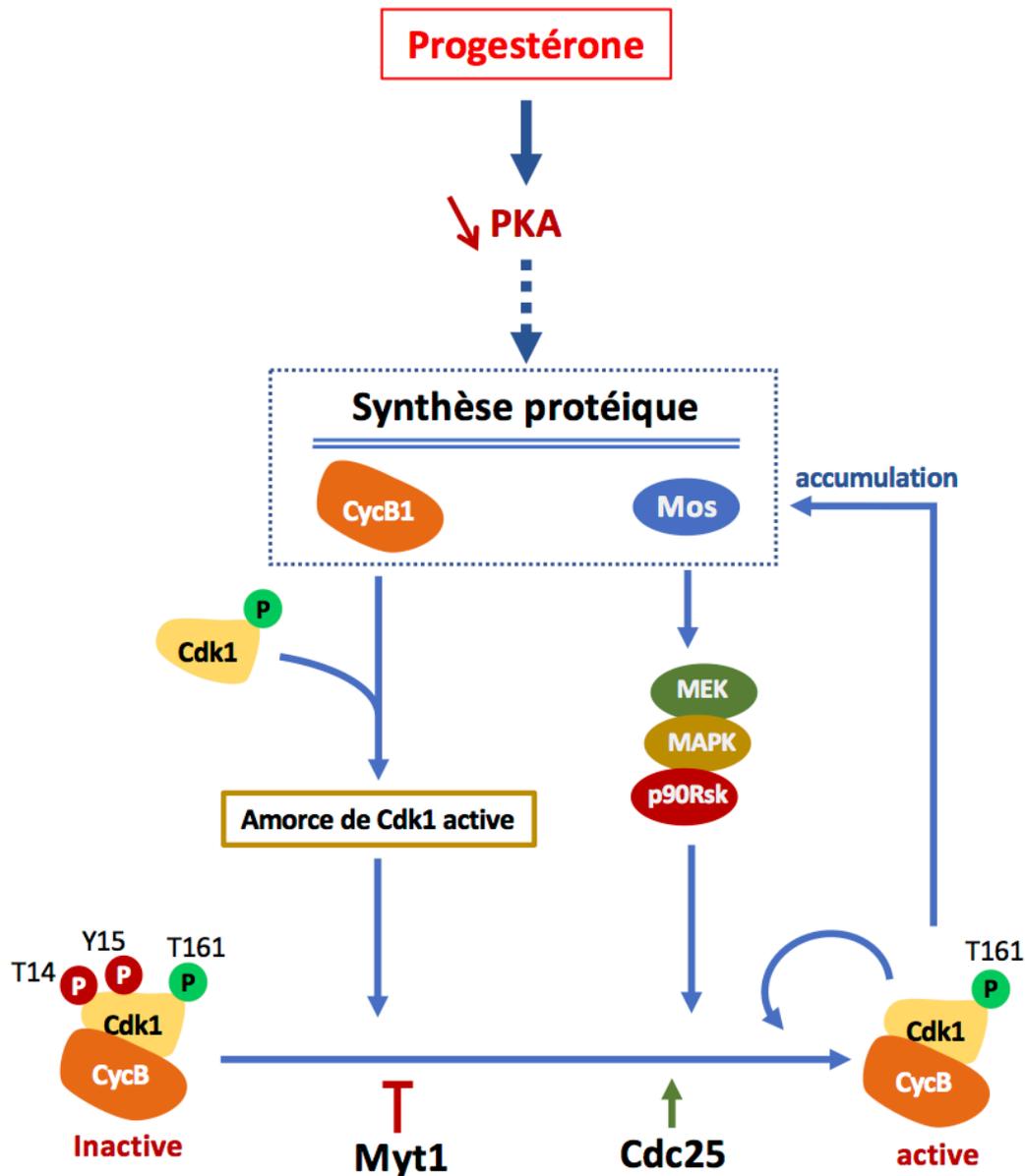


Figure 12 : Rôle de la synthèse protéique dans l'activation initiale de Cdk1

L'inhibition de PKA en réponse à la progestérone régule positivement la synthèse de deux nouvelles protéines dont l'accumulation est requise pour l'activation de Cdk1 : la Cycline B1 et la kinase Mos, responsable de l'activation de la voie Mos/MAPK (Mos-MEK-MAPK-p90^{Rsk}). En s'associant avec la forme monomérique de Cdk1, la Cycline B1 permet la formation de nouveaux complexes Cdk1-Cycline B qui échappent à l'action inhibitrice de Myt1 et sont actifs. En parallèle, l'activation de la voie Mos/MAPK participe à l'activation de Cdk1 en inhibant Myt1 et en activant Cdc25. La Cycline B1 et par Mos sont donc fonctionnellement redondantes dans l'ovocyte de xénope et permettent l'activation de Cdk1 selon deux mécanismes distincts.

inhibés par Myt1 (Gastwirt *et al.*, 2007; Karaiskou *et al.*, 2001). RINGO/Speedy apparaissait donc comme le meilleur candidat dont la synthèse est requise pour activer Cdk1. Les résultats de 1999 n'ont néanmoins pas été reproduits par différentes équipes qui, soit n'ont pas réussi à détecter la protéine dans l'ovocyte, soit n'ont pas observé d'effet sur la maturation méiotique après l'injection d'antisens. L'une des deux équipes à l'origine de la découverte de RINGO/Speedy a ensuite montré que la protéine ne s'accumulait pas mais était au contraire déjà présente dans l'ovocyte en prophase (Gutierrez *et al.*, 2006). Par ailleurs, phosphorylée par PKA, elle maintiendrait le blocage en prophase en participant à l'inhibition de Myt1, nécessaire pour l'activation de Cdk1 (Gutierrez *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2008). Les études de RINGO/Speedy se sont un peu poursuivies chez les mammifères, ne faisant apparaître aucun rôle sur les divisions méiotiques de l'ovocyte chez la souris et l'homme. Les études de ce qui était apparu comme un candidat particulièrement prometteur n'ont finalement pas été poursuivies.

iv. Deux protéines, deux voies fonctionnellement redondantes

La recherche des protéines dont la synthèse est requise pour l'activation de Cdk1 a finalement abouti à la proposition que la Cycline B1 et Mos soient les deux protéines dont la synthèse permet l'activation de Cdk1 (Haccard and Jessus, 2006). En effet, si l'inhibition de l'une ou l'autre de ces deux traductions ne bloque pas l'activation de Cdk1, l'inhibition simultanée des deux, Cycline B1 et Mos, bloque la reprise de la méiose en réponse à la progestérone et à PKI (Haccard and Jessus, 2006). Dans ces conditions, l'injection soit de Mos, soit de Cycline B1 suffit à restaurer l'activation de Cdk1, et cela indépendamment de toute autre synthèse protéique (Haccard and Jessus, 2006). Cela montre que si l'une des deux protéines n'est pas synthétisée, la traduction de l'autre compense cette absence et conduit à la reprise de la méiose. La progestérone provoque donc la synthèse de Cycline B1 et de Mos qui conduisent à l'activation de Cdk1, chacune de ces deux protéines agissant de façon distincte pour activer Cdk1. Au final, cette redondance des voies menant à l'activation de Cdk1 confère une grande robustesse au processus qui se déroulera correctement même en cas de défaut dans l'une de ces deux voies (Figure 12).

3. Mécanisme d'activation de Cdk1 en deux étapes

Dans l'ovocyte de xénope, une longue période de latence de 3 à 5h sépare la stimulation hormonale de l'activation de Cdk1. Cette dernière opérerait selon un mécanisme en deux étapes : la formation d'une amorce de Cdk1 active puis le déclenchement de la boucle

d'autoamplification. La formation de l'amorce de Cdk1 est le résultat de la mise en place de la voie de signalisation initiée par la progestérone qui démarre avec l'inhibition de PKA, se poursuit avec la synthèse de protéines-clés, et implique la forme monomérique de Cdk1. La boucle d'auto-amplification est déclenchée par l'existence de l'amorce. Si cette amorce est présente, la boucle peut fonctionner indépendamment des événements de la signalisation, c'est à dire de l'activité de PKA et des synthèses protéiques. Elle repose sur une modification de l'équilibre entre les activités de Myt1 et de Cdc25 en faveur de cette dernière. Comme en mitose, elle dépend de l'activité de Cdk1 à laquelle s'associent d'autres kinases : Mos, MAPK, Plx1 (Polo-like kinase 1 chez le xénope), et l'inhibition de la phosphatase 2A comme nous l'avons déjà évoqué.

De manière intéressante, la reprise de la méiose dans l'ovocyte de xénope peut être induite soit par l'amorce, soit par un élément intervenant dans la boucle d'auto-amplification qui lui permet de se mettre à fonctionner. La progestérone, l'inhibition de PKA, l'accumulation endogène des Cyclines B et/ou de Mos ou la surexpression des Cyclines A/B et de Mos génèrent une amorce de Cdk1 active. La boucle d'auto-amplification est directement activée en l'absence d'amorce par le transfert de cytoplasme d'ovocytes bloqués en métaphase II, l'inhibition des phosphatases avec l'acide okadaïque ou l'injection de Cdc25. Cdk1 est alors activée en présence d'une forte activité de PKA et indépendamment des synthèses protéiques (CHX) (Cormier *et al.*, 1990; Goris *et al.*, 1989; Masui and Markert, 1971; Rime *et al.*, 1994).

a) L'activation initiale de Cdk1

Contrairement à la mitose, l'activation initiale de Cdk1 chez le xénope semble indépendante de la Cycline A. Outre sa faible accumulation en réponse à la progestérone, l'inhibition de sa traduction avec des oligonucléotides ne bloque pas la reprise de la méiose (Kobayashi *et al.*, 1991). En revanche, et comme nous l'avons vu précédemment, l'accumulation des Cyclines B, en particulier celle de B1 et de B4, est l'événement majeur pour activer Cdk1 (Haccard and Jessus, 2006). De façon intéressante, l'injection d'une forme dominante-négative de Cdk1 (Cdk1-K33R) bloque la reprise de la méiose en séquestrant les Cyclines B nouvellement synthétisées (Nebreda *et al.*, 1995). De plus, bien que Mos soit capable d'induire la reprise de la méiose et de compenser la perte des Cyclines, cette protéine est peu efficace en absence de synthèse protéique. Elle nécessite en effet l'addition de progestérone à une dose sous-luminaire pour activer Cdk1 en l'absence de synthèse protéique, et donc d'un acteur inconnu qui apparaît en réponse à une faible dose d'hormone (Sagata *et al.*, 1989a; Sagata *et al.*, 1988). L'ensemble de ces éléments suggèrent que les nouvelles molécules

de Cycline B1 s'associent à la forme libre de Cdk1, déjà phosphorylée sur T161, ce qui génère la formation de nouveaux complexes Cdk1-Cycline B1 directement actifs (Figure 12). Pour former cette amorce active, il faut donc que ces néocomplexes échappent aux phosphorylations inhibitrices de Cdk1 sur T14 et Y15 qui sont catalysées par la kinase Myt1, qui est active dans l'ovocyte tout au long de leur formation en réponse à la progestérone (Gaffre *et al.*, 2011).

i. L'inhibition de Myt1

L'analyse de la phosphorylation de Myt1 et de Cdc25 en réponse à la progestérone indique que la phosphorylation de ces deux enzymes est temporellement dissociée lors de la reprise de la méiose. Myt1 est phosphorylée et donc inhibée avant la mise en place des phosphorylations activatrices de Cdc25 (Gaffre *et al.*, 2011). Cette hyperphosphorylation de Myt1 se fait tardivement dans la voie de signalisation et correspond au moment où l'accumulation de Cycline B1 devient maximale. Il a donc été proposé que l'activité de Myt1 soit inhibée directement par l'activité des complexes Cdk1-Cycline B1 néoformés (Gaffre *et al.*, 2011). En accord avec cette hypothèse, l'hyperphosphorylation de Myt1 est indépendante de la voie Mos/MAPK et de l'activité de Plx1 mais est strictement sous le contrôle des synthèses protéiques, suggérant l'implication des Cyclines nouvellement accumulées (Gaffre *et al.*, 2011). Au final, l'amorce constituée des néocomplexes Cdk1-Cyclines B1 échappe à l'action inhibitrice de Myt1. L'amorce est donc capable d'inhiber Myt1 plus rapidement que d'être inhibée par cette kinase ! Le mécanisme sous-jacent est encore inconnu : repose-t-il sur une localisation intracellulaire particulière des acteurs, ou sur des affinités différentielles entre complexes formés des différentes Cyclines B1 et B2 vis-à-vis de Myt1 ?

Cependant, l'inhibition de la traduction des Cyclines B n'inhibe pas entièrement la phosphorylation de Myt1, suggérant qu'un second acteur participe à son inhibition (Gaffre *et al.*, 2011). Cette seconde protéine pourrait correspondre à Mos dont la synthèse n'est pas inhibée dans ces conditions. La progestérone pourrait permettre la production de quelques molécules de Mos capables d'inhiber Myt1 (Peter *et al.*, 2002). Cet effet de Mos sur les régulateurs directs de Cdk1 est alors indépendante de ses substrats car Mos n'est pas stabilisé en absence d'activité Cdk1 (Castro *et al.*, 2001; Frank-Vaillant *et al.*, 1999). Outre Mos, la Cycline A pourrait également contribuer à l'inhibition de Myt1 bien qu'aucune donnée de la littérature n'étaye cette hypothèse. Enfin, RINGO/Speedy, complexée à Cdk1, pourrait inhiber Myt1 (Ruiz *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010), même si l'expression de cette protéine dans l'ovocyte soit controversée comme nous l'avons déjà vu. Dans l'ovocyte d'étoile de mer, la phosphorylation inhibitrice de Myt1 est sous le contrôle de la kinase SGK (serum- and

glucocorticoid-kinase), dont la fonction régulatrice lors de la reprise de la méiose n'a pas été mise en évidence dans les autres espèces (Hiraoka *et al.*, 2019). Chez la souris, comme nous l'avons vu, la fonction de Myt1 est assumée par Wee1 qui est directement inhibée par PKA (Han and Conti, 2006). Chez le xénope, rien ne vient soutenir un rôle direct de PKA sur Myt1.

ii. Cdc25 : PKA et Plx1

Cdc25 est phosphorylée par PKA sur la S287 dans l'ovocyte en prophase (Duckworth *et al.*, 2002). Cette phosphorylation bloque son efficacité, comme en atteste l'injection de la forme mutée de Cdc25, Cdc25-S287A, qui induit la reprise de la méiose plus efficacement que la forme sauvage de Cdc25 (Duckworth *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1999). La phosphorylation de la S287 n'a pas d'impact sur l'activité catalytique de Cdc25 mais affecte son interaction avec la protéine 14-3-3 qui commande son import-export dans le noyau. Ce trafic nucléocytoplasmique serait important pour que Cdc25 soit en contact avec son substrat, Cdk1. On peut néanmoins s'interroger sur la signification biologique de cette régulation dans l'ovocyte de xénope puisque la progestérone est capable d'activer Cdk1 même dans des ovocytes énucléés (Reynhout and Smith, 1974; Schorderet-Slatkine and Drury, 1973). Le noyau ne joue donc pas de rôle instrumental dans l'activation de Cdk1 chez le xénope, contrairement à ce qui se passe dans d'autres espèces, comme l'étoile de mer (Kishimoto *et al.*, 1981; Okumura *et al.*, 2014; Picard and Doree, 1984). Cdc25-S287A active Cdk1 en présence d'une forte activité de PKA, contrairement à la forme sauvage qui perd son potentiel d'inducteur (Duckworth *et al.*, 2002) (Rime *et al.*, 1994). La déphosphorylation de Cdc25 sur la S287 suite à l'inhibition de PKA a donc été proposée comme l'un des mécanismes leviers permettant l'activation initiale de Cdk1. En accord avec cette hypothèse, Cdc25 est déphosphorylée sur la S287, vraisemblablement par la phosphatase PP1, lors de la reprise de la méiose induite par la progestérone ou par PKI (Duckworth *et al.*, 2002; Margolis *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1999). De manière surprenante cependant, la déphosphorylation de Cdc25 dépend de la synthèse protéique et de l'activation de Cdk1 (Duckworth *et al.*, 2002). La déphosphorylation de Cdc25 n'interviendrait donc qu'en toute fin de signalisation, sous le contrôle de Cdk1, pour participer à l'auto-amplification du MPF.

La kinase Plx1 a également été proposée comme la kinase initiatrice de l'activation de Cdk1 en contribuant aux phosphorylations activatrices de Cdc25. L'injection de différentes formes de Plx1 recombinante et d'anticorps bloquants sont capables de provoquer la reprise de la méiose ou de la bloquer (Qian *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1999). Cependant, s'il est bien établi que la phosphorylation de Cdc25C par Plx1 est essentielle au fonctionnement de la boucle

d'auto-amplification dans des extraits de xénope (Karaiskou *et al.*, 1998; Karaiskou *et al.*, 1999), la phosphorylation activatrice de Plx1 n'est jamais observée *in vivo* lorsque l'activation de Cdk1 est bloquée avec la protéine p21^{Cip1} (Karaiskou *et al.*, 1998). En extraits de xénope, l'activation de Plx1 dépend de sa phosphorylation sur la S340 par les complexes Cdk1-Cyclines B (Abrieu *et al.*, 1998; Kelm *et al.*, 2002); (Perdiguero and Nebreda, 2004). Ces résultats suggèrent que l'activation de Plx1 dépend de l'activation initiale de Cdk1 et participe à la boucle d'auto-amplification dans l'ovocyte de xénope, un effet distinct de son rôle d'initiateur de la transition G2/M décrit dans certaines lignées cellulaires ou dans les extraits de xénope. Enfin, dans l'ovocyte d'étoile de mer, SGK active Cdc25 (Hiraoka *et al.*, 2019). Dans cette espèce, l'activation de Cdk1 dépend donc directement de l'action de SGK qui conjointement cible les deux régulateurs de Cdk1.

Pour conclure, il est vraisemblable que dans l'ovocyte de xénope, l'activation de Cdc25 s'inscrit dans la boucle d'auto-amplification. Cdc25 est d'abord la cible de l'amorce active de Cdk1-Cycline B1, puis celle des complexes Cdk1-Cyclines B2 et Plx1 au sein de la boucle elle-même. On ne peut exclure que la voie Mos/MAPK participe à l'activation de Cdc25. Aucun élément de la littérature ne supporte directement cette hypothèse mais Cdc25 n'est que partiellement phosphorylée en réponse à la progestérone si la voie Mos/MAPK est inhibée (Gaffre *et al.*, 2011). De plus, en l'absence de synthèse de Cyclines, aucun néocomplexe Cdk1 ne se forme or Mos permet l'activation de Cdk1. La seule façon d'activer Cdk1 est alors de déphosphoryler quelques complexes Cdk1-Cycline B2 phosphorylés sur T14 et Y15 déjà stockés en prophase et pour cela, il faut recruter Cdc25. Et sans nouvelles Cyclines, seul Mos permet cette action. Il faudrait donc approfondir la connexion entre la voie Mos/MAPK et Cdc25.

b) L'auto-amplification de Cdk1

L'auto-amplification des complexes Cdk1-Cycline B repose sur la capacité de ces complexes à réguler leurs propres régulateurs, Cdc25 et Myt1. L'efficacité du rétrocontrôle est d'autant plus grande que les complexes Cdk1-Cycline B activent d'autres kinases qui participent aussi à la régulation de Cdc25 et Myt1. La boucle dépend donc de l'activation des complexes Cdk1-Cycline B et de kinases dont l'activation est elle-même sous le contrôle de de Cdk1 : Plx1, Aurora A, la voie Mos/MAPK et Greatwall (Figure 13). Comme attendu, l'injection des différents acteurs de cette boucle sous leur forme active provoque directement l'activation de Cdk1 par l'intermédiaire de la boucle.

Le transfert de cytoplasme d'un ovocyte bloqué en métaphase II, ou l'injection d'acide okadaïque, qui inhibe PP2A, activent la boucle même en présence de niveaux élevés d'AMPc (Cormier *et al.*, 1990; Goris *et al.*, 1989; Masui and Markert, 1971). Mais de manière surprenante, aucune des kinases impliquées dans ce processus, Mos, Plx1, Cdc25, Cycline B (qui s'associe à Cdk1) ou Greatwall, ne sont capables d'activer Cdk1 si PKA est maintenue artificiellement active. Ces résultats suggèrent qu'un autre acteur, inconnu, est requis pour rendre ce processus indépendant de PKA. Cette question n'est cependant pas critique puisque PKA n'est pas active au moment où la boucle se met en place (Wang *et al.*, 2006; Wang and Liu, 2004). Par ailleurs, si on élève artificiellement le niveau de PKA à ce moment, la boucle fonctionne néanmoins et Cdk1 est activée (Wang *et al.*, 2006).

i. Régulation de Cdc25

Outre la déphosphorylation de la S287, Cdc25 est phosphorylée et activée par de multiples kinases : Cdk1, la MAPK et son substrat p90^{Rsk} et Plx1. La phosphorylation par Cdk1 est en grande partie responsable de son statut hyperphosphorylé et supprime les effets inhibiteurs de sa phosphorylation par PKA (Hoffmann *et al.*, 1993). Ainsi, l'injection de Cdc25 sous une forme thiophosphorylée par Cdk1 provoque la reprise de la méiose, qu'elle soit ou non phosphorylée sur S287 (Hoffmann *et al.*, 1993). La phosphorylation de Cdc25 par Cdk1 est donc capable de lever l'effet inhibiteur exercé par PKA sur la phosphatase. Outre Cdk1, la phosphorylation de Cdc25C par la MAPK et par son substrat p90^{Rsk} lors de la reprise de méiose stimule son activité en extraits et dans les ovocytes (Gaffre *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010). Plx1 stimule également l'activation de Cdc25. L'expression d'une forme active de Plx1 induit la phosphorylation et l'activation de Cdc25 et active les complexes Cdk1-Cycline B en absence de stimulation hormonale (Gaffre *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 1998). En revanche, son inhibition par l'injection d'anticorps bloquants, du mutant dominant-négatif N171A, ou de la forme inactive Plx1KD, retardent la reprise de la méiose induite par la progestérone, sans la bloquer toutefois (Qian *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1999). Ces résultats indiquent que Plx1 est un acteur crucial de la boucle auto-amplification dans ce système modèle mais que son action, bien que suffisante, n'est pas nécessaire à l'activation de Cdc25C. D'autres kinases de la famille polo ont été identifiées chez le xénope, Plx2 et Plx3 (Duncan *et al.*, 2001). Ces kinases sont activées simultanément à Cdk1 et leur surexpression sous une forme constitutivement active déclenche l'activation de Cdk1 selon les mêmes caractéristiques que celles observées pour Plx1, suggérant une redondance fonctionnelle entre les différents Plx (Duncan *et al.*, 2001).

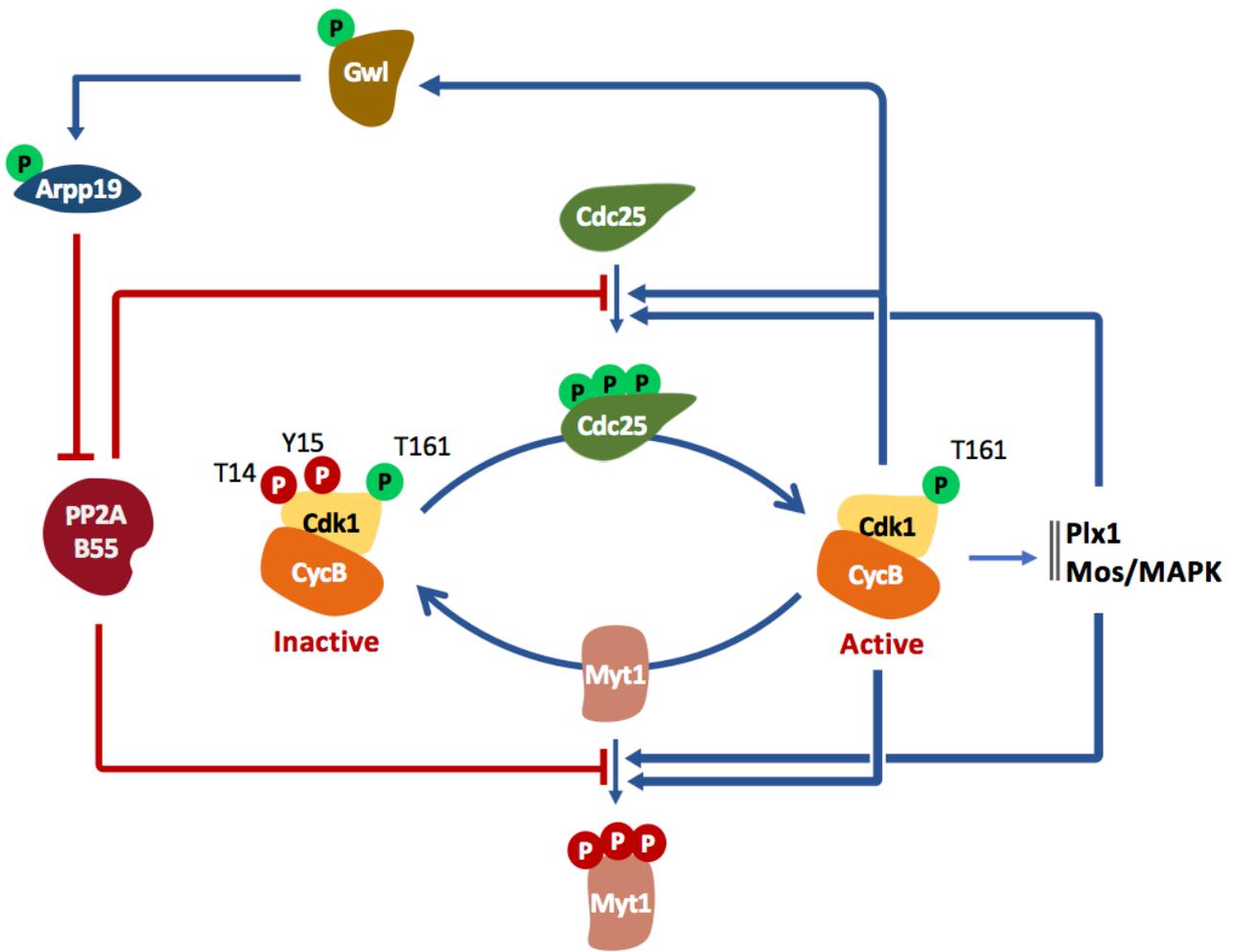


Figure 13 : La boucle d'auto-amplification de l'activité de Cdk1

Une fois activés, les complexes Cdk1-Cycline B activent Cdc25 et inhibent Myt1 par phosphorylation. Ce processus déclenche alors un mécanisme d'auto-amplification de l'activité des complexes Cdk1-Cycline B pour leur activation totale et l'entrée en phase-M. Ce mécanisme fait intervenir d'autres kinases, comme Plx1 et la voie Mos/MAPK, dont l'activation est également sous le contrôle de Cdk1. Pour que la boucle fonctionne, la phosphatase qui contrecarre l'activité de Cdk1, PP2A-B55, doit être inhibée. Son inactivation dépend de l'activation de la kinase Greatwall qui phosphoryle ses substrats ENSA/Arpp19 sur la S67 (numérotation xénopé). ENSA/Arpp19 sont alors convertis en de puissants inhibiteurs de la phosphatase par liaison directe. CycB : Cycline B

Ces autres membres de la famille Plx pourraient contribuer à l'activation totale de Cdc25C en absence de Plx1.

ii. Myt1

Comme nous l'avons vu, l'hyperphosphorylation et l'inhibition de Myt1 dépendent avant tout de l'activité des néo-complexes Cdk1-Cyclines B1 qui sont formés à la suite de l'accumulation des Cyclines B (Gaffre *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 2002). *In vivo*, la voie Mos/MAPK et Plx1 ont été proposées comme participant à cette inhibition (Fisher *et al.*, 1999; Gaffre *et al.*, 2011; Inoue and Sagata, 2005; Palmer *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 2002). Cependant, ni l'inhibition de la voie Mos/MAPK ni celle de Plx1 ne bloquent l'hyperphosphorylation de Myt1 en réponse à la progestérone, contrairement à Cdc25C qui dans ces conditions se retrouve partiellement phosphorylée (Gaffre *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 2002). La phosphorylation par les néocomplexes Cdk1-Cycline B1 semble donc bien être le principal mécanisme responsable de l'inhibition de Myt1.

iii. Inhibition de PP2A-B55δ par Greatwall

On sait depuis longtemps que l'inhibition d'une phosphatase sensible à l'acide okadaïque permet l'activation fulgurante de Cdk1 dans l'ovocyte de xénope (Goris *et al.*, 1989). Des études ultérieures ont montré que cette phosphatase contrôlait la boucle d'auto-amplification et contrecarrait l'activité Cdk1 (Zhao *et al.*, 2008) (Figure 13). Son identité a finalement été révélée, elle correspond à PP2A-B55δ, et son contrôle par la kinase Greatwall élucidé. En réponse à la progestérone, la kinase Greatwall est activée sous le contrôle de l'activation initiale de Cdk1 (Dupré *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Elle phosphoryle alors Arpp19 sur la S67 (Dupré *et al.*, 2013). La phosphatase PP2A-B55δ, en se liant à Arpp19, est inactivée. Cette phosphatase déphosphorylant les résidus qui régulent Cdc25 et Myt1, son inhibition est indispensable pour permettre l'activation de Cdc25 et l'inhibition de Myt1 par Cdk1 (Clarke *et al.*, 1993) (Zhao *et al.*, 2008) (Figure 13). L'inhibition de PP2A-B55δ est suffisante pour déclencher la reprise de la méiose. Ainsi, l'injection de Greatwall sous une forme constitutivement active K71M ou purifiée à partir de cellules SF9 déclenche l'activation de Cdk1 en absence de stimulation hormonale mais selon un mécanisme qui dépend de la synthèse de protéines (Dupré *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que Greatwall, et donc l'inhibition de PP2A-B55δ, peuvent soit directement contrôler la synthèse protéique ; elle serait alors requise pour l'activation initiale de Cdk1 ; soit que la voie Greatwall-PP2A ne peut être fonctionnelle que si Cdk1 est activée. Elle participerait alors à la boucle d'auto-

amplification. L'analyse d'Arpp19 a permis de comprendre le rôle précis et la régulation de cette voie lors de la reprise de la méiose et d'élucider le mécanisme moléculaire permettant à la boucle d'auto-amplification de devenir indépendante de l'activité de PKA (Figure 13). Une fois la kinase Greatwall activée, l'inactivation de PP2A-B55 δ par Arpp19 phosphorylée sur la S67 lance la boucle d'auto-amplification et permet la reprise de la méiose en présence d'une forte activité de PKA (Dupré *et al.*, 2013).

Pour conclure, l'activation de Cdk1 dans l'ovocyte de xénope repose sur deux événements moléculaires principaux. L'accumulation des Cyclines B1 permet d'inhiber en partie la kinase Myt1 par l'intermédiaire des complexes néoformés avec Cdk1. Ces néocomplexes lancent alors les rétrocontrôles positifs qui conduisent à l'activation complète et brutale du stock de Cdk1-Cycline B2 inactif. Ils ciblent alors Cdc25 et Myt1. L'acteur majeur, Cdk1, est alors accompagné par les kinases qu'il a lui-même activées, Plx1, la voie Mos/MAPK ainsi que la kinase Greatwall responsable de l'inactivation de PP2A-B55 δ . L'action coordonnée de ces acteurs permet alors la reprise de la méiose et l'entrée en métaphase I (Figure 13).

D. La transition MI-MII et l'arrêt CSF

1. La transition MI-MII

La transition MI-MII (méiose I-méiose II) est une période cruciale de la maturation méiotique qui réduit la ploïdie ovocytaire. Suite à la séparation des chromosomes homologues et l'expulsion du premier globule polaire, l'entrée en méiose II est très rapide : la réplication de l'ADN est inhibée, les chromosomes ne se décondensent pas, un noyau ne se reforme pas, et de fait, un fuseau de métaphase II se met immédiatement en place. La transition MI-MII est orchestrée par deux activités kinasiques qui sont étroitement interconnectées : celle de Cdk1 et la voie Mos/MAPK.

Entre les deux divisions, la chute transitoire de l'activité de Cdk1 dépend uniquement du turn-over des Cyclines B, et Cdk1 n'est pas inhibé par phosphorylation sur T14 et Y15 (Furuno *et al.*, 1994; Gerhart *et al.*, 1984; Hochegger *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 1991). Comme en mitose, la sortie de la métaphase I dépend de la dégradation des Cyclines B, sous le contrôle de leur ubiquitination par l'APC/C^{Cdc20} (Peter *et al.*, 2001; Taieb *et al.*, 2001). Mais contrairement à une mitose, de nouvelles molécules de Cyclines B (B1, B2, B4 et B5), sont resynthétisées de manière simultanée. Cette dynamique explique la baisse d'activité de Cdk1, qui permet l'anaphase I et l'expulsion du 1^{er} globule polaire, mais également la remontée rapide, sans que le niveau d'activité soit tombé à zéro. La réactivation rapide de Cdk1 assure ainsi une

entrée brutale dans la seconde division méiotique (Hochegger *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2001 ; Taieb *et al.*, 2001). L'activité résiduelle de Cdk1 au moment de l'expulsion du globule polaire est d'ailleurs indispensable pour bloquer l'apparition d'une phase-S intercalaire. Ainsi, l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide en métaphase I, l'inhibition spécifique de la synthèse des Cyclines B avec des oligonucléotides antisens ou l'inhibition de Cdk1 par l'injection du mutant Cdk1-K33R à GVBD entraînent une chute totale de l'activité de Cdk1. Dans ces conditions, les ovocytes entrent dans un état interphasique avec des micronoyaux organisés autour des chromosomes décondensés, épars dans le cytoplasme, où l'ADN est répliqué (Hochegger *et al.*, 2001 ; Huchon *et al.*, 1993 ; Iwabuchi *et al.*, 2000 ; Thibier *et al.*, 1997).

Contrairement à l'activité de Cdk1, la voie Mos/MAPK activée dès GVBD, reste active jusqu'en métaphase II (Dupré *et al.*, 2011). L'inhibition de cette voie dès GVBD, par des oligonucléotides antisens ou l'inhibiteur de MEK, U0126, provoquent l'effondrement de l'activité Cdk1 après la métaphase I (Furuno *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2000). Dans ces conditions, les Cyclines B ne se réaccumulent pas et les ovocytes entrent dans l'état pseudo-interphasique avec réplication, déjà décrit pour l'inhibition de Cdk1 (Furuno *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2000). En revanche, lorsque la voie Mos/MAPK est bloquée dès la prophase par des morpholinos antisens, l'activité de Cdk1 suit un profil normal (Dupré *et al.*, 2002). Cependant, sa réactivation est ralentie par rapport aux ovocytes contrôles, en corrélation avec une réaccumulation lente des Cyclines (Dupré *et al.*, 2002). En outre, les ovocytes répliquent leur ADN génomique (Dupré *et al.*, 2002). La voie Mos/MAPK a donc le potentiel d'inhiber la réplication indépendamment de l'activité de Cdk1. Cette action sur la réplication se fait par l'intermédiaire de la protéine Cdc6, une protéine cruciale des complexes d'initiation de la réplication dans les cellules somatiques. Cette protéine est absente dans l'ovocyte bloqué en prophase et s'accumule entre les deux divisions pour que les ovocytes acquièrent la compétence à répliquer l'ADN (Lemaitre *et al.*, 2002; Whitmire *et al.*, 2002). Cette compétence est requise après la fécondation pour les cycles embryonnaires précoces et doit donc être inhibée dès l'apparition de Cdc6 après la méiose I. La voie Mos/MAPK régule négativement l'accumulation de Cdc6 en induisant indirectement sa dégradation entre les deux divisions méiotiques (Dupré *et al.*, 2011). Elle synchronise ainsi l'acquisition de la compétence à répliquer l'ADN avec son inhibition et l'entrée en méiose II (Daldello *et al.*, 2015). De plus, elle contribue à la réactivation de Cdk1 après la métaphase I en régulant soit directement l'activité de Cdk1 soit la synthèse et la stabilité des Cyclines B. La voie Mos/MAPK, conjointement avec l'activité résiduelle de Cdk1, pourrait tout d'abord inhiber l'activité de

Wee1, qui est synthétisé après la méiose I (Iwabuchi *et al.*, 2000; Nakajo *et al.*, 2000). Elle stabiliserait aussi l'activité de Cdk1, comme cela a été suggéré dans des extraits de xénope (Chau and Shibuya, 1998). La voie Mos/MAPK pourrait directement stimuler la synthèse de Cycline B et/ou inhiber indirectement l'activité de l'APC/C pour préserver une fraction des Cyclines de la dégradation entre les deux divisions (Furuno *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2007; Ohe *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 1997). Cette action sur l'APC/C impliquerait l'inhibiteur de l'APC/C, la protéine Erp1 (Tang *et al.*, 2008).

Si Cdk1 et la voie Mos/MAPK sont les deux activités kinasiques majeures qui orchestrent la transition MI-MII, leurs activités sont interdépendantes l'une de l'autre dès la métaphase I. En effet, l'inhibition de l'une à GVBD provoque l'inactivation de l'autre (Frank-Vaillant *et al.*, 2001; Hohegger *et al.*, 2001). Leur rôle respectif tant sur l'activité de l'APC/C que sur le turnover des Cyclines ou encore sur la réplication de l'ADN n'a toujours pas été totalement élucidé. Il n'en demeure pas moins que la coordination de ces deux activités est indispensable pour orchestrer la transition MI-MII pour supprimer la réplication de l'ADN entre les deux divisions cellulaires et permettre l'entrée rapide dans la métaphase II.

2. Arrêt en métaphase II et fécondation

L'arrêt de l'ovocyte en métaphase II dépend de l'activité du facteur CSF, qui maintient l'activité Cdk1 à un niveau stable et élevé en inhibant l'activité de l'APC/C. CSF bloque ainsi la dégradation des Cyclines qui intervient normalement en métaphase. Cet arrêt est levé par un influx calcique au moment de la fécondation. Chez les vertébrés, les protéines responsables de l'activité CSF correspondent à la voie Mos/MAPK qui cible l'inhibiteur de l'APC/C, Erp1 (Inoue *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007; Ohe *et al.*, 2007 ; Sagata *et al.*, 1989b ; Tang *et al.*, 2008). Chez toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, l'inhibition de la voie Mos/MAPK (antisens morpholinos chez le xénope, antisens ou mutants KO pour Mos chez la souris) empêche le blocage des ovocytes en métaphase II qui enchaînent alors des cycles de divisions de manière analogue à celle d'un œuf fécondé (Dupré *et al.*, 2011).

Le lien moléculaire entre la voie Mos/MAPK et l'APC/C chez les vertébrés est la protéine Erp1. Cette protéine inhibe l'APC/C par compétition directe au niveau de son site actif via la présence d'une D-box dans sa séquence (Ohe *et al.*, 2010) (Figure 14). Au cours de la maturation méiotique, la synthèse d'Erp1 débute dès la métaphase I mais la protéine ne s'accumule que lors de l'entrée en méiose II. En métaphase II, elle est stabilisée, inhibant l'APC/C et stabilisant les Cyclines et donc l'activité Cdk1. Erp1 est dégradée après la fécondation. La stabilité de Erp1 est étroitement régulée lors de la transition MI-MII et en

métaphase II par de multiples phosphorylations sous le contrôle de Cdk1 et de la voie Mos/MAPK/p90^{Rsk} (Dupré *et al.*, 2011) (Figure 14A). Les phosphorylations par Cdk1 adressent Erp1 au protéasome pour sa dégradation alors que celles sous le contrôle de la voie Mos/MAPK/p90^{Rsk} ont un effet antagoniste et stabilisateur (Hansen *et al.*, 2007; Isoda *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2007). En effet, la phosphorylation de Erp1 par p90^{Rsk} (sur S335, T336, S342 et S344) recrute la phosphatase PP2A-B56, qui en retour déphosphoryle les résidus ciblés par Cdk1 (Hansen *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2007; Isoda *et al.*, 2011; Nishiyama *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). Tant que la voie Mos/MAPK est active, les phosphorylations déstabilisatrices de Cdk1 sont donc inefficaces. Erp1 est stabilisé et inhibe ainsi l'APC/C.

Au moment de la fécondation, la kinase CaMKII (Calcium/calmodulin -dependent kinase type II) est activée par le flux calcique et la phosphatase PP2B, ou Calcineurine (CaN) (Lorca *et al.*, 1993; Mochida and Hunt, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007). La CaMKII phosphoryle alors Erp1 sur la T195, ce qui crée un site de liaison pour Plx1, qui phosphoryle à son tour Erp1 sur deux motifs dégron (DSG). Suite à cette phosphorylation par Plx1, le complexe SCF^{b-TRCP} reconnaît et ubiquitine les deux DSG, ce qui adresse Erp1 au protéasome qui dégrade la protéine (Rauh *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2005). Simultanément, la CaN déphosphoryle les résidus inhibiteurs de Cdc20, ce qui active l'APC/C, et déphosphoryle le site d'Erp1 phosphorylé par p90^{Rsk}, la S335 (Heim *et al.*, 2018; Mochida and Hunt, 2007). La CaN empêche ainsi le recrutement de PP2A-B56 et favorise la phosphorylation d'Erp1 par Cdk1, ce qui contribue à sa dégradation (Heim *et al.*, 2018). L'action simultanée de la CaMKII et de la CaN provoque ainsi la dégradation de Erp1 (Figure 14B). L'APC/C est activé et les Cyclines sont dégradées, ce qui permet la sortie de métaphase II.

Dans toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, y compris celles dont les ovocytes s'arrêtent en Métaphase I ou au stade de pronucléus, la voie Mos/MAPK est l'acteur universel du second arrêt dans la progression méiotique ovocytaire. Cependant, chez les espèces qui ne s'arrêtent pas en métaphase II, cette voie cible d'autres acteurs moléculaires qu'Erp1 (Amiel *et al.*, 2009; Dumollard *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2006). Ainsi, chez l'étoile de mer où les ovocytes sont arrêtés en phase G1, au stage pronucléus, Cdk1 est inactive et les ovocytes sont prêts à initier la réplication de l'ADN juste après la fécondation. La voie Mos/MAPK bloque alors par phosphorylation la translocation nucléaire de la protéine Cdc45, un composant essentiel à l'initiation de la réplication tout en inhibant simultanément la synthèse de nouvelles Cyclines A et B par un mécanisme encore inconnu, ce qui empêche ainsi l'entrée dans un nouveau cycle cellulaire.

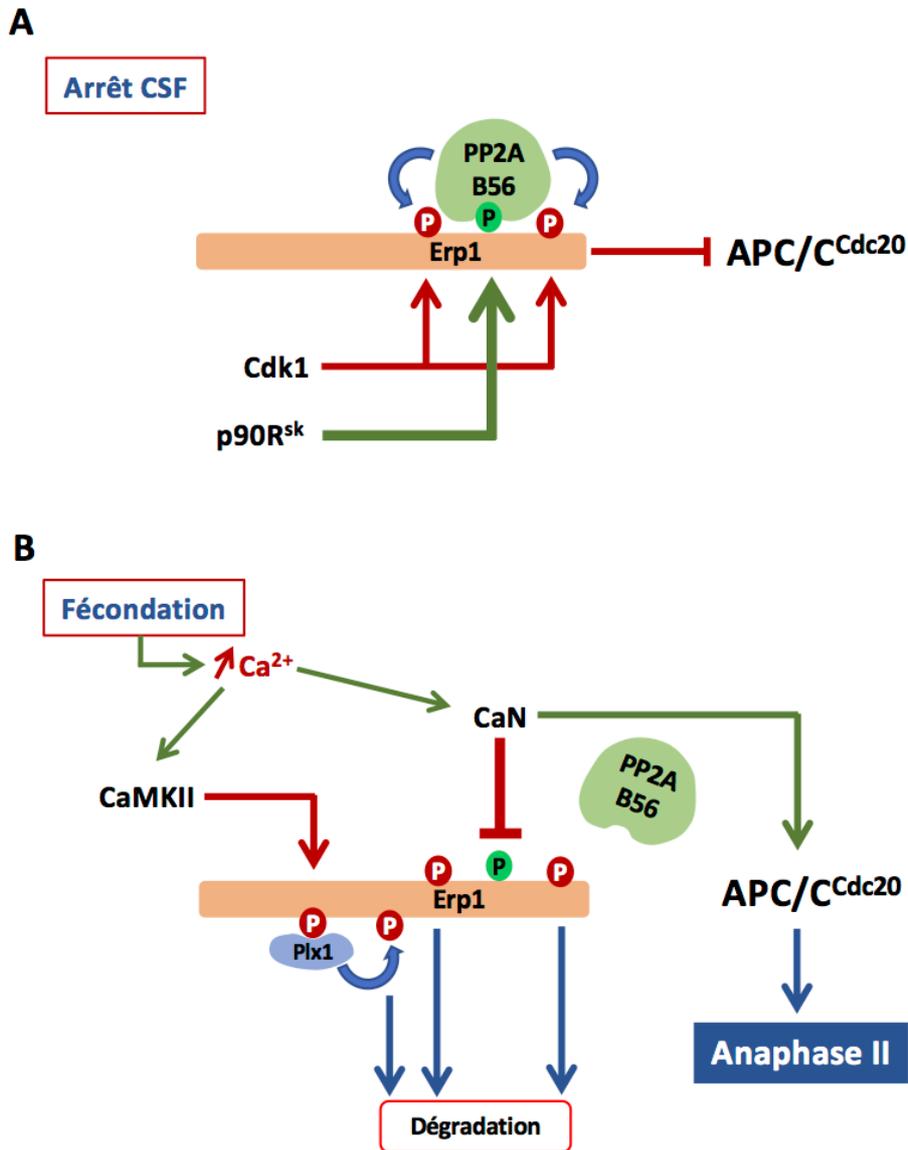


Figure 14 : Erp1 et l'arrêt CSF

L'arrêt CSF et la sortie de métaphase II dépendent principalement de l'activité de l'APC/C et de la stabilité de son inhibiteur Erp1.

A. En métaphase II, Erp1 inhibe l'APC/C^{Cdc20} par interaction directe et maintient ainsi l'activité de Cdk1 à un niveau élevé en bloquant la dégradation des Cyclines. Erp1 est stabilisée par sa phosphorylation catalysée par la protéine p90^{Rsk}, un processus qui antagonise l'effet de ses phosphorylations catalysées par Cdk1 responsables de sa dégradation. La phosphorylation p90^{Rsk} crée un site de liaison pour la phosphatase PP2A-B56, qui déphosphoryle alors les résidus phosphorylés par Cdk1.

B. Au moment de la fécondation, l'influx calcique active la kinase CaMKII et la phosphatase Calcineurine (CaN). CaMKII phosphoryle alors Erp1, ce qui provoque sa liaison à Plx1. Plx1 phosphoryle alors Erp1 sur ses deux motifs dégrons « DSG », permettant son adressage au protéasome par l'E3 ubiquitine ligase SCF^{β-TRCP}. En parallèle, les résidus ciblés par p90^{Rsk} sont déphosphorylés, ce qui dissocie Erp1 de PP2A-B56 d'Erp1 et favorise les phosphorylations inhibitrices de Cdk1. La CaN participe aussi à l'activation de Cdc20. Ces différents mécanismes réactivent l'APC/C et permettent la sortie de métaphase II.

IV. Arpp19, au cœur de la décision cellulaire d'entrer en division

A. La famille des Endosulfines

1. Découverte, expression et localisation

Arpp19 appartient à la famille des Endosulfines qui regroupe 4 protéines : l' α -endosulfine, la β -endosulfine, Arpp19 et Arpp16. L' α -endosulfine (ENSA, aussi appelé Arpp19e) et la β -endosulfine ont initialement été découvertes comme ligands endogènes des récepteurs aux sulfonylurées dans le cerveau et dans les cellules β du pancréas (Virsolvy-Vergine *et al.*, 1992). Arpp19 et Arpp16 ont été identifiées dans le cerveau en tant que substrat de la kinase PKA (Girault *et al.*, 1988; Walaas *et al.*, 1983). Arpp19 et Arpp16 proviennent d'un même gène par épissage alternatif (Hiriuchi *et al.*, 1990). Arpp19/16 et ENSA sont codés par 2 gènes paralogues qui dérivent de la duplication d'un gène ancestral chez les bilatériens (Hached *et al.*, 2019). Il existe aussi deux autres protéines substrats de PKA qui sont exprimées dans le cerveau, DARP32 et Arpp21, mais leur séquence étant fort éloignée de celles des Endosulfines, elles n'ont pas été intégrées à cette famille (Brene *et al.*, 1994). Le niveau d'expression d'ENSA et de Arpp19/16 varient selon le tissu, le type cellulaire et l'espèce (Cundell *et al.*, 2013; Dulubova *et al.*, 2001 ; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Chez les mammifères, Arpp16 est principalement exprimée dans le système nerveux central, au niveau des circuits dopaminergiques. Arpp19 est exprimée de façon ubiquitaire dans une grande variété de tissus, notamment le cerveau, les ovaires et les reins (Dulubova *et al.*, 2001; Girault *et al.*, 1990). ENSA est majoritairement détectée dans le cerveau chez les rongeurs et représenterait la forme majoritaire de la famille des Endosulfines chez l'ovocyte de xénope et des cellules humaines (Cundell *et al.*, 2013; Mochida *et al.*, 2010). Ces conclusions ont néanmoins été remises en question. En effet, Arpp19 étant peu exprimée, elle est difficile à détecter par western blot (Cundell *et al.*, 2013; Mochida *et al.*, 2010). En outre, les séquences de ces deux protéines étant très similaires, la plupart des anticorps sont capables de reconnaître les deux protéines. Au final, l'analyse par spectrométrie de masse indique que c'est au contraire Arpp19 qui est l'Endosulfine la plus représentée chez le xénope (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010).

La famille des Endosulfines est bien conservée chez les eucaryotes et des protéines homologues à Arpp19 et à ENSA sont retrouvées dans tout le règne vivant, eucaryotes inférieurs comme la levure, métazoaires et plantes. La levure possède deux Endosulfines, Igo1 et Igo 2 alors que de nombreux invertébrés, comme la drosophile ou la méduse *Clytia*, ne possèdent qu'un représentant de la famille (Kim *et al.*, 2012; Labandera *et al.*, 2015; Talarek *et al.*, 2010).

2. Structure et sites de phosphorylation des Endosulfines

La structure tridimensionnelle de ces protéines n'a pas encore été résolue mais les modèles prédictifs de structure suggèrent que ces protéines sont organisées en 4 hélices α plus ou moins bien structurées. La masse moléculaire estimée des Endosulfines est inférieure à leur masse apparente en SDS-PAGE, suggérant qu'elles adoptent une forme allongée et asymétrique (Dulubova *et al.*, 2001). ENSA, Arpp19 et Arpp16 sont par ailleurs thermostables, fortement basiques et solubles en milieu acide (Horiuchi *et al.*, 1990). Outre ces caractéristiques biochimiques, la séquence de ces protéines possède plusieurs sites de phosphorylation qui sont impliqués dans leurs différentes fonctions biologiques. Ces sites sont ciblés par trois kinases distinctes : Greatwall, Cdk1 et PKA (Figure 15).

Les Arpp19/16 et ENSA sont phosphorylées par Greatwall sur une sérine présente dans la séquence KYFDSSGDY, localisée à peu près au centre de la séquence de ces protéines. Ce motif représente d'ailleurs une signature des protéines de la famille des Endosulfines car il est conservé dans toutes les espèces. La sérine phosphorylée par Greatwall correspond à la S67 chez le xénope et à la S64 chez l'homme. Comme décrit précédemment, cette phosphorylation convertit Arpp19 et ENSA en inhibiteurs spécifiques de la phosphatase PP2A-B55 au cours de la division cellulaire chez tous les modèles étudiés jusqu'à présent. Par ailleurs, Greatwall phosphoryle également la protéine Arpp16 dans les neurones dopaminergiques (Andrade *et al.*, 2017). La phosphorylation par PKA intervient sur la première sérine du motif LPQRKP/SSLVA localisé dans l'extrémité C-terminale d'Arpp19, Arpp16 et ENSA (Dulubova *et al.*, 2001). Cette séquence est très conservée chez les vertébrés, mais est également présente avec quelques variations chez les invertébrés, la levure et les plantes (Dulubova *et al.*, 2001; Dupré *et al.*, 2013). Enfin, ENSA et Arpp19 possèdent des sites S/TP de phosphorylation par Cdk1 qui sont plus ou moins bien conservés entre les espèces. L'un de ces sites correspond à la T28 dans ENSA et la S28 dans Arpp19 de xénope. Elle est conservée chez l'étoile de mer et correspond à la S69 chez cette espèce (Dupré *et al.*, 2017; Mochida, 2014; Okumura *et al.*, 2014).

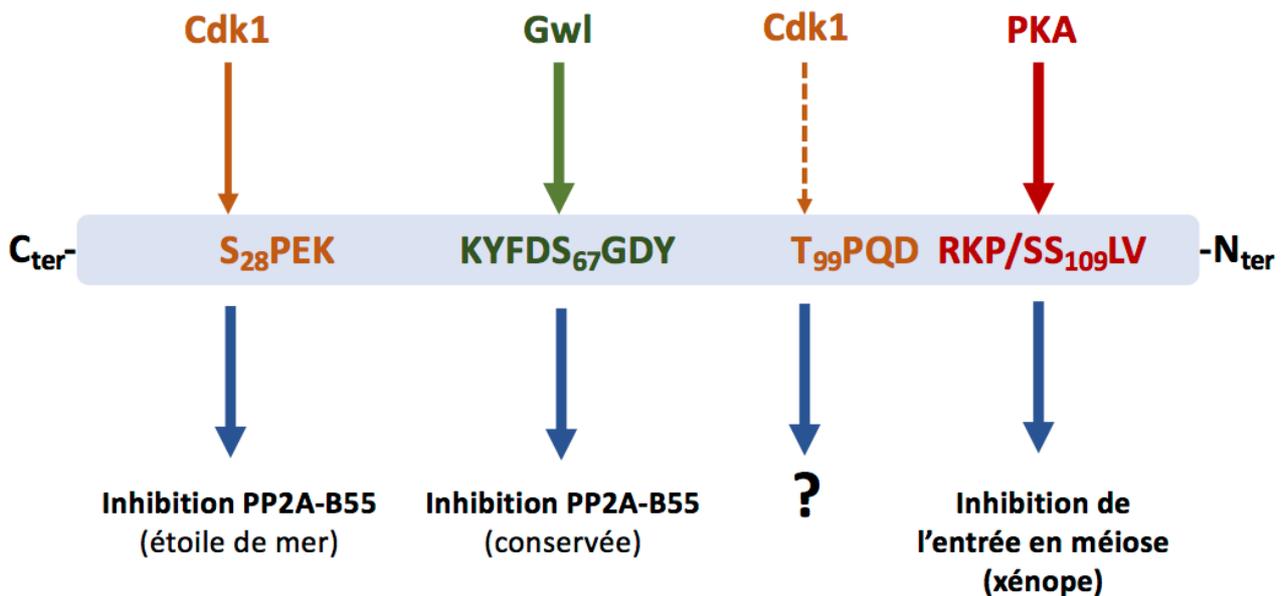


Figure 15 : Arpp19 et la division cellulaire

Arpp19 est une petite protéine de 19 kDa non-structurée qui possède plusieurs sites de phosphorylation. Ces sites sont ciblés par différentes kinases et sont responsables de ses fonctions biologiques au cours de la division cellulaire. Greatwall phosphoryle Arpp19 sur la sérine du motif FDSGDY qui est caractéristique de la famille des Endosulfines chez tous les eucaryotes. Cette phosphorylation est responsable de l'inhibition de PP2A-B55 en mitose et en méiose. La protéine PKA phosphoryle Arpp19 sur un site essentiellement conservé chez les vertébrés: RKP/SSLV. Chez le xénope, cette phosphorylation est requise pour bloquer l'ovocyte en prophase. Enfin, Cdk1 phosphoryle Arpp19 sur la S28 et potentiellement sur la T99. Dans l'ovocyte d'étoile de mer, la phosphorylation de la S29 (équivalente à la S28 de xénope) contribue à l'inhibition de PP2A-B55.

Un second site potentiel de phosphorylation par Cdk1 conservé chez la plupart des vertébrés est localisé au niveau de la T99 (xénope) mais aucune donnée de la littérature n'indique que ce résidu soit phosphorylé par Cdk1 (Figure 15).

B. Fonctions des Endosulfines

1. Cycle cellulaire

ENSA et Arpp19 sont des inhibiteurs spécifiques de la phosphatase PP2A-B55 quand elles sont phosphorylées par Greatwall sur la S67 (numérotation chez le xénope). Comme détaillé dans les chapitres précédents, l'effet du module Greatwall/Arpp19 est conservé entre systèmes modèles et l'inactivation de PP2A-B55 δ est cruciale pour l'entrée et/ou la progression en phase-M des cellules chez la drosophile, le xénope, l'étoile de mer et différentes lignées cellulaires de mammifères (Dupré *et al.*, 2013; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Hara *et al.*, 2012; Juanes *et al.*, 2013; Mochida *et al.*, 2010; Rangone *et al.*, 2011). Le mécanisme moléculaire de l'inhibition de PP2A-B55 par ces petites protéines repose sur le fait qu'elles sont elles-mêmes substrats de PP2A-B55. ENSA/Arpp19 inhibe PP2A-B55 par un mécanisme de compétitions « déloyale » (en anglais, « unfair competition »), séquestrant son activité et l'empêchant ainsi de cibler ses autres substrats (Williams *et al.*, 2014) (Figure 16). En conséquence, leur action inhibitrice n'est maintenue que si elles sont en permanence rephosphorylées, c'est-à-dire quand Greatwall est elle-même maintenue sous forme active. En raison de leur forte homologie, la fonction d'ENSA et d'Arpp19 en tant que régulateurs de la division cellulaire a longtemps été considérée comme redondante. Des études récentes ont cependant mis à jour des spécificités fonctionnelles d'ENSA et Arpp19 chez les vertébrés (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010 ; Hached *et al.*, 2019). Dans des extraits interphasiques de xénope, l'immunodéplétion spécifique d'Arpp19 est suffisante pour bloquer l'entrée en mitose induite par l'addition de Cyclines car les substrats mitotiques ne sont plus phosphorylés (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). A l'inverse, la déplétion d'Arpp19 d'extraits bloqués en phase-M provoque la réactivation de PP2A-B55 δ et le retour de la phase-M en absence de calcium et de la dégradation des Cyclines (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). Plus récemment, le knock-out conditionnel d'Arpp19 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) impacte fortement la viabilité des cellules et leur progression en mitose, alors que l'expression d'ENSA n'est pas affectée (Hached *et al.*, 2019). De plus, ENSA a été montrée comme spécifiquement impliquée dans la régulation de la phase-S et la mise en place des origines de réplication en agissant sur une protéine distincte de PP2A-B55 δ , la Treslin (Charrasse *et al.*, 2017).

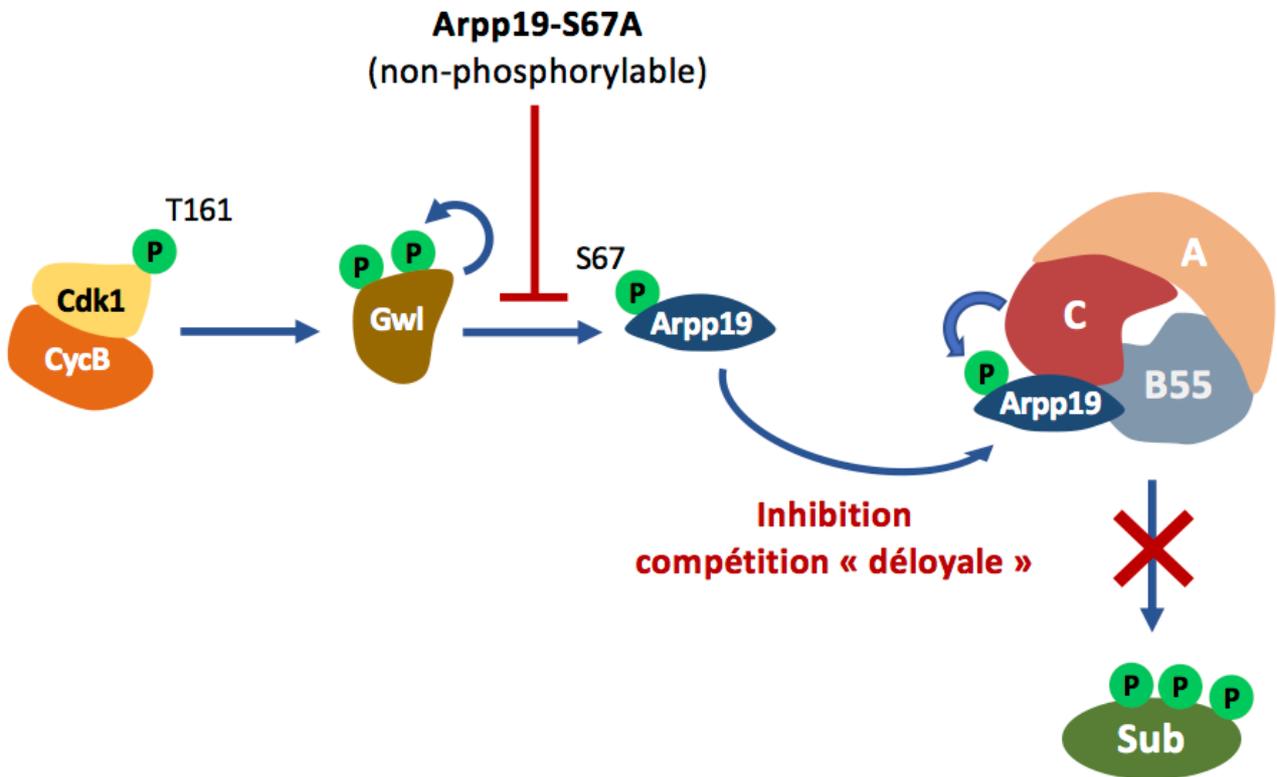


Figure 16 : Mécanisme d'inhibition de PP2A-B55 par Greatwall et Arpp19

L'inhibition de PP2A-B55 est induite par l'activation initiale de Cdk1 qui phosphoryle et active la kinase Greatwall. Greatwall phosphoryle Arpp19 sur la S67, qui en se liant à PP2A-B55, inhibe son activité. La S67 d'Arpp19 étant déphosphorylée par cette même phosphatase, Arpp19 inhibe PP2A-B55 par un mécanisme de pseudo-compétition. En effet, l'affinité de la phosphatase pour la S67 phosphorylée est supérieure à celle pour les substrats mitotiques. Arpp19 séquestre ainsi PP2A-B55 et l'empêche de déphosphoryler ses autres substrats. Ce mécanisme d'inhibition dépend donc du maintien de la phosphorylation d'Arpp19 sur la S67 et donc de l'activité de Greatwall. De ce fait, l'injection d'une forme d'Arpp19 non-phosphorylable sur la S67, qui agit comme un dominant négatif de Greatwall, empêche l'inhibition de PP2A-B55.

CycB : Cycline B ; Gwl : Greatwall ; Sub : Substrats

Cette régulation de la phase-S est spécifique à ENSA puisque l'inactivation d'Arpp19 dans les MEFs n'a aucun impact sur la phase-S (Hached *et al.*, 2019).

2. Entrée en quiescence

Outre son rôle dans la division cellulaire, le module Greatwall-ENSA/Arpp19 est requis pour la mise en place du programme de quiescence chez la levure (Aono *et al.*, 2019 ; Bontron *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011 ; Talarek *et al.*, 2010). En absence de nutriments, Rim15 (l'homologue de Greatwall chez la levure) est activée et phosphoryle les deux homologues d'ENSA/Arpp19 de la levure, Igo1 et Igo2, sur la S64/63. Ces phosphorylations inhibent PP2A-B55 et lancent la transcription des gènes de l'entrée en phase-G0 en facilitant la phosphorylation du facteur de transcription Gis1 (Bontron *et al.*, 2013). De plus, Igo1 et Igo2 stimulent la traduction des ARNm en interagissant et en inhibant la protéine Dhh1 impliquée dans le décapping et la dégradation 5'-3' des ARNm. Ce processus stabilise ainsi les ARNm nouvellement transcrits dont la traduction est requise pour l'entrée en phase-G0 (Talarék *et al.*, 2010). Ce rôle d'Arpp19 dans la stabilisation des ARNm est conservé dans les neurones chez les mammifères mais à l'inverse des cellules en prolifération, il fait intervenir le résidu S104 (résidu ciblé par PKA) d'Arpp19, indépendamment de sa phosphorylation (Irwin *et al.*, 2002).

3. Modèles post-mitotiques

Arpp16 est exprimée majoritairement dans les neurones du striatum du cerveau des mammifères, la cible majeure des neurones dopaminergiques du cerveau moyen. La dopamine exerce ses effets cellulaires principalement par la modulation de l'AMPC et de l'activité PKA, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses propriétés des neurones, comme la croissance axonale, la transmission synaptique, ou encore l'excitabilité et la plasticité neuronale. Dans les neurones du striatum, Arpp16 est l'un des éléments de la voie dopaminergique. Dans ce système, Arpp16 est phosphorylée sur la S46 par MAST3 (homologue de Mastl/Greatwall) et sur la S88 par PKA (Andrade *et al.*, 2017). Comme Arpp19, sa phosphorylation par MAST3 inhibe PP2A-B55. En absence de stimulation dopaminergique, Arpp16 est constitutivement phosphorylée par MAST3 sur S46, ce qui assure une inhibition constitutive de PP2A-B55. En réponse à la dopamine, la kinase PKA est activée. Elle phosphoryle Arpp16 sur la S88 et provoque conjointement l'inhibition de MAST3 par phosphorylation. Ce processus conduit à la déphosphorylation d'Arpp16 sur S46, induisant alors l'activation de la phosphatase (Andrade *et al.*, 2017; Musante *et al.*, 2017). Dans ce système, la phosphorylation d'Arpp16 par PKA et Greatwall sont mutuellement exclusives, la

phosphorylation par l'une empêchant la phosphorylation par l'autre (Musante *et al.*, 2017). La balance d'activité entre les deux kinases détermine ainsi l'état de phosphorylation d'Arpp16 sur la S46 et S88 et le degré d'inhibition de PP2A-B55.

C. Arpp19 et la maturation méiotique

La régulation de la division méiotique par les Endosulfines a été initialement découverte chez la drosophile par l'inactivation du gène Endos, le gène codant pour l'unique membre de cette famille chez cette espèce (Von Stetina *et al.*, 2008). L'inactivation d'Endos perturbe l'entrée en métaphase I et provoque des défauts de formation du fuseau de division et des niveaux d'activité de Cdk1 (Von Stetina *et al.*, 2008). Chez la souris, les ovocytes invalidés par ARN interférence pour ENSA sont incapables de sortir de l'arrêt en prophase (Matthews and Evans, 2014). Cet arrêt dépendrait donc de l'activité de PP2A-B55 δ qui jouerait un rôle-clé dans sa levée chez cette espèce, un résultat surprenant puisque l'inactivation de Greatwall n'empêche pas GVBD dans ce modèle (Matthews and Evans, 2014). Dans l'ovocyte de xénope, la fonction régulatrice d'Arpp19 a été mise en évidence par l'étude de son état de phosphorylation sur la S109 et sur la S67 par PKA et Greatwall et par des approches de perte-ou de gain-de-fonction en surexprimant différentes formes mutantes d'Arpp19 recombinantes : non-phosphorylable ou phosphomimétique pour le site S109 ciblé par PKA (S109A ou S109D), non-phosphorylable pour le site S67 ciblé par Greatwall (S67A) et non-phosphorylable ou phosphomimétique pour le site S28 potentiellement ciblé par Cdk1 (S28A et S28D). Le mutant phosphomimétique d'Arpp19 sur la S67 (S67D) ne reproduisant pas les effets biologiques de la forme phosphorylée, et ne mimant donc pas une phosphorylation constitutive par Greatwall, la protéine sauvage a été thiophosphorylée *in vitro* par Greatwall sur le site S67 (pour le résumé des différents effets sur la maturation méiotique, voir tableau 1).

1. Les phosphorylations d'Arpp19 sur la S109 et la S67 en prophase et lors de la reprise de la méiose

La protéine Arpp19 est stable de la prophase à l'arrêt en métaphase II (Dupré *et al.*, 2013; Dupré *et al.*, 2014). L'analyse par western blot de ses phosphorylations en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre les formes phosphorylées de la S109 ou la S67 a révélé qu'Arpp19 est phosphorylée en prophase sur la S109 mais pas sur la S67 (Dupré *et al.*, 2013; Dupré *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Effet des différents phospho-mutants d'Arpp19 sur la reprise de la méiose de l'ovocyte de xénope

	Seule	Progestérone	PKI	Transfert de Cytoplasme	K71M-Greatwall
Arpp19-S109A	<i>Pas d'effet</i>	Facilite GVBD	Facilite GVBD	GVBD	GVBD
Arpp19-S109D	Bloque GVBD	Bloque GVBD	Bloque GVBD	GVBD	GVBD
Arpp19-S67A	Bloque GVBD	Bloque GVBD	Bloque GVBD	Bloque GVBD	Bloque GVBD
Arpp19-thioS67	GVBD	Facilite GVBD	Facilite GVBD	-	-
Arpp19-thioS67-S109D	GVBD	-	-	-	-
Arpp19-S28A	<i>Pas d'effet</i>	GVBD	GVBD	-	-
Arpp19-S28D	<i>Pas d'effet</i>	GVBD	GVBD	-	-

- : expérience non-réalisée

GVBD : Germinal Vesicle BreakDown

En réponse à la progestérone, la S109 est partiellement déphosphorylée dans l'heure qui suit la stimulation hormonale, de manière dépendante de l'inhibition de PKA (Dupré *et al.*, 2014). Arpp19 est ensuite progressivement rephosphorylée sur ce même résidu S109. Au moment de l'activation de Cdk1, la protéine passe sous un état doublement phosphorylé, sur S109 donc, mais aussi sur S67 par Greatwall (Dupré *et al.*, 2013; Dupré *et al.*, 2014). Les deux sites restent alors phosphorylés jusqu'à la métaphase II.

2. Analyse fonctionnelle des phosphorylations dans l'ovocyte

a) La phosphorylation par PKA

L'analyse fonctionnelle d'Arpp19 a révélé qu'elle joue un rôle crucial dans l'arrêt en prophase. Il était par ailleurs étonnant de constater qu'elle remplissait tous les critères biochimiques attendus du substrat de PKA responsable du maintien en prophase de l'ovocyte : elle est phosphorylée sur la S109 par PKA en prophase ; elle est déphosphorylée sur ce site en réponse à la progestérone et à l'inhibition de PKA provoquée par l'hormone ou PKI ; enfin cette déphosphorylation, indépendante de la synthèse protéique, intervient avant et indépendamment de l'activation de Cdk1 (Dupré *et al.*, 2014). Le rôle de cette phosphorylation dans l'activation de Cdk1 a été établi en injectant Arpp19 sous sa forme sauvage, non-phosphorylable (S109A) et phosphomimétique (S109D).

L'injection de la forme sauvage d'Arpp19 bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone de manière dose-dépendante, l'inhibition étant provoquée par de fortes concentrations d'Arpp19 (Dupré *et al.*, 2014). L'injection de la forme non-phosphorylable sur la S109, le mutant S109A, ne bloque pas la reprise de la méiose alors que l'injection d'une forme phosphomimétique, S109D, bloque l'activation de Cdk1 en réponse à la progestérone ou à l'injection de PKI (Dupré *et al.*, 2014). Arpp19-S109D perd cependant son effet inhibiteur lorsque l'activation de Cdk1 est déclenchée par un transfert de cytoplasme. Arpp19 phosphorylée sur la S109 n'est donc pas capable d'inhiber la boucle d'auto-amplification, en accord avec l'indépendance de ce processus vis-à-vis de l'activité de PKA et donc de son substrat (Dupré *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats a ainsi établi que la phosphorylation d'Arpp19 par PKA sur la S109 inhibe la voie de signalisation conduisant à l'activation initiale de Cdk1 et que sa déphosphorylation est critique pour induire la reprise de la méiose (Figure 17).

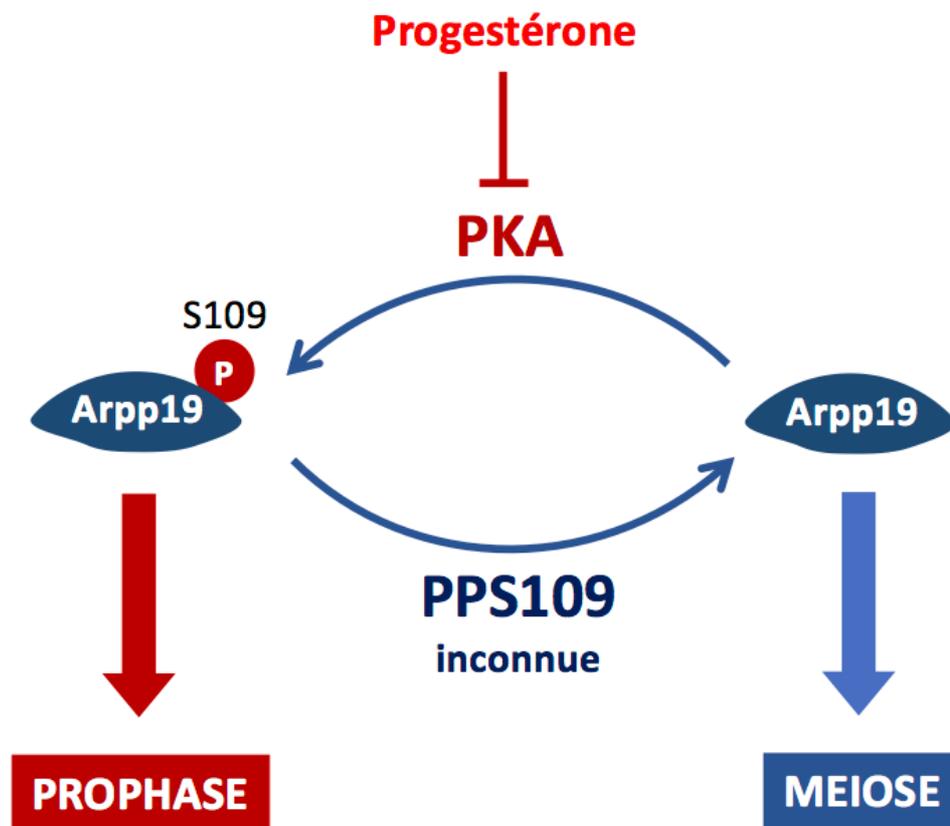


Figure 17 : La déphosphorylation d'Arpp19 sur S109 est critique pour activer Cdk1 dans l'ovocyte de xénope

En prophase, Arpp19 est phosphorylée sur S109 par PKA. Cette phosphorylation bloque l'activation initiale de Cdk1 et maintient l'ovocyte en prophase. En réponse à la progestérone, Arpp19 est déphosphorylée sur S109 dans l'heure qui suit la stimulation hormonale par une phosphatase (PPS109) dont l'identité moléculaire est inconnue. La déphosphorylation d'Arpp19 autorise alors la signalisation qui aboutit à l'activation initiale de Cdk1.

Arpp19 apparaît donc comme l'un des substrats cruciaux de PKA responsables du blocage de l'ovocyte en prophase chez le xénope. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel Arpp19 assure ce blocage est encore inconnu.

b) La phosphorylation par Greatwall

Arpp19 agit également en tant qu'inhibiteur de PP2A-B55 dans l'ovocyte de xénope. La protéine endogène ou la forme sauvage d'Arpp19 injectée dans l'ovocyte sont phosphorylées par Greatwall sur la S67 et inhibent PP2A-B55 δ (Dupré *et al.*, 2013). Cette fonction d'Arpp19 est temporellement dissociée de son effet inhibiteur en prophase car elle intervient au moment de l'activation de Cdk1 et dépend de cette activité (Dupré *et al.*, 2013). En effet, en présence de la protéine p21^{Cip1}, Cdk1 n'est pas activée, Greatwall reste inactive et Arpp19 n'est jamais phosphorylée sur la S67. Le rôle du module Greatwall/Arpp19/PP2A a été étudié en injectant les ovocytes avec la forme sauvage d'Arpp19, le mutant non-phosphorylable sur la S67, le S67A, ou une forme d'Arpp19 sauvage thiophosphorylée *in vitro* sur la S67 (Dupré *et al.*, 2013). La thiophosphorylation évite que le résidu puisse être déphosphorylé. Contrairement aux fortes concentrations d'Arpp19 qui bloquent la reprise la méiose, l'injection d'Arpp19 sauvage à faible dose accélère la cinétique de maturation induite par la progestérone, PKI ou la forme active K71M-Greatwall. La protéine injectée est phosphorylée sur la S67 et interagit avec PP2A-B55 δ une fois Cdk1 activée, à l'exception de la situation où K71M-Gwl est injecté. Dans ce cas, elle interagit avec la phosphatase indépendamment de l'activité de Cdk1. Ceci indique que l'action de Cdk1 s'effectue en activant Greatwall, ce qui n'est pas nécessaire dans le contexte où la protéine K71M-Greatwall est présente. A l'opposé, l'injection du mutant non-phosphorylable S67A inhibe l'activation de Cdk1 induite par la progestérone, PKI, la forme K71M-Greatwall et le transfert de cytoplasme (Dupré *et al.*, 2013). Dans ces conditions, Arpp19-S67A n'interagit jamais avec PP2A-B55 δ . Le mutant S67A agit donc comme un dominant-négatif vis-à-vis de Greatwall. Il révèle que le module Greatwall/Arpp19 est requis dans la boucle d'auto-amplification de Cdk1 pour inhiber PP2A-B55 δ (Dupré *et al.*, 2013). En accord avec cette conclusion, Arpp19 thiophosphorylée sur la S67 interagit avec PP2A-B55 δ de manière constitutive et provoque la reprise de la méiose indépendamment de la progestérone et en présence d'une forte activité de PKA (Dupré *et al.*, 2013). De plus, ni son effet positif sur la reprise de la méiose, ni son interaction avec PP2A-B55 δ ne sont affectés si la protéine comporte une mutation additionnelle de la S109 en S109D, ou que le mutant simple S109D est injecté conjointement avec la forme thiophosphorylée sur S67 ou avec K71M-Greatwall (Dupré *et al.*, 2013) (Dupré *et al.*, 2017). Ces résultats montrent que la phosphorylation sur la S109

d'Arpp19 n'inhibe pas l'effet biologique conféré par la phosphorylation sur la S67 par Greatwall ni sa capacité à inhiber PP2A-B55δ. Le mécanisme est donc très distinct de celui décrit pour les modèles post-mitotiques où ces phosphorylations sont mutuellement exclusives et annulent leurs effets biologiques respectifs. En conclusion, ces études montrent que l'activation du module Greatwall-Arpp19 dépend de l'activité de Cdk1, probablement celle de l'amorce, et qu'il est ensuite requis pour la mise en place de la boucle d'auto-amplification via l'inhibition de PP2A-B55δ. Par ailleurs, ce module confère à cette boucle son indépendance vis-à-vis de l'activité de PKA et de la phosphorylation sur S109 de son substrat, Arpp19.

c) La phosphorylation par Cdk1

Dans l'ovocyte d'étoile de mer, la phosphorylation par Cdk1 d'Arpp19 sur la S69, un résidu différent de celui ciblé par Greatwall, a été proposée comme étant un mécanisme important et suffisant pour inhiber PP2A-B55 (Okumura *et al.*, 2014). Chez cette espèce, la phosphorylation d'Arpp19 par Cdk1 prend place alors que Greatwall, qui est nucléaire, n'est pas encore activée et cette phosphorylation conduit à l'inhibition de PP2A-B55δ, nécessaire pour la reprise de la méiose (Okumura *et al.*, 2014). C'est le seul cas rapporté à ce jour où l'effet inhibiteur d'Arpp19 sur PP2A-B55 dépend d'une phosphorylation qui n'est pas catalysée par Greatwall. Néanmoins, dans l'ovocyte d'étoile de mer, Greatwall phosphoryle ensuite Arpp19 dans des étapes plus tardives de la méiose et est bien nécessaire car la ségrégation des chromosomes ne se fait pas en son absence. Il s'agit donc d'une situation d'activation biphasique d'Arpp19 comme inhibiteur de PP2A-B55, où Cdk1 a un rôle initiateur essentiel. Dans les ovocytes de xénope bloqués en métaphase II, l'analyse par spectrométrie de masse indique qu'ENSA est doublement phosphorylée sur T28 et S67, respectivement par Cdk1 et Greatwall (Mochida, 2014). La phosphorylation par Cdk1 sur la T28 est capable d'inhiber l'activité de PP2A *in vitro* mais avec une moindre efficacité comparée à Arpp19 phosphorylée sur la S67 (Mochida, 2014). Le profil de phosphorylation de la S28 d'Arpp19 par Cdk1 est inconnu dans l'ovocyte de xénope faute d'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée d'Arpp19 sur la S28. En revanche, l'injection de formes mutées pour Arpp19, S28A ou S28D, ou de protéines thiophosphorylées par Cdk1 *in vitro* n'a aucun impact sur la reprise de la méiose induite par la progestérone (Dupré *et al.*, 2017). Cette phosphorylation n'influencerait donc pas chez le xénope l'activation de Cdk1 et ne serait pas nécessaire à l'inhibition de PP2A-B55δ, contrairement à l'ovocyte d'étoile de mer.

3. Arpp19 et l'activation de Cdk1 dans l'ovocyte de xénope

Arpp19 se retrouve donc au cœur du contrôle de la division méiotique de l'ovocyte de xénope et possède deux fonctions opposées sur la reprise de la méiose, selon qu'elle est phosphorylée par Greatwall ou par PKA. En prophase, Arpp19 est phosphorylée sur la S109 et bloque la voie de signalisation qui conduit à l'activation de Cdk1 par un mécanisme inconnu. En réponse à la progestérone, la voie de signalisation démarre avec la chute de la concentration en AMPc, l'inhibition de PKA et *in fine* la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109. Cet événement lance la voie de signalisation qui aboutit 3 à 5h plus tard à l'activation initiale de Cdk1. Une fois l'amorce de Cdk1 formée, Greatwall est activée et phosphoryle Arpp19 sur la S67. Cette dernière inhibe PP2A-B55δ ce qui permet le fonctionnement de la boucle d'auto-amplification produisant l'activation brutale et totale de Cdk1 et l'entrée en division (Figure 18).

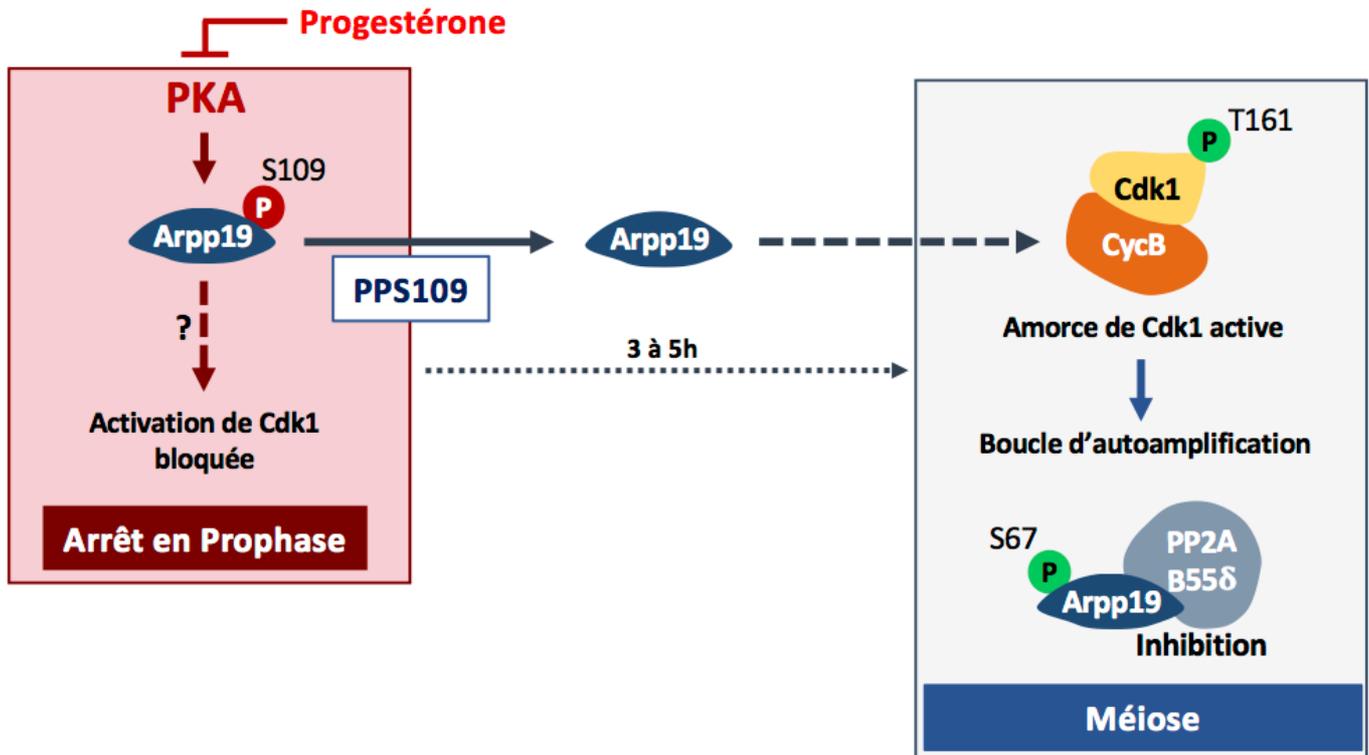


Figure 18 : La double fonction d'Arpp19 dans la maturation méiotique

Arpp19 a deux effets antagonistes sur la reprise de la méiose. Phosphorylée sur la S109 par PKA, Arpp19 maintient Cdk1 inactive et bloque l'ovocyte en prophase via un mécanisme encore inconnu. A l'opposé, phosphorylée par Greatwall sur la S67, Arpp19 permet l'activation totale des complexes Cdk1-Cycline B en inhibant la phosphatase PP2A-B55δ, permettant ainsi l'entrée en métaphase I. Ces deux fonctions antagonistes sont temporellement dissociées puisque la phosphorylation par Greatwall intervient en fin de la voie signalisation initiée par la progestérone, au moment de l'activation de Cdk1.

CycB : Cycline B

V. Identification de la phosphatase qui cible Arpp19 lors de la reprise de la méiose

L'objectif de ma thèse a été de comprendre la régulation de la phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 dans l'ovocyte de xénope grâce à l'identification de la phosphatase responsable de la déphosphorylation de ce résidu lors de la reprise de la méiose, PPS109 (pour « phosphatase ciblant la S109 »). En déphosphorylant Arpp19 sur la S109, cette phosphatase lance la signalisation qui déclenche l'activation de Cdk1. Elle a donc une fonction critique pour la reprise de la méiose.

A. Les phosphatases dans l'ovocyte de xénope

Le rôle des phosphatases dans l'activation de Cdk1 est établi depuis la découverte que l'injection d'acide okadaïque, à une concentration capable d'inhiber PP1 et PP2A, provoque la reprise de la méiose (Cormier *et al.*, 1990; Goris *et al.*, 1989; Masui and Markert, 1971). L'analyse des phosphatases par des approches de biochimie (isolement par chromatographie, utilisation des critères de dépendance aux ions divalents) a permis d'établir que PP2A est principalement localisée dans le cytoplasme et que PP1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme (Jesus *et al.*, 1989). PP1 cytoplasmique est inactive alors que PP1 nucléaire est présente sous deux formes : l'une est associée à une sous-unité régulatrice encore non identifiée alors que la seconde est solubilisée par de fortes concentrations en sels.

Les rôles respectifs de chacune de ces phosphatases dans le mécanisme d'activation restent mal compris et aucune donnée n'a encore permis d'établir le mode de régulation de PP1 et de PP2A dans la voie de signalisation initiée par la progestérone. Cependant, l'inhibition spécifique de PP1 par l'injection de deux de ses inhibiteurs protéiques spécifiques, l'inhibiteur I1 ou l'inhibiteur I2, respectivement bloque et retarde la reprise de la méiose en réponse à la progestérone et à l'injection de PKI (Foulkes and Maller, 1982; Huchon *et al.*, 1981a). De plus, I1 perd son effet inhibiteur lorsqu'il est injecté une heure après la stimulation hormonale ou lorsque l'activation de Cdk1 est induite par un transfert de cytoplasme (Huchon *et al.*, 1981a). L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'activation de PP1 est nécessaire pour la reprise de la méiose en réponse à la progestérone, sous le contrôle de l'inhibition de PKA. Une fois l'auto-amplification déclenchée, l'activité de PP1 n'est plus requise pour la reprise de la méiose. Cet effet de PP1 dans la reprise de la méiose de l'ovocyte de xénope est réminiscent de celui

exercé par Arpp19 phosphorylée par PKA. PP1 représentait donc un bon candidat comme catalyseur de la déphosphorylation d'Arpp19 en réponse à la progestérone.

B. Résultats

Les résultats obtenus lors de mon doctorat sont présentés sous la forme d'un article qui déposé sur le site BioRxiv (DOI : <https://doi.org/10.1101/801225>) et soumis à *Nature Communication*. J'ai profité de mes lectures bibliographiques pour entamer la rédaction d'un article de revue sur les rôles des phosphatases dans l'activation de Cdk1 dans les ovocytes, écriture pour laquelle notre équipe a été sollicitée.

1. La phosphorylation S109, un équilibre entre PKA et PPS109 en prophase

Pour identifier PPS109, j'ai tout d'abord développé un dosage permettant de détecter et quantifier son activité. Pour cela, j'ai utilisé son substrat, Arpp19, étiquetée avec une GST, que j'ai préalablement phosphorylé *in vitro* sur la S109 par PKA (Arpp19-S109p). Ce substrat est alors lié à des billes de glutathion puis incubé en présence d'extraits d'ovocytes bloqués en prophase. La phosphorylation sur la S109 du substrat est suivie par western blot en utilisant l'anticorps spécifiquement dirigé contre la forme d'Arpp19 phosphorylée sur S109. En parallèle, j'ai également mis au point un dosage pour suivre l'activité de PKA sur ce même site. Le substrat utilisé correspond alors à la forme sauvage d'Arpp19 étiquetée avec une GST (Arpp19-S109), non phosphorylée sur la S109, et est lié à des billes de glutathion. Comme pour le dosage de PPS109, la phosphorylation S109 est déterminée par western blot avec le même anticorps. Les dosages ont été réalisés avec ou sans ATP (dans ce dernier cas, les kinases ne sont pas fonctionnelles), et en présence ou non de l'inhibiteur de PKA, PKI. J'ai montré que dans les extraits en prophase, PKA phosphoryle activement la S109 d'Arpp19 et est inhibée en l'absence d'ATP ou par PKI. Sans ATP, une activité PPS109 déphosphoryle massivement Arpp19 sur la S109. En présence d'ATP, Arpp19-S109p n'est que faiblement déphosphorylée, probablement en raison de l'activité de PKA qui contrecarre celle de PPS109. Effectivement, dans ces conditions, l'addition de PKI suffit pour induire la déphosphorylation totale d'Arpp19. Ces résultats indiquent que PPS109 est active en prophase mais que son activité est masquée par celle de PKA qui contrecarre la déphosphorylation de la S109. Par ailleurs, l'addition d'acide okadaïque dans ces extraits bloque la déphosphorylation d'Arpp19-S109p, indiquant que PPS109 appartient à la famille des phosphatases sensibles à l'acide okadaïque, les PPPs.

2. PPS109 correspond à PP2A-B55

L'analyse par western blot des PPPs présentes dans l'ovocyte indique que toutes les PPPs, PP1, PP2A, PP4, PP5 et PP6, sont exprimées à un même niveau en prophase et en métaphase II. Par ailleurs, deux sous-unités régulatrices de PP2A sont également présentes : la B55 δ et la B56 ϵ . Afin de mieux caractériser PPS109, les extraits de prophase traités ou non par PKI ont été fractionnés par des précipitations successives au sulfate d'ammonium (20%, 40% puis 60%). Dans chacun des précipités, les activités de PPS109 et de PKA ont été mesurées et les PPPs suivies par western blot. L'activité de PKA est retrouvée dans la fraction précipitée par 60% de sulfate d'ammonium alors que PPS109 est active dans le précipité 40%, que ce soit en présence ou en absence de PKI. Ceci confirme qu'elle est active en prophase. Le précipité 40% contient toutes les PPPs, à l'exception de PP1 et PP5. Ces deux phosphatases ne sont donc pas responsables de la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109.

a) Identification de PPS109

L'identification de PPS109 a été effectuée par le fractionnement successif d'extraits d'ovocytes supplémentés avec PKI par quatre étapes de chromatographie FPLC reposant sur des critères de charge, d'hydrophobicité et de masse moléculaire. A chaque étape, l'activité de PPS109 a été mesurée dans chaque fraction et les phosphatases détectées par western blot. De plus, chaque fraction possédant une activité PPS109 a été soumise à un séquençage par spectrométrie de masse afin d'identifier toutes les phosphatases présentes dans la fraction. Ce protocole de purification a été réalisé 4 fois. Par western blot et spectrométrie de masse, nous avons établi que deux isoformes de PP2A sont capables de déphosphoryler la S109 d'Arpp19 : PP2A-B55 α/δ et PP2A-B56. Il est à noter que les fractions comportant l'activité PPS109 contiennent systématiquement PP2A-B55 α/δ mais pas toujours PP2A-B56. PP2A-B55 α/δ est donc capable de déphosphoryler Arpp19 sur la S109 indépendamment de PP2A-B56.

b) Validation de l'identité de PPS109 in vitro et in vivo

L'identité de PPS109 a ensuite été validée dans les extraits de prophase déplétés soit pour toutes les isoformes de PP2A à l'aide de billes couplées à la microcystine, soit spécifiquement pour PP2A-B55 α/δ en utilisant des billes couplées à son inhibiteur, Arpp19 thiophosphorylée sur la S67 (Dupré *et al.*, 2013; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). L'activité PPS109 a ensuite été déterminée après addition ou non de PKI dans les extraits ainsi déplétés. La déplétion de toutes les isoformes de PP2A supprime totalement l'activité de déphosphorylation

d'Arpp19 dans les extraits. La déplétion de PP2A-B55 δ abolit partiellement l'activité de PPS109. Ce résultat suggère que PP2A-B55 α/δ et PP2A-B56 contribuent à la déphosphorylation de la S109 d'Arpp19 dans les extraits ovocytaires, en accord avec les résultats d'isolement par chromatographie de PPS109. Par ailleurs, la seule déplétion de PP2A-B55 δ augmente le niveau de phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 dans les extraits de prophase où PKA est active, montrant que cette isoforme assume une forte proportion de l'activité PPS109 et que PKA s'oppose à son action.

J'ai ensuite inhibé PP2A-B55 α/δ *in vivo* en injectant les ovocytes avec la protéine Arpp19-thiophosphorylée sur la S67 mais non phosphorylable sur la S109 (mutation S109A) (Arpp19-S109A-thioS67). Les ovocytes ont alors été stimulés ou non par la progestérone. Dans les ovocytes contrôles, Arpp19 endogène est déphosphorylée dans les 30 à 60 minutes après la stimulation hormonale, comme attendu (Dupré *et al.*, 2014). L'injection d'Arpp19-S109A-thioS67 induit la reprise de méiose indépendamment de la stimulation hormonale, indiquant que la protéine a bien inhibé PP2A-B55 α/δ (Dupré *et al.*, 2013). En réponse à la progestérone, cette inhibition de PP2A-B55 α/δ bloque la déphosphorylation d'Arpp19 endogène sur la S109. PP2A-B55 α/δ apparaît donc comme la phosphatase responsable de la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109 lors de la reprise de la méiose dans l'ovocyte de xénope.

3. L'activité de PP2A-B55 n'est pas régulée par la progestérone dans les étapes précoces de reprise de la méiose

PP2A-B55 α/δ est active dans l'ovocyte en prophase. Nous avons donc envisagé que son activité puisse être régulée par PKA. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'activité de PP2A-B55 α/δ dans des extraits de prophase, supplémentés ou non par PKI, en utilisant une forme doublement phosphorylée d'Arpp19, sur la S109 et la S67 (Arpp19-S67p-S109p). En effet, la S67 a été décrite comme un substrat spécifique de PP2A-B55 (Williams *et al.*, 2014). Dans les extraits de prophase, Arpp19-S109p-S67p est massivement déphosphorylée et cela indépendamment de l'activité PKA. PP2A-B55 α/δ est donc bien active en prophase, comme le montre la déphosphorylation de la S67 d'Arpp19, et son activité n'est pas régulée par PKA.

Par ailleurs, la déphosphorylation de la S109 d'Arpp19 induite par la progestérone dépend de la chute d'activité de PKA. La question se posait alors de savoir si le niveau d'activité de PP2A-B55 α/δ de prophase est suffisant pour déphosphoryler la S109 quand l'activité de PKA chute, ou si l'activité de PP2A-B55 α/δ est stimulée par la progestérone. Afin de déterminer si la progestérone régule l'activité de PP2A-B55 α/δ , l'activité de PPS109 a été

suivie dans des extraits produits à partir d'ovocytes bloqués en prophase ou 1h après stimulation par la progestérone, période à laquelle la S109 d'Arpp19 est déphosphorylée et où l'activité de sa phosphatase, PP2A-B55 α/δ , est susceptible d'être stimulée. La vitesse de déphosphorylation d'Arpp19-S109p a été analysée, de 0 à 15 minutes, ce qui correspond à la phase linéaire de l'activité de déphosphorylation. Ce dosage nous a permis d'établir une moyenne des vitesses initiales de déphosphorylation pour la S109 en prophase ou dans l'heure qui suit la reprise de la méiose. Aucune différence significative de vitesse de déphosphorylation n'a été trouvée entre les deux conditions (n=7 expériences indépendantes), indiquant que PP2A-B55 α/δ est active en prophase et que son activité n'est pas régulée par la progestérone.

C. Discussion et perspectives

Nos résultats établissent donc que PP2A-B55 α/δ est la phosphatase qui déphosphoryle Arpp19 sur la S109 dans l'ovocyte de xénope. En prophase, la phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 résulte d'un équilibre entre PKA et PP2A-B55 α/δ , en faveur de PKA. En réponse à la progestérone, PKA est inhibée. Sans son enzyme antagoniste, PP2A-B55 α/δ déphosphoryle alors la S109 d'Arpp19. Cette déphosphorylation autorise alors la mise en route de la voie de signalisation qui aboutit à la formation d'une amorce de Cdk1 active. Cette dernière active, Greatwall qui phosphoryle la S67 d'Arpp19, ce qui inhibe PP2A-B55 α/δ . La boucle d'auto-amplification peut se mettre à fonctionner, conduisant à l'activation totale et brutale des complexes Cdk1-Cycline B puis à l'entrée en première division méiotique. PP2A-B55 α/δ agit donc de manière critique sur Arpp19 à deux périodes distinctes de la reprise de la méiose, par l'intermédiaire de deux sites distincts, s'opposant à PKA pour l'un et à Greatwall pour l'autre, de façon à orchestrer la levée du blocage en prophase et l'entrée en phase-M. Son activité est essentielle dans les premières étapes en réponse à la progestérone, puis son inhibition est requise pour l'activation de Cdk1 par la boucle d'auto-amplification (Figure 19).

Ces résultats soulèvent plusieurs questions que je vais discuter. Tout d'abord, PP2A-B55 α/δ est la phosphatase principale qui déphosphoryle Arpp19 sur la S109 dans l'ovocyte de xénope. Cependant, les résultats de la purification et de la déplétion des isoformes de PP2A dans les extraits suggèrent que PP2A-B56 possède aussi une activité de déphosphorylation vis à vis de la S109. PP2A-B56 participe-t-elle à ce mécanisme *in vivo* ?

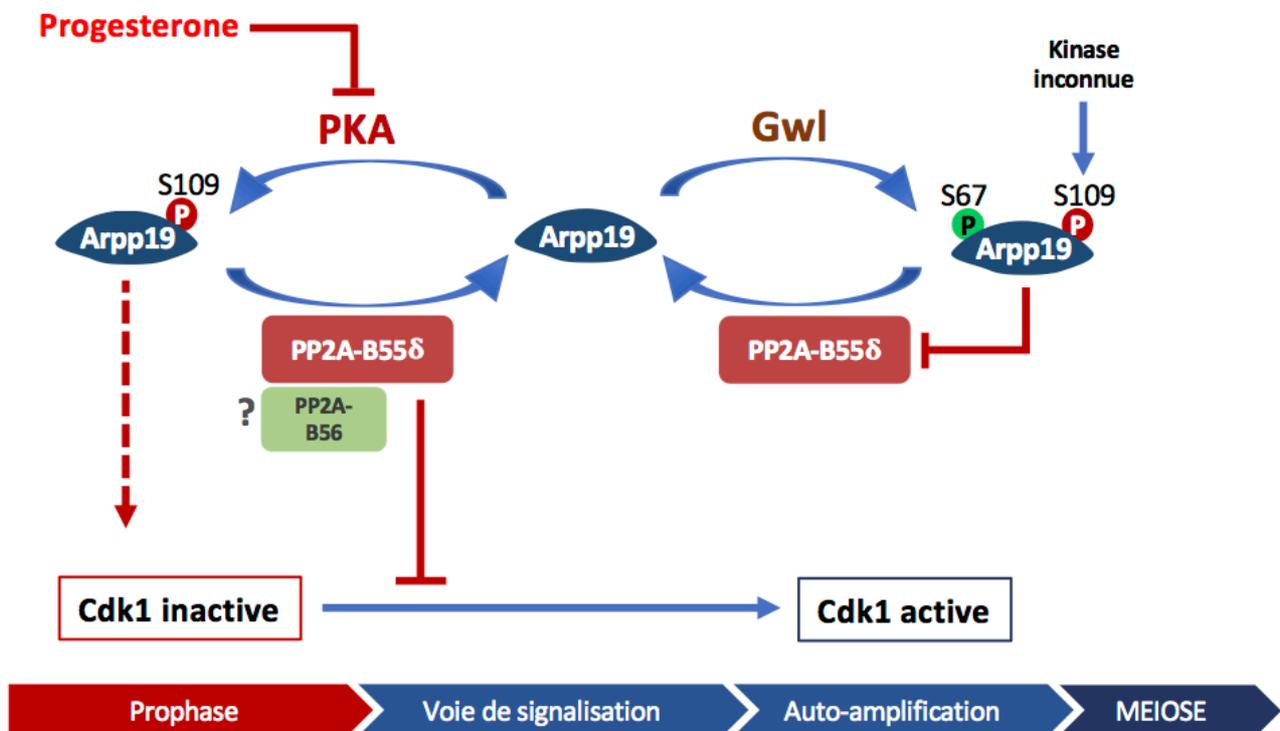


Figure 19 : Arpp19 et PP2A-B55δ, deux acteurs critiques de la maturation méiotique

En prophase, PKA et PP2A-B55δ sont actives. Arpp19 est phosphorylée sur la S109 en raison de la forte activité de PKA qui domine sur celle de PP2A-B55δ. Arpp19 inhibe l'activation de Cdk1 par un mécanisme encore inconnu. Simultanément, PP2A-B55δ contribue à l'arrêt en prophase en bloquant la phosphorylation et des substrats mitotiques et d'Arpp19 sur la S67. Le trio PKA-PP2A-Arpp19 assure ainsi un arrêt stable de l'ovocyte en prophase. L'inhibition de PKA en réponse à la progestérone permet à PP2A-B55δ de déphosphoryler Arpp19 sur la S109, ce qui lance la signalisation conduisant à l'activation initiale de Cdk1. En fin de signalisation, Cdk1 active Greatwall qui phosphoryle en retour Arpp19 sur la S67. PP2A-B55δ est inhibée. La boucle d'auto-amplification de Cdk1 devient alors fonctionnelle indépendamment de l'activité de PKA. Il est à noter qu'Arpp19 est rephosphorylée à GVBD par une kinase inconnue.

De plus, PKA et PP2A-B55 α/δ sont actives en prophase et ciblent un seul et même substrat, Arpp19. Ces deux activités produisent donc un cycle « futile » de phosphorylation et de déphosphorylation de la S109 d'Arpp19. Quel peut-être le rôle physiologique de ce mécanisme, très coûteux en énergie, pour l'ovocyte ? Enfin, si la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109 est critique pour initier la cascade moléculaire qui conduit à l'activation de Cdk1, quels sont les mécanismes moléculaires régulés directement par Arpp19 et qui bloquent ou activent la reprise de la méiose selon son état de phosphorylation sur la S109 ?

1. PP2A-B55 α/δ versus PP2A-B56

a) In vitro et en extraits

Toutes les procédures biochimiques d'isolement que nous avons développées ont montré que PP2A-B55 α/δ était systématiquement identifiée par spectrométrie de masse et détectée par western blot dans les fractions contenant l'activité PPS109. Cependant, certaines fractions ayant une activité PPS109 sont associées avec une autre isoforme de PP2A : PP2A-B56. De plus, nos expériences de déplétion dans les extraits indiquent que PP2A-B55 α/δ n'est pas la seule phosphatase capable de déphosphoryler Arpp19 sur la S109. En effet, la déplétion spécifique de PP2A-B55 α/δ n'abolit pas totalement ce processus alors que la déplétion de toutes les isoformes de PP2A par les billes de microcystine le bloque complètement. Ce résultat suggère qu'une autre isoforme de PP2A, potentiellement PP2A-B56 ϵ pour être en accord avec nos résultats de spectrométrie de masse, pourrait contribuer à l'activité PPS109 dans les extraits d'ovocytes.

Néanmoins, aucun rôle de PP2A-B56 dans le mécanisme d'activation des complexes Cdk1-Cyclines B ou même dans la voie de signalisation qui provoque la transition G2/M n'a jamais été rapporté. La seule implication de PP2A-B56 dans la régulation de Cdk1 est sa capacité de stabilisation de la protéine Erp1, ce qui contribue à l'arrêt en métaphase II des ovocytes de xénope (Heim *et al.*, 2018). En revanche, PP2A-B56 est impliquée dans l'organisation et le fonctionnement du fuseau de division dans de nombreux modèles, en particulier la protection des centromères et l'interaction kinétochore-microtubule (Chambon *et al.*, 2013 ; Kitajima *et al.*, 2006; Riedel *et al.*, 2006; Shrestha *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2013) ; Tang *et al.*, 2006). Par ailleurs, Arpp19 ne possède pas dans sa séquence de sites de reconnaissance pour PP2A-B56, suggérant qu'elle n'interagirait pas avec cette isoforme de PP2A. Néanmoins, la phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 pourrait créer un site de liaison

pour PP2A-B56, comme cela a été décrit pour Erp1 (Heim *et al.*, 2018). Le calcul des Km et des Vm de l'activité PPS109 présente dans différentes fractions contenant soit PP2A-B55 seule, soit un mélange de PP2A-B55 et de PP2A-B56 pourrait être réalisé afin de déterminer laquelle de ces deux isoformes présente une affinité plus forte pour Arpp19. Par ailleurs, l'addition d'inhibiteurs spécifiques de l'une ou de l'autre isoforme (Arpp19 thiophosphorylée sur la S67 pour PP2A-B55 et I2-PP2A pour PP2A-B56) dans les fractions actives produites en fin d'isolement biochimique, permettrait de distinguer laquelle de ces deux activités est principalement responsable de l'activité de déphosphorylation d'Arpp19. Enfin, nous pourrions tester si PP2A-B56 est capable de se lier à une forme mutante phosphomimétique d'Arpp19, le S109D, une approche souvent utilisée pour identifier la phosphatase spécifique d'un substrat donné.

Dans les extraits, les billes liées à Arpp19 thiophosphorylé sur S67 déplètent toutes les isoformes PP2A-B55 mais une quantité non négligeable de sous-unités PP2A-A et PP2A-C reste dans l'extrait après déplétion. Ces dimères PP2A-A/C peuvent être ou non associés à d'autres sous-unités régulatrices que la B55. L'existence de dimères PP2A-A/C sans sous-unité B ainsi que la proportion d'holoenzymes trimériques de PP2A dans l'ovocyte de xénope ne sont pas connues. Il a cependant été montré dans les cellules humaines que le dimère PP2A-A/C libre représente près d'un tiers de toutes les formes de PP2A et que ce dimère possède une activité enzymatique *in vitro* (Kremmer *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'activité de ces dimères est stimulée par la présence d'ATP (Guo *et al.*, 2014). Les dosages d'activité PPS109 dans les extraits étant réalisés en présence d'ATP, les dimères PP2A-A/C pourraient être actifs et déphosphoryleraient Arpp19 de manière aspécifique. L'activité PPS109 mesurée dans les extraits pourtant déplétés de l'holoenzyme PP2A-B55δ pourrait donc être due à l'activité de ces dimères et ne pas refléter une réalité physiologique. Enfin, la spécificité des phosphatases PPPs est gouvernée non seulement par leur liaison à des sous-unité régulatrices mais également par leur localisation et leur environnement cellulaire (Slupe *et al.*, 2011). Ceci est particulièrement vrai pour PP2A-B56 dont les rôles en phase-M sont pilotés par sa localisation très confinée au niveau des centromères et des kinétochores. *In vitro* ou dans les extraits acellulaires, la destruction des compartiments intracellulaires peut libérer des phosphatases, comme PP2A-B56, qui peuvent alors entrer en contact avec des protéines qu'elles sont capables de déphosphoryler *in vitro* alors qu'elles ne sont jamais en contact avec elles au sein de la cellule intacte et ne les régulent pas. Il était donc indispensable de valider nos résultats dans l'ovocyte.

b) B55 et B56, quelle contribution dans l'ovocyte ?

Plusieurs approches complémentaires d'invalidation peuvent être développées pour étudier le rôle respectif de PP2A-B55 et PP2A-B56 dans l'ovocyte de xénope : des inhibiteurs pharmacologiques, la surexpression de peptides contenant les sites spécifiques de reconnaissance pour les différentes isoformes de PP2A, ou encore les inhibiteurs protéiques spécifiques de PPPs comme Arpp19 thiophosphorylée sur la S67 qui inhibe spécifiquement PP2A-B55 δ ou I2-PP2A qui inhibe spécifiquement PP2A-B56 (Dupré *et al.*, 2013; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Hino *et al.*, 2015; Mochida *et al.*, 2010).

Les inhibiteurs pharmacologiques actuellement disponibles ne permettent pas de distinguer de manière fine le rôle des différentes PPPs en raison des caractéristiques structurales et biochimiques de ces enzymes. Ainsi, l'acide okadaïque se lie au site actif de PP1 et PP2A et inhibe leur activité avec un IC₅₀ d'environ 15-50 nM pour PP1 et 0,1-0,3 nM pour PP2A (Swingle *et al.*, 2007) (Voir Tableau). A la concentration de 100 nM, l'acide okadaïque est capable d'inhiber PP4 et PP6. Un autre inhibiteur de PP1 et PP2A est la microcystine mais son mécanisme d'action est similaire à celui de l'OA. L'injection de peptides contenant des motifs de reconnaissance spécifiques de certaines phosphatases (RVxF pour PP1, LxxIxE pour PP2A-B56, FxxV pour PP4) pourrait moduler l'activité de différentes PPPs. Ainsi, la surexpression d'un peptide contenant le motif SlIM RVTF dans des cellules humaines est capable de changer l'activité de PP1c en entrant en compétition avec l'inhibiteur I2 (Chatterjee *et al.*, 2012). Cependant, cette approche peut fournir des résultats dont l'interprétation est délicate car, comme décrit dans le chapitre II, ces motifs sont soumis à des modifications post-traductionnelles qui influent sur la liaison phosphatase-substrat et leur régulation précise n'est pas forcément connue *in vivo*. De plus, certains substrats ne possèdent pas ces motifs de reconnaissance. Enfin, l'inhibition des interactions aura un impact global sur l'ensemble de tous les substrats de la phosphatase possédant le motif donné, ne permettant pas de différencier les effets de la phosphatase vis-à-vis de ses différents substrats. L'approche la plus rigoureuse pour inhiber de façon spécifique une phosphatase est donc *a priori* l'utilisation d'inhibiteurs protéiques spécifiques, en particulier si leur régulation est connue. Ainsi, PP1 est inhibée directement par plusieurs de ses PIPs comme I1 (inhibitor-1), I2 (Inhibitor 2), DARPP32 ou encore la protéine exclusivement nucléaire NiPP1 (nuclear inhibitor of PP1). Certaines isoformes de PP2A sont également la cible d'inhibiteurs spécifiques. La protéine Set/I2PP2A inhibe spécifiquement PP2A-B56 et est requise *in vivo* pour la séparation des chromatides-sœurs lors de la deuxième division méiotique chez la souris (Chambon *et al.*, 2013). Les protéines ENSA/Arpp19 sont des

inhibiteurs spécifiques de PP2A-B55 α/δ (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010 ; Mochida *et al.*, 2010). La découverte de ces inhibiteurs spécifiques a permis de mieux comprendre certaines des fonctions spécifiques de différentes isoformes des PPPs au cours de la division cellulaire. Nous avons donc choisi cette approche pour valider *in vivo* l'identité de PPS109. L'inhibition spécifique de PP2A-B55 α/δ par injection de la protéine Arpp19 thiophosphorylée sur la S67 (Arpp19-thioS67) bloque la déphosphorylation de la protéine Arpp19 endogène sur la S109 en réponse à la progestérone, montrant sans ambiguïté que PP2A-B55 α/δ est la phosphatase majeure qui déphosphoryle Arpp19 sur la S109 lors de la reprise de la méiose. Plus, cet inhibiteur conduit à une augmentation du niveau de phosphorylation d'Arpp19 sur la S109, montrant que dans la cellule intacte, en prophase, la totalité des molécules d'Arpp19 n'est pas phosphorylée sur la S109. Si la balance PKA/ PP2A-B55 α/δ est en faveur de PKA, la phosphatase est néanmoins active et son inhibition permet à PKA de phosphoryler l'intégralité du stock d'Arpp19.

PP2A-B55 α/δ assure donc bien la déphosphorylation d'Arpp19 sur S109. Cependant, PP2A-B56 pourrait jouer un rôle dans ce processus. La régulation de cette isoforme est totalement inconnue lors de la reprise de la méiose. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II, les phosphatases fonctionnent parfois sous la forme de relais, pour réguler à la fois l'état de phosphorylation de substrats distincts mais aussi pour moduler leurs activités mutuelles. Dans les neurones dopaminergiques, l'inhibition de PP1 induite par DARPP32 dépend des activités de PP2A et de PKA (Leslie and Nairn, 2019). En fin de division cellulaire, la réactivation de PP2A-B55 dépend de l'activité de PP1 (Grallert *et al.*, 2015; Heim *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle potentiel de PP2A-B56 *in vivo* dans les mécanismes qui conduisent à l'activation de Cdk1 dans l'ovocyte. Cette analyse peut être conduite soit par une approche "perte de fonction" en injectant son inhibiteur spécifique, Set/I2PP2A (Hino *et al.*, 2015), soit par une approche "gain de fonction" en injectant l'holoenzyme PP2A-B56 produite par des cellules Sf9 ou la sous-unité B56. Lors de mon doctorat, j'ai débuté ces expériences "gain-de-fonction" en injectant des ARNm codants pour les sous-unités de xénope B55 δ et B56 γ . B55 δ est étiquetée par des histidines (B55 δ -His) alors que B56 γ est étiquetée par Flag (B56 γ -Flag) (Figure 20A). La surexpression de B55 δ -His ralentit fortement, voire bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone, un effet lié à son activité antagoniste de celle de Cdk1 au niveau de la boucle d'auto-amplification (Figure 20B). J'ai vérifié par pull-down que la protéine s'associait bien aux dimères PP2A-A/C dans l'ovocyte (Figure 20C).

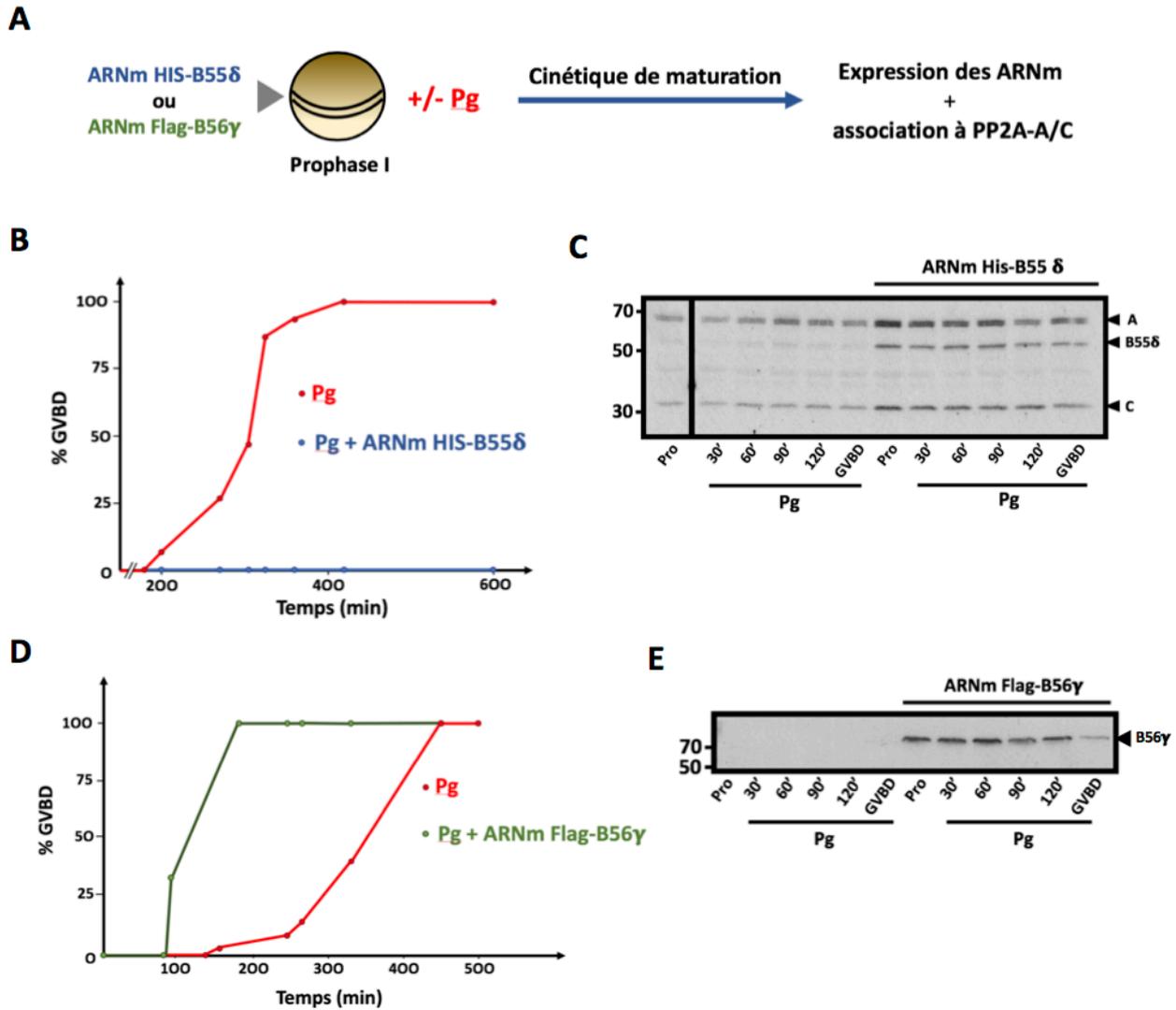


Figure 20 : La surexpression des sous-unités B55δ et B56γ ont des effets opposés sur la reprise de la méiose

A. Protocole expérimental. Les ovocytes bloqués en prophase sont injectés avec des ARNm codants pour la sous-unité His-B55δ ou Flag-B56γ puis stimulés par la progestérone le lendemain matin. La reprise de la méiose est suivie en déterminant le pourcentage d'ovocytes à GVBD en fonction du temps. L'expression de B55 et de B56 ainsi que leur association à PP2A-A/C sont analysés par Western Blot.

B. La surexpression de His-B55δ bloque l'apparition de GVBD en réponse à la progestérone.

C. Association de His-B55δ avec PP2A-A et PP2A-C en réponse à la progestérone (Pg). B55δ est purifiée des ovocytes collectés à différents temps après l'addition de la progestérone par pull down sur billes de nickel. Son association aux dimères PP2A-A/C est visualisée par western blot à l'aide d'anticorps anti-Histidine et anti-PP2A-A/C.

D. L'injection de l'ARNm codant pour la B56γ étiquetée avec Flag facilite l'apparition de GVBD en réponse à la progestérone.

E. Analyse de l'expression de la B56γ lors de la reprise de la méiose induite par la progestérone par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag.

En revanche, l'injection d'ARN codants pour B56 γ -Flag facilite la reprise de la méiose déclenchée par la progestérone, voire l'induit en absence de progestérone chez certaines femelles (Figure 20D-E). Bien que ces résultats soient très préliminaires, ils suggèrent que les holoenzymes PP2A-B55 δ et PP2A-B56 γ ont des effets opposés sur l'activation de Cdk1, agissant probablement par l'intermédiaire de substrats distincts, qui restent à identifier, au moins pour B56. Par ailleurs, l'effet positif de la B56 pourrait artificiellement contrebalancer l'effet inhibiteur de B55 en modifiant la proportion des holoenzymes endogènes PP2A-B55 et PP2A-B56. Si mes résultats ont éclairci le rôle de B55 δ dans la reprise de la méiose ovocytaire chez le xénope, des études plus poussées méritent d'être menées sur les différentes isoformes de PP2A : Quels sont leurs substrats ? Sont-elles impliquées dans la voie de signalisation en amont de l'activation de Cdk1, dans la formation de l'amorce active de Cdk1 ou dans l'auto-amplification ? Agissent-elles en relais ou en compétition, l'une inhibant l'autre ? Comment sont-régulées ? Si PP2A-B55 n'est pas régulée par la progestérone, PP2A-B56 peut-elle être activée suite à l'inhibition de PKA ?

2. L'équilibre PKA/PP2A-B55 α/δ en prophase

Nos résultats établissent que la phosphorylation d'Arpp19 sur la S109 est soumise à un turn-over en prophase car les deux enzymes qui la régulent, PKA et de PP2A-B55 α/δ , sont actives. Cet équilibre est en faveur de PKA, qui par ailleurs, ne régule pas sa phosphatase antagoniste, PP2A-B55 α/δ . Ce processus repose donc sur un cycle "futile" de phosphorylation qui maintient la S109 sous une forme prédominante phosphorylée. Ce type de processus, très coûteux en énergie en raison de la consommation en ATP, n'est généralement pas privilégié par les cellules. Il doit néanmoins présenter un intérêt dans l'ovocyte pour avoir été sélectionné. En premier lieu, un tel cycle interdit une bascule brutale de type "interrupteur-commutateur" d'un état du substrat qui serait 100% phosphorylé à un état 100% déphosphorylé. C'est effectivement ce que suggère la phosphorylation d'Arpp19 sur S109. Il serait intéressant d'utiliser des approches de modélisation mathématique permettant d'éclairer comment une phosphorylation partielle d'Arpp19 en prophase, et surtout, une déphosphorylation partielle des mêmes molécules en réponse à la progestérone permettent de commander l'arrêt ou au contraire la reprise de la division méiotique, sans obéir à une loi du "tout ou rien". En second lieu, les deux enzymes antagonistes, PKA et PP2A-B55 α/δ , étant actives, elles peuvent cibler d'autres substrats qu'Arpp19 qui garantissent l'arrêt en prophase de l'ovocyte. Ainsi, PKA phosphoryle Cdc25 sur la S287, ce qui prévient son activation, et pourrait contribuer par phosphorylation à

l'activité de Myt1 (Duckworth *et al.*, 2002), comme elle le fait pour Wee1 dans l'ovocyte de souris (Han and Conti, 2006). Elle pourrait éventuellement cibler Greatwall pour l'inactiver comme cela a été décrit dans les neurones du striatum et chez la levure (Musante *et al.*, 2017 ; Luo *et al.*, 2011). En accord avec cette hypothèse, l'injection de la forme K71M-Greatwall est incapable d'activer Cdk1 en présence d'une forte activité PKA dans l'ovocyte de xénope (Dupré *et al.*, 2013). Enfin, PKA pourrait phosphoryler certains inhibiteurs de PP1 de façon à la maintenir sous une forme inactive, sachant que l'activité de PP1 est requise pour lancer la voie de signalisation qui permet l'activation de Cdk1 (Huchon *et al.*, 1981). L'activité de PP2A-B55 α/δ en prophase permet certainement de maintenir les substrats de Cdk1 sous une forme non-phosphorylée, assure que Greatwall reste inactive et bloque également directement toute phosphorylation d'Arpp19 sur la S67 (Castilho *et al.*, 2009; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010 ; Mochida *et al.*, 2009 ; Mochida *et al.*, 2010 ; Williams *et al.*, 2014), autant d'évènements qu'il est nécessaire de contenir pour éviter toute reprise prématurée de la méiose.

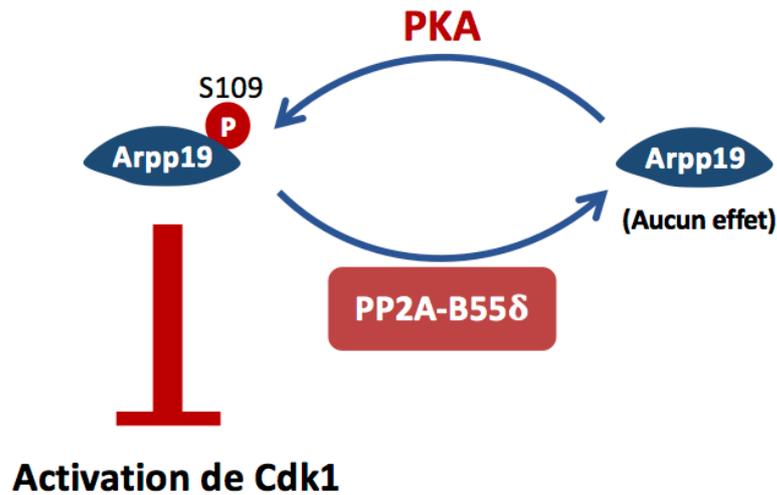
3. Quels mécanismes sous le contrôle d'Arpp19 ?

En prophase, Arpp19 est phosphorylée sur la S109 et bloque la voie conduisant à l'activation de Cdk1. En réponse à la progestérone, la déphosphorylation de ce résidu est critique pour lancer cette voie. Arpp19 phosphorylée par PKA pourrait donc bloquer l'un des mécanismes de la signalisation requis pour l'activation de Cdk1. Sa déphosphorylation en réponse à la progestérone pourrait, soit lever l'inhibition exercée par la phosphorylation de la S109 sans que cette forme déphosphorylée n'ait d'action en propre, soit déclencher activement la voie de signalisation, autorisant ainsi l'activation de Cdk1 (Figure 21).

a) Arpp19 phosphorylée par PKA peut-elle réguler l'activité de PP2A-B55 α/δ ?

In vitro, PKA et Greatwall sont capables de phosphoryler Arpp19 lorsqu'elles sont ajoutées conjointement (Dupré *et al.*, 2017). De plus, la mutation de la S109 en « A » ou « D » n'empêche pas la phosphorylation de la S67 par Greatwall *in vitro* (Dupré *et al.*, 2017). La phosphorylation par PKA ne bloque donc pas la phosphorylation catalysée par Greatwall et réciproquement (Dupré *et al.*, 2017). *In vivo*, Arpp19-S109D ne se lie pas à la phosphatase que ce soit en prophase ou en réponse à la progestérone (Dupré *et al.*, 2014). La phosphorylation sur la S109 pourrait ainsi empêcher l'interaction d'Arpp19 avec PP2A-B55 δ , comme cela a été décrit dans les neurones (Andrade *et al.*, 2017; Musante *et al.*, 2017).

➤ **Hypothèse 1**



➤ **Hypothèse 2**

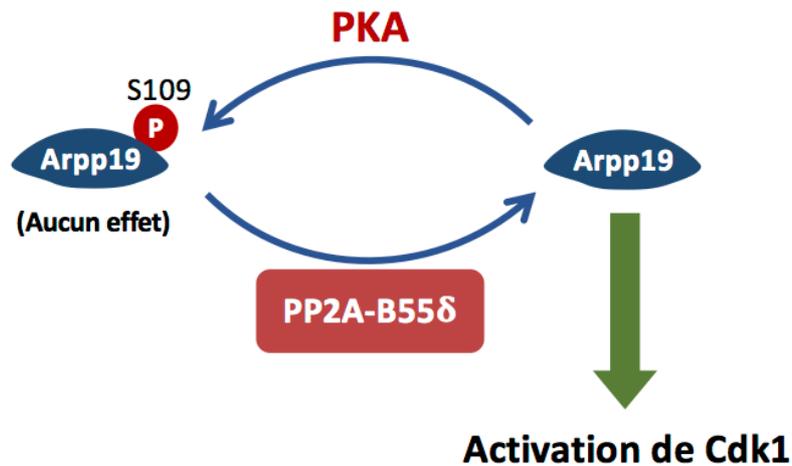


Figure 21 : Mécanismes intracellulaires sous le contrôle d'Arpp19 phosphorylée sur la S019 ou déphosphorylée

Hypothèse 1 : Arpp19 phosphorylée sur la S109 bloque l'activation de Cdk1. Cette inhibition est levée par la déphosphorylation d'Arp19 sur la S109. La forme d'Arpp19 déphosphorylée n'a pas de rôle en soi.

Hypothèse 2 : La forme d'Arpp19 déphosphorylée active un mécanisme nécessaire à l'activation de Cdk1 et contourne le mécanisme responsable de l'arrêt en prophase.

Cette hypothèse semble peu probable. En effet, avant l'activation de Cdk1, la S109 d'Arpp19 est rephosphorylée et n'empêche pas la liaison d'Arpp19 à PP2AB55δ ni son inhibition.

Une autre hypothèse est que Arpp19 phosphorylée sur la S109 inhibe sa propre phosphorylation sur la S67 par Greatwall dans l'ovocyte selon un mécanisme semblable à celui décrit dans les neurones du striatum pour Arpp16. Là encore, cette hypothèse semble exclue pour différentes raisons. La première est à nouveau le fait qu'Arpp19 est rephosphorylée sur S109 avant que ne se produise sa phosphorylation sur S67 par Greatwall, ce dernier événement n'étant pas impacté par le premier. Ajoutons que l'injection de Greatwall-K71M conduit à la phosphorylation de la S67 d'Arpp19 phosphomimétique sur S109 (S109D) (Dupré *et al.*, 2014). (Figure 22)

b) Arpp19 et la synthèse protéique

L'inhibition de PKA en réponse à la progestérone est nécessaire pour la traduction de la Cycline B1 (et B4) et de la kinase Mos (Haccard and Jessus, 2006). Chez la levure et dans les neurones, Arpp19 est impliquée dans la traduction et la stabilité des ARNm (Irwin *et al.*, 2002; Talarek *et al.*, 2010), une action reposant sur des interactions protéiques, et sous le contrôle du résidu S104, homologue de la S109 de xénope (Irwin *et al.*, 2002). Arpp19 pourrait jouer un rôle similaire dans l'ovocyte de xénope. Phosphorylée par PKA, elle bloquerait la synthèse de certaines protéines requises pour l'activation de Cdk1. Déphosphorylée sur la S109, elle autoriserait leur synthèse et/ou leur accumulation, en particulier celles de la Cycline B1 et de Mos qui sont toutes les deux redondantes dans l'activation de Cdk1 (Figure 23). Le suivi de l'accumulation de la Cycline B1 et de Mos dans des ovocytes injectés avec Arpp19-S109A ou S109D, en réponse à la progestérone ou à l'inhibition de PKA par PKI, permettrait de répondre à cette question. Cdk1 n'étant pas activée en présence d'Arpp19-S109D, il est peu probable que la voie Mos/MAPK le soit puisqu'elle dépend d'une activité Cdk1. Si la Cycline B1 s'accumule en réponse à la forme non-phosphorylable d'Arpp19, S109A, il sera essentiel de suivre son association à la forme libre de Cdk1 et la phosphorylation des néocomplexes Cdk1-Cycline B1 sur Y15. Par ailleurs, si l'accumulation de la Cycline B1 est observée en réponse à la progestérone en présence d'Arpp19-S109D, cela indiquera que la voie de signalisation emprunte deux voies indépendantes suite à l'inhibition de PKA : l'une étant dépendante de la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109 sans affecter la traduction/accumulation de Cycline B1, l'autre régulant la synthèse de protéines-clés comme la Cycline B1 selon un mécanisme indépendant de la déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109 (Figure 23).

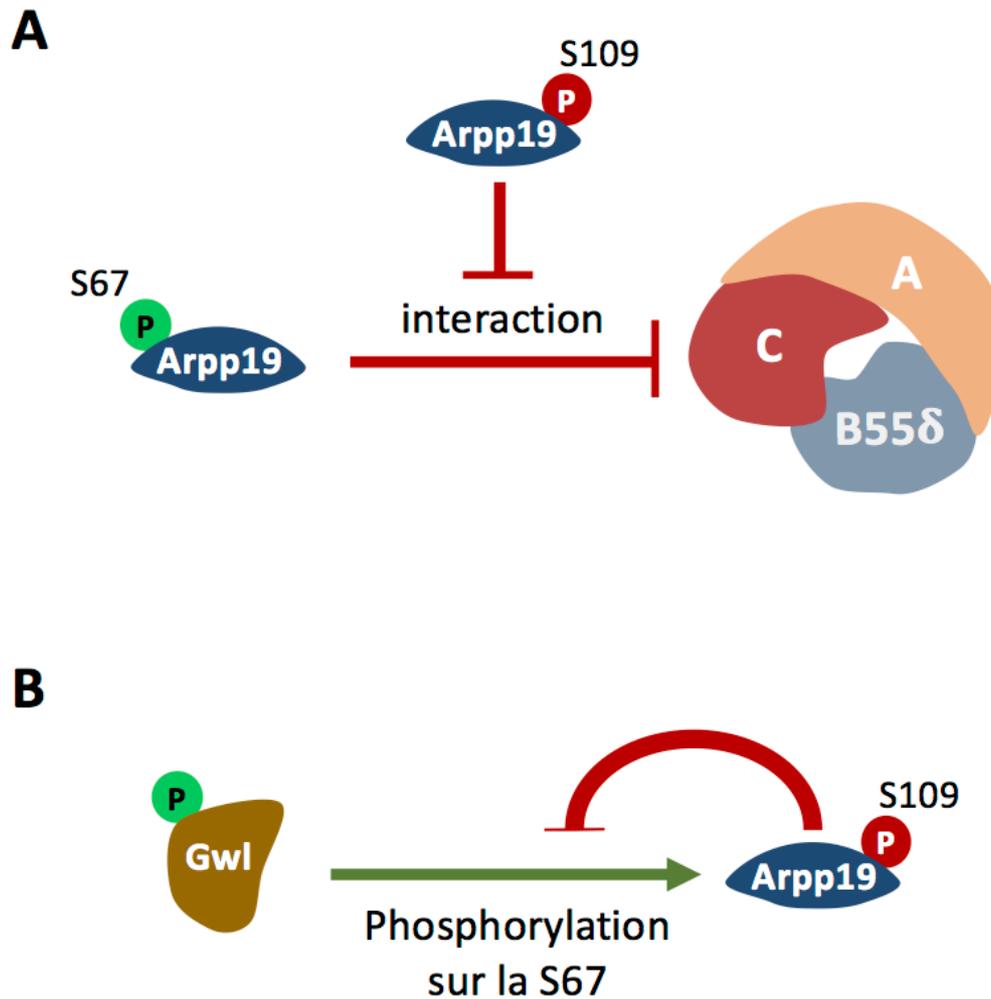


Figure 22 : Arpp19-S109 phosphorylée sur la S109 empêcherait l'inhibition de PP2A-B55δ

Arpp19 phosphorylée sur la S109 régule négativement le module Greatwall/Arpp19 pour inactiver PP2A-B55δ.

- A. La forme phosphorylée par PKA d'Arpp19 sur la S109 bloque l'interaction entre Arpp19 phosphorylée sur la S67 et PP2A-B55δ.
 - B. Arpp19 phosphorylée sur la S109 inhibe sa propre phosphorylation par Greatwall et permet de maintenir PP2A-B55δ active.
-

Ces résultats révéleraient que PKA cible plusieurs substrats critiques pour le contrôle de la reprise de la méiose chez le xénope.

c) **Arpp19 et la localisation intracellulaire des acteurs de Cdk1**

Arpp19 a été décrite comme une protéine cytoplasmique. Les résultats préliminaires du laboratoire indiquent qu'Arpp19 est présente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de l'ovocyte de xénope en prophase. La répartition de cette protéine, soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme, n'apparaît donc pas critique pour son action dans le maintien de la prophase lorsqu'elle est phosphorylée sur S109. Elle pourrait cependant influencer la localisation intracellulaire et en conséquence, l'activation d'acteurs cruciaux pour la reprise de la méiose. La localisation intracellulaire des différents régulateurs de Cdk1 est étroitement contrôlée et participe au déclenchement de la mitose dans les lignées cellulaires étudiées et dans les ovocytes de souris et d'étoile de mer. A titre d'exemple, en réponse aux dommages à l'ADN, mais aussi dans les ovocytes de souris en prophase, Cdc25C est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3, ce qui prévient l'activation des complexes Cdk1-Cycline B dans le noyau (Kumagai and Dunphy, 1999; Pirino *et al.*, 2009a). Dans les cellules humaines, la localisation au centrosome de Cdc25B et d'Aurora A permet une activation localisée de Cdk1-Cycline B essentielle pour la régulation temporelle de l'entrée en phase-M (Dutertre *et al.*, 2004 ; Lindqvist *et al.*, 2005). Néanmoins, l'activation de Cdk1 se fait très bien en réponse à la progestérone ou à un transfert de cytoplasme dans des ovocytes de xénope énucléés. Le noyau ne joue donc pas de rôle essentiel dans l'activation de Cdk1. Rappelons aussi que l'ovocyte de xénope est dépourvu de centriole et de centrosome.

In vitro, ENSA interagit avec les membranes lipidiques (Boettcher *et al.*, 2008). Cette interaction lui permet d'adopter une structure hélicoïdale alors qu'elle est, comme Arpp19, une protéine non-structurée. Ce changement structural est essentiel pour l'interaction d'ENSA avec la protéine α -synucléine et est bloqué lorsque la S109 d'ENSA est mutée en un résidu phosphomimétique (Boettcher *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation par PKA d'ENSA/Arpp19 a le potentiel de moduler l'interaction de ces protéines avec les membranes lipidiques. Ces changements structuraux, gouvernés par des modifications de l'environnement extracellulaire, des modifications post-traductionnelles et/ou des interactions protéines-protéines, permettent aux protéines désordonnées d'interagir avec de multiples cibles souvent distinctes (Tompa *et al.*, 2005; Wright and Dyson, 1999).

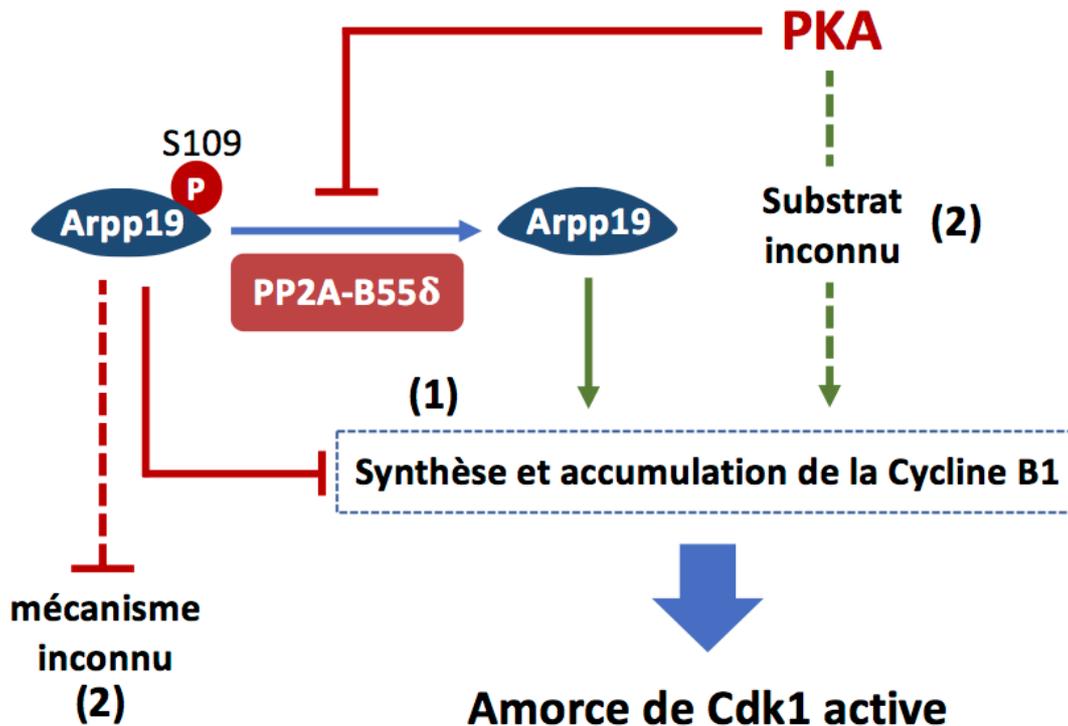


Figure 23 : Arpp19 phosphorylée sur la S109, un inhibiteur de la traduction ?

En réponse à la progestérone, l'inhibition de PKA provoque la synthèse de la Cycline B1 et de Mos.

- (1) Arpp19 phosphorylée sur S109 ou non-phosphorylée respectivement inhibe ou active la traduction de la Cycline B1 et de Mos.
- (2) L'inhibition de PKA active deux mécanismes indépendants mais nécessaires pour l'activation de Cdk1. La déphosphorylation d'Arpp19 sur la S109 lève le mécanisme d'inhibition exercé sur Cdk1 en prophase. Simultanément, l'inhibition de PKA régule positivement la traduction de la Cycline B1 et de Mos indépendamment d'Arpp19 et par l'intermédiaire de la déphosphorylation d'un substrat de PKA encore inconnu.

Arpp19 pourrait donc être soumise à ce type de régulation et voir ses interactions, et donc sa localisation, modifiées selon l'état de sa phosphorylation sur la S109. De manière intéressante, la modification du trafic intracellulaire ou du métabolisme des lipides dans l'ovocyte de xénope est capable d'induire la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale, et selon des mécanismes qui dépendent de l'inhibition de PKA et des synthèses protéiques (Coll *et al.*, 2007; De Smedt *et al.*, 1995; Morrill and Kostellow, 1998; Mulner-Lorillon *et al.*, 1995). De plus, certains des régulateurs de Cdk1 présentent des localisations membranaires particulières dans l'ovocyte, comme Myt1 qui est associée aux lamelles annelées (Gaffre *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 1995b). La forme monomérique libre de Cdk1 est également capable de s'associer *in vitro* à des vésicules membranaires (De Smedt *et al.*, 1999). Les Cyclines restent capables de s'associer à ce Cdk1 et les néo-complexes Cdk1-Cycline ne sont alors pas inhibés par phosphorylations. De manière surprenante, ils restent inactifs, suggérant que les vésicules membranaires empêchent l'activation de la kinase indépendamment de son état de phosphorylation (De Smedt *et al.*, 1999). Il serait dès lors intéressant de déterminer si la phosphorylation par PKA d'Arpp19 a le potentiel de bloquer la reprise de la méiose lorsque le métabolisme des lipides ou le trafic intermembranaire de la cellule sont modifiés afin de comprendre si des interactions entre Arpp19 et des structures lipidiques peuvent contrôler la reprise de la méiose.

Pour conclure, nos résultats établissent comment la régulation réciproque de PP2A-B55 δ et Arpp19 orchestrent la synchronisation de la première division méiotique des ovocytes de xénope selon un processus en 3 étapes. Tout d'abord, Arpp19 phosphorylée sur la S109 et PP2A-B55 δ sécurisent l'arrêt en prophase : PP2A-B55 δ empêche toute phosphorylation qui pourrait conduire à une activation non programmée de Cdk1, alors que l'action d'Arpp19 phosphorylée sur la S109 n'est pas encore connue. Deuxièmement, la progestérone déclenche l'inhibition de PKA tandis que PP2A-B55 δ reste active. Arpp19 est alors déphosphorylée sur la S109 et lance la voie de signalisation de plusieurs heures qui se termine par l'activation de Cdk1. L'activité de PP2A-B55 δ empêche l'activation prématurée de Cdk1 et laisse ainsi suffisamment de temps pour que la voie de signalisation lance les événements requis à son activation, en particulier la traduction des nouvelles protéines nécessaires aux divisions méiotiques. La troisième étape correspond à la bascule brutale de l'activité de Cdk1 ou auto-amplification, reposant sur la formation de quelques molécules de Cdk1 actives. Celles-ci activent Greatwall qui phosphoryle Arpp19 sur la S67 et inhibe ainsi PP2A-B55 δ . Ceci régit l'entrée irréversible en phase-M. Puisque PP2A-B55 δ est inhibée, Arpp19 peut être rephosphorylée sur la S109 par

une kinase distincte de PKA. Le rôle de ce nouveau phosphate S109, le cas échéant, est inconnu. Ainsi, nous avons découvert qu'une double fonction de PP2A-B55 δ et de son substrat, Arpp19, gouverne la reprise de la méiose ovocytaire, ouvrant de nouvelles voies dans le contrôle de la méiose ovocytaire et plus largement dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire.

ARTICLE

The M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55 δ opposes protein kinase A on Arpp19 to initiate meiotic division

The M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55 δ opposes protein kinase A on Arpp19 to initiate meiotic division

Tom Lemonnier, Enrico Maria Daldello[#], Robert Poulhe, Tran Le, Marika Miot, Catherine Jesus^{*}, Aude Dupré^{*§}

Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement - Institut de Biologie Paris Seine, LBD - IBPS, F-75005 Paris, France

[#]Present address: Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, CA 94143, USA

[§]Corresponding author

^{*}These authors contributed equally to this work.

Running title: Meiotic division under control of the Arpp19-PKA-PP2A trio

Key Words: Meiotic division, Arpp19, PP2A, PKA, Greatwall, Cdk1, *Xenopus* oocyte

ABSTRACT

Oocytes are held in meiotic prophase for prolonged periods until hormonal signals trigger meiotic divisions. Key players of M-phase entry are the opposing Cdk1 kinase and PP2A-B55 δ phosphatase. In *Xenopus*, the protein Arpp19, phosphorylated at serine 67 by Greatwall, plays an essential role in inhibiting PP2A-B55 δ , promoting Cdk1 activation. Furthermore Arpp19 has an earlier role in maintaining the prophase arrest through a second serine (S109) phosphorylated by PKA. Prophase release, induced by progesterone, relies on Arpp19 dephosphorylation at S109, owing to an unknown phosphatase. Here we identified this phosphatase as PP2A-B55 δ . In prophase, PKA and PP2A-B55 δ are simultaneously active, suggesting the presence of other important targets for both enzymes. The drop in PKA activity induced by progesterone enables PP2A-B55 δ to dephosphorylate S109, unlocking the prophase block. Hence, PP2A-B55 δ acts critically on Arpp19 on two distinct sites, opposing PKA and Greatwall to orchestrate the prophase release and M-phase entry.

INTRODUCTION

In vertebrates, oocyte meiotic divisions are controlled by the cAMP-dependent protein kinase A, PKA. The activity of PKA is responsible for arresting fully-grown oocytes in prophase of the first meiotic division for long-lasting periods in order to allow cell growth and nutrient accumulation required for fertilization and the early embryogenesis^{1,2}. The post-transcriptional mechanisms controlled by PKA in oocytes were largely unknown until the identification of the protein Arpp19 as its long sought substrate in *Xenopus*³. In this species, Arpp19 phosphorylation at S109 by PKA is critical to maintain oocytes arrested in prophase. Release from the prophase block is promoted by progesterone, which triggers within 0.5h a drop in the cAMP concentration and the down-regulation of PKA activity. As a result, Arpp19 is dephosphorylated at S109 and unlocks a signaling pathway that leads within 3 to 5h to the activation of the Cdk1-Cyclin B complex, or MPF (M-phase promoting factor), the universal inducer of eukaryotic cell division. Once activated, Cdk1-Cyclin B complexes trigger the resumption of the first meiotic cell division which starts with nuclear envelope breakdown, termed germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes⁴.

The biochemical steps linking PKA downregulation and Arpp19 dephosphorylation at S109 to Cdk1-Cyclin B activation involve the translation of two proteins, Cyclin B and the kinase Mos⁵. Newly synthesized Cyclin B associates with free Cdk1 while Mos indirectly activates MAPK (mitogen-activated protein kinase). Both events allow the formation of newly active Cdk1-Cyclin B complexes and the hyperphosphorylation of the two opposed regulators of Cdk1, the phosphatase Cdc25 and the kinase Myt1⁴. Upon phosphorylation, Cdc25 activates Cdk1 by dephosphorylating T14 and Y15, whereas its antagonistic enzyme, Myt1, is concomitantly inhibited⁶. Importantly, Cdk1 activation also requires the inhibition of a specific phosphatase, the PP2A-B55 δ isoform, which counteracts Cdk1-dependent phosphorylations of mitotic/meiotic substrates, including Cdc25 and Myt1⁷. PP2A-B55 δ inhibition is achieved by Arpp19, a specific inhibitor of this phosphatase when phosphorylated at S67 by the kinase Greatwall (Gwl)^{8,9}. Hence, Arpp19 is a central player of meiosis resumption through two distinct functions at two different periods. In prophase oocytes, Arpp19 is phosphorylated by PKA at S109 and holds the prophase block. Upon hormonal stimulation, its dephosphorylation at S109 occurs within 1h and unlocks a signaling pathway leading to meiotic division. At the very end of this molecular pathway, 3 to 5h later, Arpp19 is phosphorylated at S67 by Gwl and inactivates PP2A-B55 δ , hence promoting Cdk1-Cyclin B activation⁴.

The molecular regulation of this last step, involving Gwl, Arpp19 and PP2A, has been well deciphered in mitosis and meiosis. PP2A is a major S/T protein phosphatase conserved across eukaryotes. It acts as a heterotrimeric complex composed of a catalytic C subunit, a scaffolding A subunit, and a variable B subunit which regulates PP2A intracellular localization and substrate specificity¹⁰. Eukaryotes have four B-subunit families known as B (B55), B' (B56), B'' (PR72) and B''' (striatin), each of them comprising several very close isoforms whose number differs according the species¹¹. From yeast to humans, Gwl kinase displays conserved functions in mitosis¹² which are mediated by the phosphorylation of its sole substrate identified so far, Arpp19, and its paralog, α -endosulfine (ENSA). ENSA and Arpp19 derive from the duplication of an ancestral gene that evolved through new duplications and losses (<http://www.ensembl.org>; <http://www.treefam.org>), providing from one to four homologues in the different species^{13,14}. Both Arpp19 and ENSA share highly conserved sequence identity/similarity across most eukaryotes. Their most conserved region is centered around the FDS₆₇GDY motif (*X. laevis* numbering). Within this motif, S67 is phosphorylated by Gwl to the same extent in Arpp19 and ENSA, generating phosphorylated proteins that bind to and equally inhibit the specific PP2A-B55 δ isoform by titrating the phosphatase away from all other substrates and making themselves its preferential substrates^{15,16}. Whether Arpp19 and ENSA display specific functions is not clear, although some evidence shows that, unlike ENSA, Arpp19 plays an essential role during mouse embryogenesis and in regulating mitotic and meiotic divisions¹⁷. In *Xenopus* oocyte, it is clearly established that S67 phosphorylation of Arpp19 by Gwl promotes its binding to PP2A-B55 δ and the inhibition of the phosphatase^{18,19}. Released from the activity of its opposite enzyme, Cdk1 phosphorylates its two antagonistic

regulators, Cdc25 and Myt1, setting up the positive feedback loop responsible for its abrupt and full activation⁴. Importantly, the Gwl/Arpp19/PP2A-B55 δ module is under the control of Cdk1, being included inside the auto-activation loop. Hence, the antagonistic relationship between Arpp19-Gwl and PP2A-B55 δ greatly contributes to the abruptness and irreversibility of cell division entry²⁰.

PKA phosphorylates ENSA and Arpp19 at a consensus RKP/SS₁₀₉LV motif (*X. laevis* numbering) conserved among most animals. Specific functions have been attributed to the PKA-phosphorylated form of Arpp19/ENSA, notably in striatal neurons upon dopaminergic stimulation²¹. No specific role related to cell division had been described until we discovered that Arpp19 phosphorylation by PKA is essential to arrest *Xenopus* oocytes in prophase³. The S109 phosphorylation by PKA does not impede the phosphorylation at S67 by Gwl nor its ability to inhibit PP2A-B55 δ when phosphorylated at S67²². Moreover, Arpp19 is rephosphorylated at S109 by an unknown kinase distinct from PKA, concomitantly with its S67 phosphorylation by Gwl, at time of Cdk1 activation³. Thus, the events controlled by the S109 phosphorylation of Arpp19 that maintain the prophase block in oocytes remain an open question. Another key issue to unravel the prophase release regards the identity of the phosphatase that dephosphorylates Arpp19 at S109 at the onset of meiosis resumption. Since this event is important to unlock the transduction pathway leading to cell division, this unidentified phosphatase is a critical player of oocyte meiotic division.

Here, we identify PP2A-B55 δ as the phosphatase that dephosphorylates Arpp19 at S109, thus enabling oocytes to resume meiosis. The level of Arpp19 phosphorylated at S109 in prophase-arrested oocytes results from a balance between PKA and PP2A-B55 δ activities in favor of the kinase. Upon hormonal stimulation, PP2A-B55 δ activity remains unchanged while PKA is downregulated, leading to the partial dephosphorylation of Arpp19 at S109 that unlocks the prophase arrest. Therefore, the timing of meiosis resumption relies on the temporal coordination of S109 and S67 phosphorylations of Arpp19, orchestrated by one single phosphatase, PP2A-B55 δ , opposing two kinases, PKA and Gwl.

RESULTS

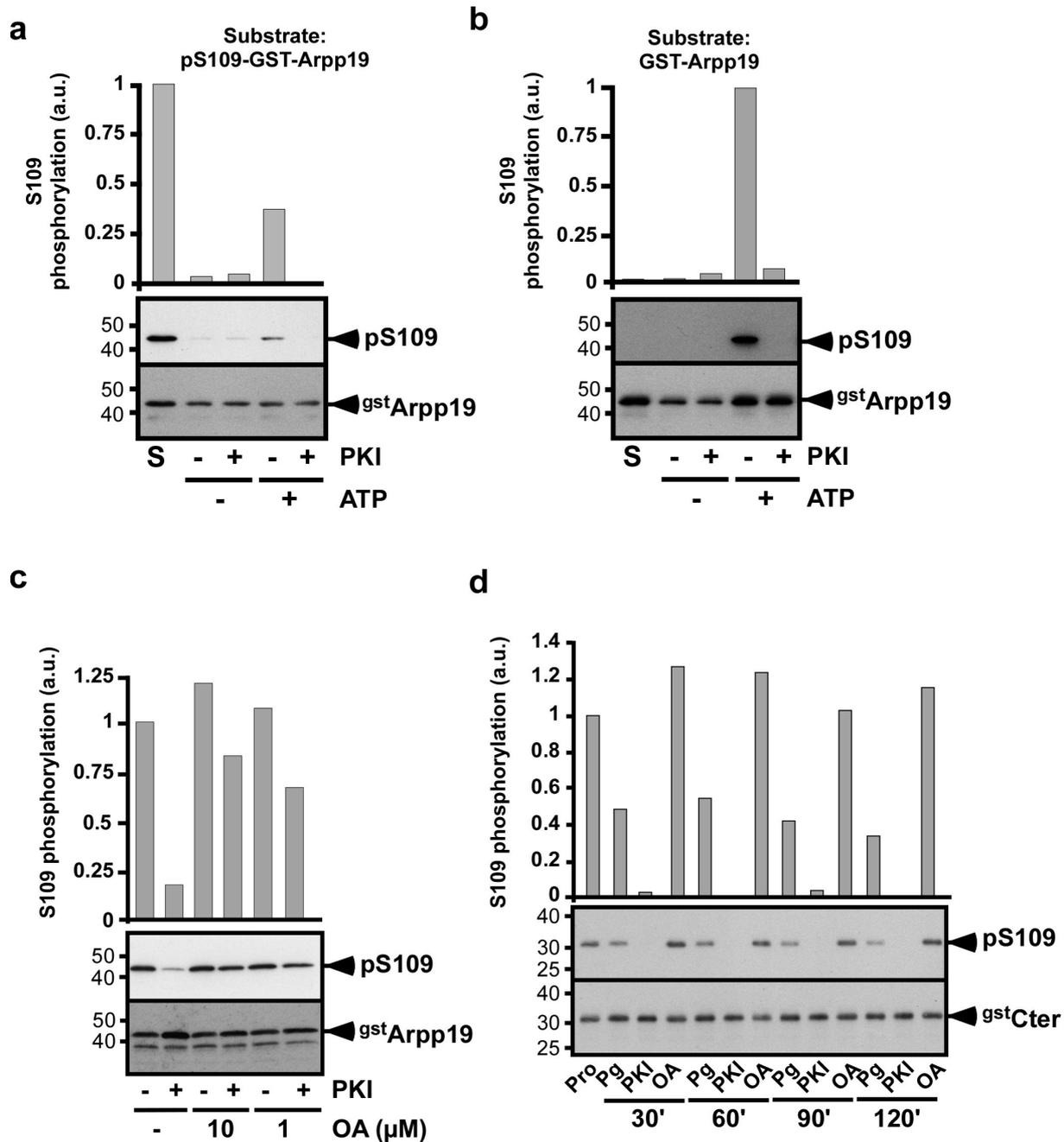
Active dephosphorylation at Arpp19 S109 opposed by PKA in prophase oocytes

The S109 residue of Arpp19 phosphorylated by PKA in prophase oocytes is dephosphorylated in response to progesterone by an unknown phosphatase³, termed S109-phosphatase until its identification. The level of S109-phosphorylated Arpp19 in prophase-arrested oocytes could result from either the sole activity of PKA or a balance between PKA and S109-phosphatase in favor of PKA. To address this, we first assayed S109-phosphatase activity in extracts from prophase oocytes. As a substrate, we used GST-tagged Arpp19 previously *in vitro* phosphorylated at S109 by PKA (pS109-GST-Arpp19)²². This protein was coupled to GSH-beads and then incubated in prophase extracts. S109 phosphorylation of pS109-GST-Arpp19 recovered from extracts was monitored by western blot using a specific phospho-S109-Arpp19 antibody³. In the absence of ATP, Arpp19 was efficiently dephosphorylated at S109 (Fig. 1a), showing that S109-phosphatase is active in prophase extracts. Adding ATP reduced Arpp19 dephosphorylation at S109 (Fig. 1a). When the specific inhibitor of PKA, PKI²³, was added to extracts in the presence of ATP, pS109-GST-Arpp19 was efficiently dephosphorylated (Fig. 1a). This indicates that S109-phosphatase activity is counterbalanced by PKA in prophase extracts. Furthermore, a non-phosphorylated form of GST-Arpp19 showed phosphorylation on S109 in extracts that was dependent on ATP and sensitive to PKI (Fig. 1b). These results demonstrate that PKA and S109-phosphatase are both active and regulate Arpp19 phosphorylation at S109 in prophase extracts, with PKA dominating. In subsequent experiments, PKI was included in order to block PKA activity to facilitate analysis of its opposing phosphatase.

We next determined that S109-phosphatase belongs to the group of okadaic acid (OA)-sensitive phosphatases, which includes PP1, PP2A and phosphatases related to PP2A^{11,24}. Prophase extracts were supplemented with 1 or 10 μ M OA and then with PKI and the S109 phosphatase substrate, pS109-GST-Arpp19. Both OA concentrations prevented Arpp19 dephosphorylation at S109 (Fig. 1c).

Figure 1 | S109-phosphatase is OA-sensitive and counterbalanced by PKA in prophase oocytes.

(a-b) Extracts from prophase oocytes were supplemented or not with ATP and further incubated or not with PKI. Extracts were then incubated with either pS109-GST-Arpp19 **(a)** or GST-Arpp19 **(b)**. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{gst}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. "S": starting substrates. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S in **(a)**, and to the phosphorylation level of GST-Arpp19 in the presence of ATP and without PKI in **(b)**. **(c)** Extracts from prophase oocytes were supplemented or not with PKI and further incubated with pS109-GST-Arpp19, in the presence or in the absence of 1 μ M or 10 μ M OA. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{gst}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of GST-Arpp19 without PKI and OA. **(d)** Cter-GST-Arpp19 (^{gst}Cter) was injected into prophase (Pro) oocytes. 16h later, oocytes were stimulated either with progesterone (Pg) or by injecting either PKI or OA. Oocytes were collected at the indicated times after stimulation, and Cter-GST-Arpp19 was isolated by pull-down. S109 phosphorylation of Cter-GST-Arpp19 (pS109) and total Cter-GST-Arpp19 (^{gst}Cter) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of Cter-GST-Arpp19 in prophase oocytes.



We ascertained whether Arpp19 phosphorylation at S109 is also subject to a turnover in intact oocytes. We used as S109-phosphatase substrate a GST-truncated form of Arpp19, corresponding to its C-terminal part (68-117) (Cter-GST-Arpp19). This peptide contains S109 but lacks S67 that is phosphorylated by Gwl during meiosis resumption¹⁹. *In vitro*, Cter-GST-Arpp19 was efficiently phosphorylated at S109 by PKA and efficiently dephosphorylated at S109 when incubated in prophase extracts with PKI (Supplementary Fig. 1a-b). Moreover, unlike full-length Arpp19 protein^{3,19}, Cter-GST-Arpp19 did not interfere with meiotic maturation (Supplementary Fig. 1c-d). Prophase oocytes were injected with Cter-GST-Arpp19 and either stimulated with progesterone or injected with PKI or OA. Cter-GST-Arpp19 was then isolated by pull-down at various times before Cdk1 activation. As shown in Fig. 1d, Cter-GST-Arpp19 was *in vivo* phosphorylated at S109 in prophase oocytes and was partly dephosphorylated in response to progesterone, thus reproducing the dephosphorylation of endogenous Arpp19 observed upon hormonal stimulation³. In the absence of progesterone, PKI injection induced the full dephosphorylation of Cter-GST-Arpp19 at S109 while OA injection increased the S109 phosphorylation level (Fig. 1d). Hence, S109-phosphatase is an OA-sensitive phosphatase

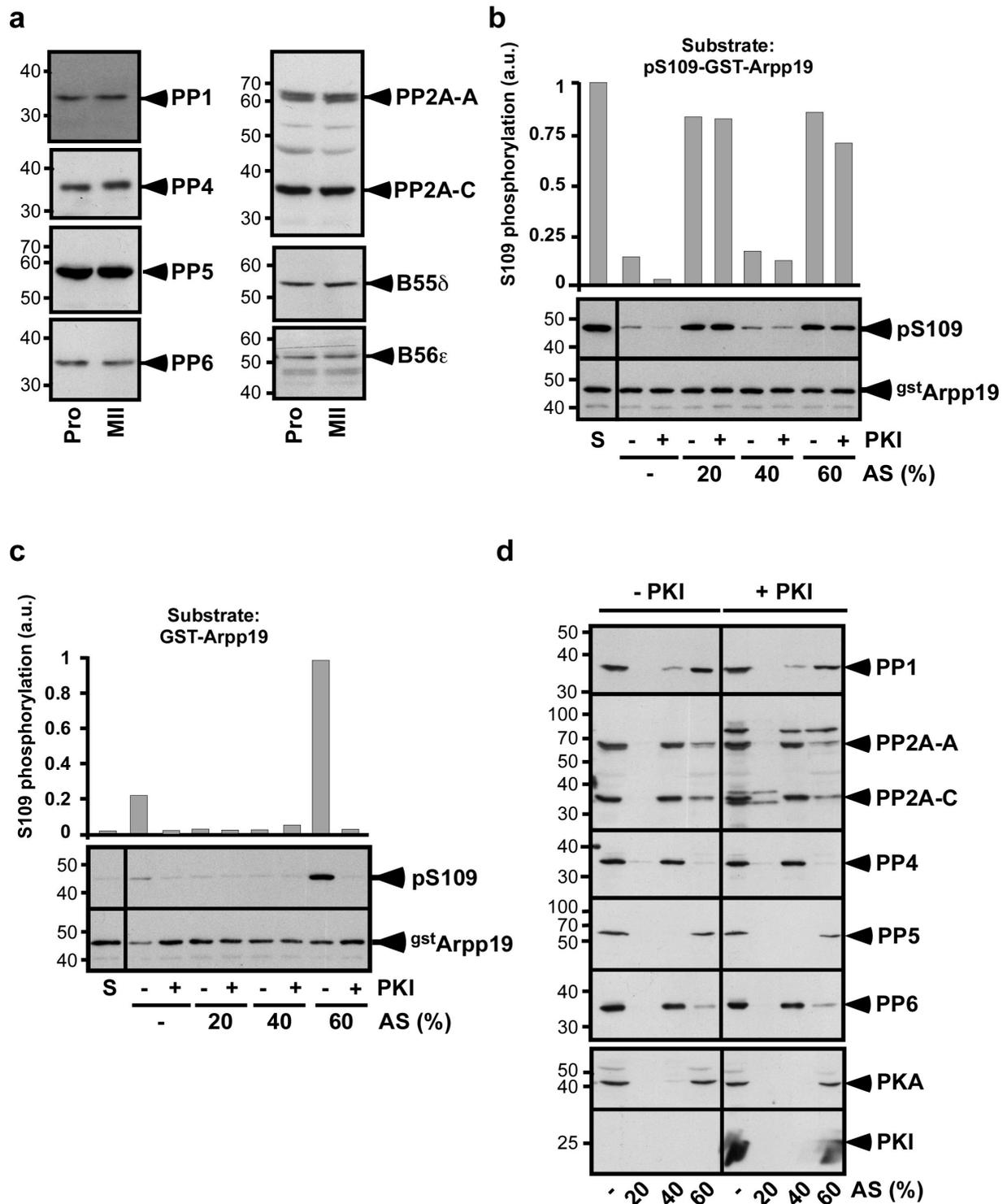
that is active and dephosphorylates Arpp19 at S109 in prophase oocytes. In extracts and intact oocytes, Arpp19 phosphorylation at S109 results from a balance between PKA and its opposing phosphatase, in favor of PKA.

S109-phosphatase is distinct from PP1 and PP5

As the S109-phosphatase is inhibited by OA, we analyzed which ones of the known OA-sensitive phosphatases are expressed in *Xenopus* oocytes. Western blots revealed that the catalytic subunits of PP1, PP4, PP5, PP6 and PP2A (PP2A-C) as well as PP2A structural (PP2A-A) and regulatory (B55 δ and B56 ϵ) subunits are expressed at the same level in prophase- and metaphase II-arrested oocytes (Fig. 2a). In an attempt to identify which one corresponds to S109-phosphatase, prophase extracts were fractionated by precipitation using increasing amounts of ammonium sulfate. S109-phosphatase and PKA activities were then assayed, using as substrates pS109-GST-Arpp19 and GST-Arpp19 respectively. S109-phosphatase activity was recovered in the 40% precipitate (Fig. 2b) whereas PKA activity was precipitated by 60% ammonium sulfate (Fig. 2c). S109-phosphatase activity did no longer depend on PKI in the 40% precipitate (Fig. 2b), in agreement with the absence of PKA activity in this precipitate (Fig. 2c).

Figure 2 | Ammonium sulfate precipitation separates S109-phosphatase from PKA, PP1 and PP5.

(a) Western blot analysis of various S/T phosphatases sensitive to OA in lysates from prophase (Pro) or metaphase II (MII) oocytes using specific antibodies directed against catalytic subunits of PP1, PP2A (PP2A-C), PP4, PP5, PP6 and PP2A-regulatory subunit A (PP2A-A), B55 δ and B56 ϵ . (b-d) Prophase extracts supplemented or not with PKI were precipitated by serial addition of ammonium sulfate (AS) as indicated. Starting extracts without AS are labeled (-). Pellets were recovered and used for enzymatic assays and western blots. (b) S109-phosphatase activity was assayed using as substrate pS109-GST-Arpp19. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (GstArpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (c) PKA activity was assayed using as substrate GST-Arpp19. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (GstArpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. "S": starting GST-Arpp19 substrate. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of GST-Arpp19 in the 60% precipitate without PKI. (d) Western blot analysis of initial extracts (-) and AS precipitates using specific antibodies directed against catalytic subunits of PP1, PP2A (PP2A-C), PP4, PP5, PP6, PKA, and against PP2A scaffold subunit A (PP2A-A) and PKI.



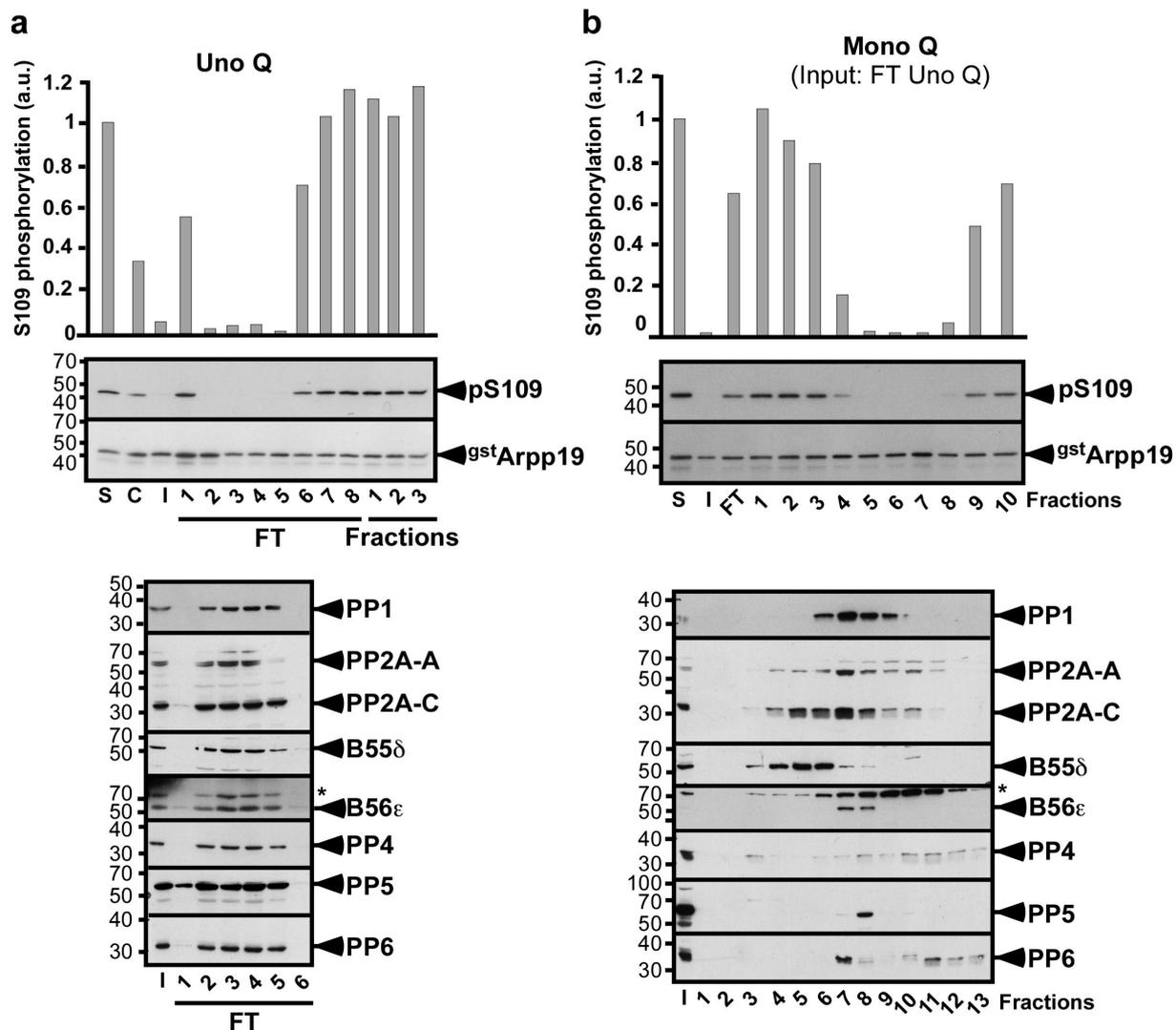
Each precipitated fraction was further analyzed by western blot with antibodies against OA-sensitive phosphatases, PKA and PKI. Consistently with the S109 phosphorylation activity measured in Fig. 2c, PKA was recovered in the 60% ammonium sulfate precipitate (Fig. 2d). PP2A, PP4 and PP6, as well as the scaffold PP2A-A subunit, were recovered in the 40% precipitate (Fig. 2d). In contrast, PP1 and PP5 were mostly detected in the 60% precipitate (Fig. 2d). Hence, the ammonium sulfate fractionation supports our previous results showing that S109-phosphatase is counterbalanced by PKA and indicates that it corresponds neither to PP1 nor to PP5.

Biochemical identification of S109-phosphatase as PP2A-B55 α/δ

To identify the S109-phosphatase, a chromatography-based procedure was undertaken. PKI-supplemented prophase extracts were ultracentrifuged and the supernatant was fractionated by four successive steps of chromatography: two anion exchange columns, Uno Q and Mono Q, an hydrophobic column, Phenyl-Superose, and a size-exclusion column, Superose 12 (Supplementary Fig. 2). At each step, S109-phosphatase activity was assayed in the fractions using pS109-GST-Arpp19 as a substrate. Fractions were western blotted with various antibodies against phosphatases and some were subject to LC-MS/MS experiments.

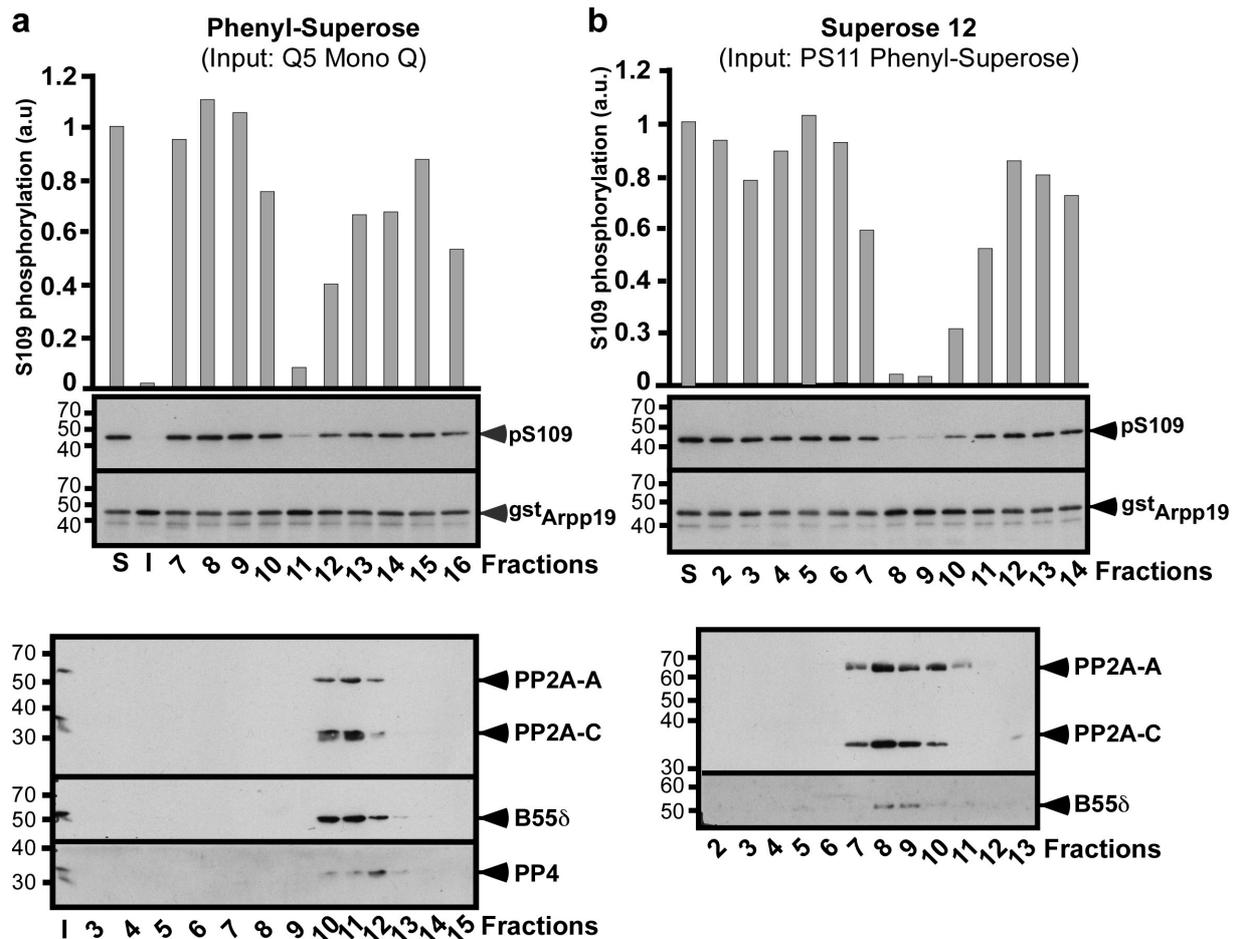
Following the Uno Q column, S109-phosphatase activity was recovered in the flow-through (Fig. 3a), as well as PP2A-B55 δ , PP2A-B56 ϵ and the catalytic subunits of PP1, PP4, PP5 and PP6 (Fig. 3a). Fractions 2 to 5 in the flow-through were pooled and loaded on a Mono Q column. S109-phosphatase activity was predominantly eluted in fractions 5 to 8 (Fig. 3b). Fractions 5 and 6 contain PP2A-B55 δ , whereas PP4, PP5 and PP6 were not detectable in these fractions (Fig. 3b, Table 1). Some PP1 was present in fraction 6 but not in fraction 5 (Fig. 3b, Table 1). S109-phosphatase activity was also detected in fractions 7 and 8 that contain various amounts of PP1, PP2A-B55 δ , PP2A-B56 ϵ , PP4, PP5, PP6 and PP2C (Fig. 3b and Table 1). Hence, PP2A-B55 δ is predominant in fractions 5 and 6 whereas fractions 7 and 8 are enriched in PP1, PP2A-B56 ϵ , PP4, PP5, PP6 and PP2C, with few PP2A-B55 δ . Fraction 6 corresponds to an intermediary between both groups. The procedure to isolate S109-phosphatase was pursued by separately analyzing fraction 5, fraction 6 and a pool of fractions 7 and 8 (Supplementary Fig. 2b).

Figure 3 | Biochemical isolation of S109-phosphatase from prophase extracts - Analysis of the output fractions of Uno Q and Mono Q columns. PKI-supplemented extracts from prophase oocytes were fractionated by 2 successive steps of chromatography: Uno Q (a) and Mono Q (b). S109-phosphatase activity was assayed in each fraction using pS109-GST-Arpp19 as a substrate. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{gst}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. Fractions were western blotted with antibodies against the catalytic subunits of PP1, PP2A (PP2A-C), PP4, PP5 and PP6, PP2A scaffold subunit A (PP2A-A) and PP2A regulatory subunits B55 δ and B56 ϵ . *: non-specific protein recognized by the anti-B56 ϵ antibody. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. "C": control extracts before PKI addition. "I": input sample supplemented with PKI and loaded on the column. "FT": flow-through. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (a) Uno Q. FT and elution profile (fractions 1 to 3) of S109-phosphatase activity after Uno Q column and western blot analysis of fractions 1 to 6 of FT. (b) Mono Q. Fractions 2 to 5 of the Uno Q column FT (see a) were pooled and loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Mono Q column and western blot analysis of fractions 1 to 13.



Fractions 5 and 6 were subjected to Phenyl-Superose chromatography. For both fractions, S109-phosphatase activity was eluted in a single fraction, fraction 11, where the main phosphatase present is PP2A-B55 α/δ with traces of PP4 (Fig. 4a, Supplementary Fig. 3a and Table 1). Consistently with the absence of PP1, PP5 and PP6 in the input, these three phosphatases were undetectable in fraction 11 by LC-MS/MS analysis. PP1, initially present in fraction 6 of the Mono Q, was not recovered in any fraction from 7 to 16 of the Phenyl-Superose column (Table 1). Therefore, PP2A-B55 α/δ is the major phosphatase present in the fraction 11 that contains S109-phosphatase activity. This fraction was then loaded on a Superose 12 column. The maximal activity of S109-phosphatase was recovered in fractions 8 and 9 where the only phosphatase present was PP2A-B55 α/δ (Fig. 4b, Supplementary Fig. 3b and Table 1).

Figure 4 | Biochemical isolation of S109-phosphatase from prophase extracts - Separation of fraction 5 from the Mono Q column with Phenyl-Superose and Superose 12 columns. Continuation of experiment illustrated in Fig. 3. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. "I": input sample loaded on the column. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (a) Phenyl-Superose. Fraction 5 from the Mono Q column (see Fig. 3b) was loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Phenyl-Superose column and western blot analysis of fractions 3 to 15 with antibodies directed against catalytic subunits of PP2A (PP2A-C) and PP4, PP2A scaffold subunit A (PP2A-A) and PP2A regulatory subunit B55 δ . (b) Superose 12. Fraction 11 from the Phenyl-Superose column (see a) was loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Superose 12 column and western blot analysis of fractions 2 to 13 with antibodies directed against PP2A scaffold subunit (PP2A-A), PP2A catalytic subunit (PP2A-C) and PP2A regulatory subunit B55 δ .



Fractions 7 and 8 from the Mono Q column were pooled and subject to Phenyl-Superose chromatography. S109-phosphatase activity was eluted in fractions 10 to 12 (Fig. 5a). PP2A-B55 δ , PP2A-B56 $\alpha/\beta/\epsilon$ and PP2C were recovered in these fractions while PP1, PP4, PP5 and PP6 were not detected or were present in trace amounts (Fig. 5a and Table 1). Fractions 10 and 11 were pooled and loaded on a gel filtration Superose 12 column. S109-phosphatase activity was recovered in fractions 7 to 13, with a peak in fractions 10 and 11 (Fig. 5b). The phosphatases contained in these fractions were PP2A-B55 δ , PP2A-B56 $\alpha/\beta/\epsilon$ and PP2C (Fig. 5b and Table 1).

Figure 5 | Biochemical isolation of S109-phosphatase from prophase oocyte extracts - Separation of fractions 7 and 8 from the Mono Q column with Phenyl-Superose and Superose 12 columns. Continuation of experiment illustrated in Fig. 3. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. "I": input sample loaded on the column. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (a) Phenyl-Superose. Fractions 7 and 8 from the Mono Q column (see Fig. 3b) were pooled and loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Phenyl-Superose column and western blot analysis of fractions 1 to 14 with antibodies directed against the catalytic subunits of PP1, PP2A (PP2A-C), PP4, PP5 and PP6, PP2A scaffold subunit (PP2A-A) and PP2A regulatory subunits B55 δ and B56 ϵ . (b) Superose 12. Fraction 10 and 11 from the Phenyl-Superose column (see a) were pooled and loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Superose 12 column and western blot analysis of fractions 3 to 14 with antibodies directed against the catalytic subunits of PP2A (PP2A-C) and PP5, PP2A scaffold subunit (PP2A-A) and PP2A regulatory subunits B55 δ and B56 ϵ . *non-specific protein recognized by the anti-PP5 antibody.

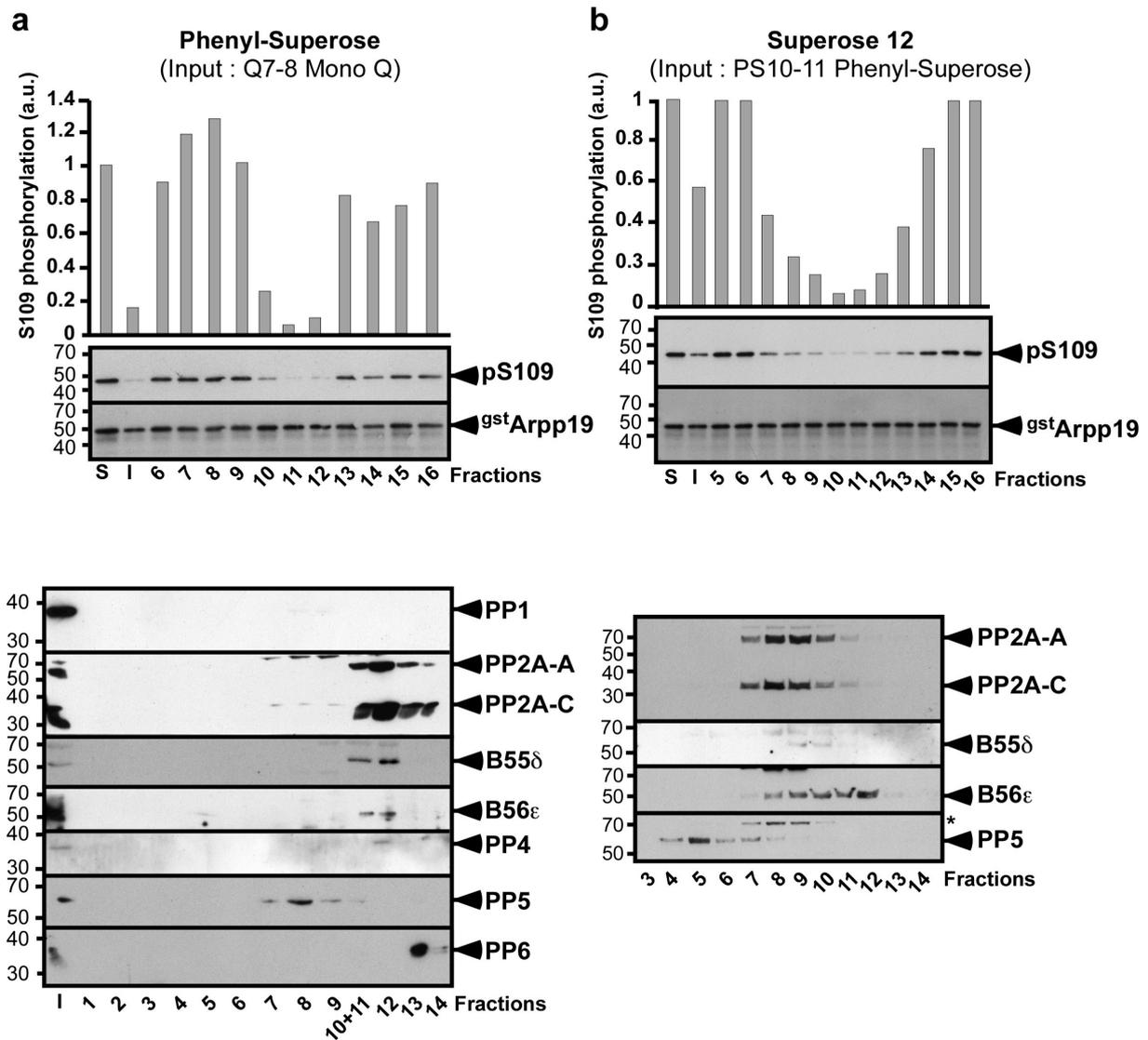


Table 1 | LC-MS/MS analysis of the S109-phosphatase fractions from the biochemical isolation. Same experiment as in Figs. 3-5 and Supplementary Fig. 3. Proteins present in the fractions with active S109-phosphatase after the Mono Q column (Q5, Q6 and Q7-8 -a pool of 7 and 8-), after the Phenyl-Superose column (PS11 from Q5, PS11 from Q6 and PS10-11 from Q7-8) and after Superose 12 column (S8 and S9 from Q5>PS11, S8 and S9 from Q6>PS11, S10 and S11 from Q7-8>PS10-11) were identified by LC-MS/MS analysis. The table lists proteins carrying a phosphatase enzymatic activity and their regulators. PP1-R: PP1 regulator.

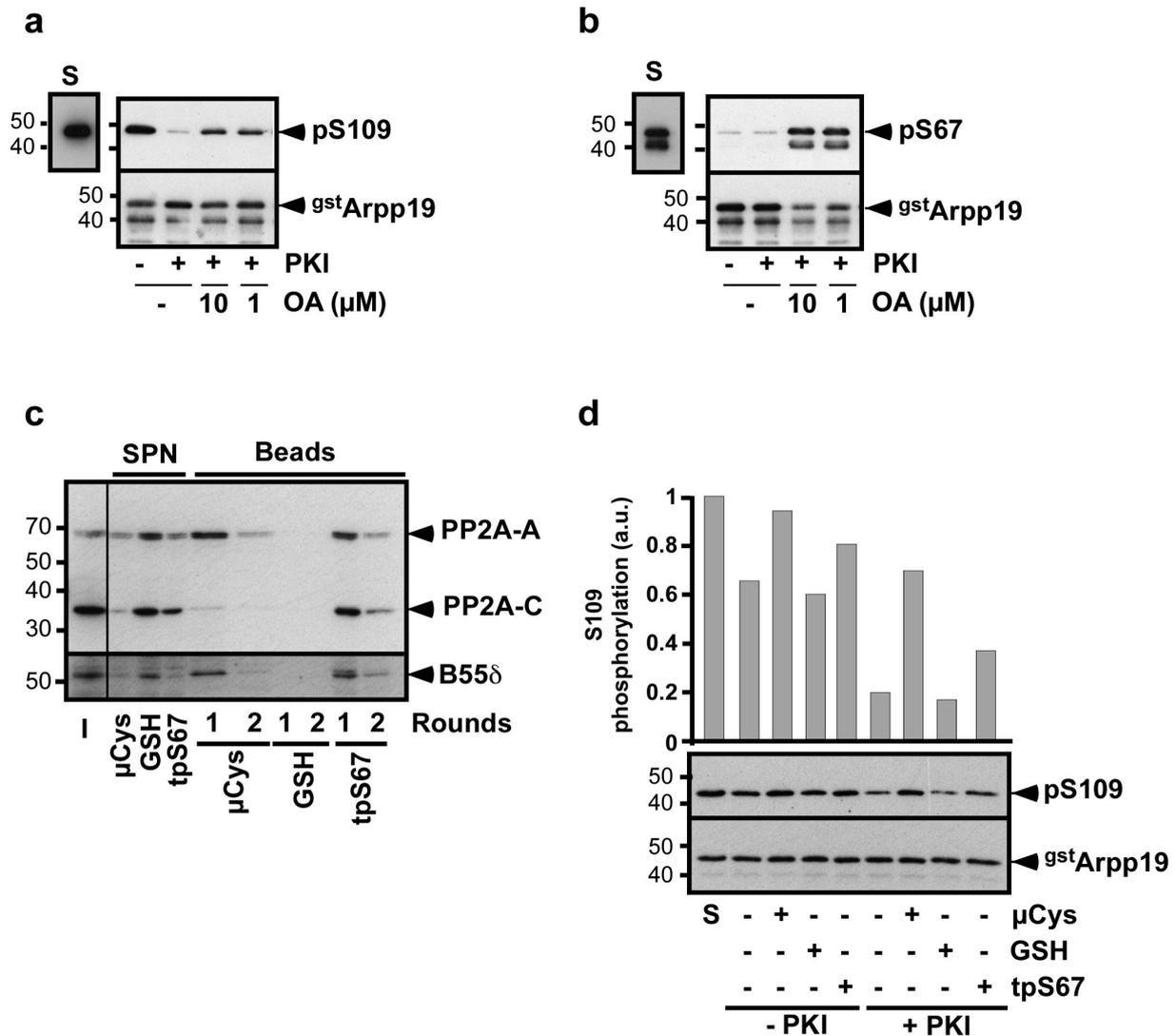
					Mascott scores											
Family	Description	Accession	Gene Symbol	Coverage (%)	From Q5			From Q6			From Q7-8					
					Q5	PS 11	S8	S9	Q6	PS 11	S8	S9	Q7-8	PS 10-11	S10	S11
PP2A-A	phosphorylase phosphatase/PP2A-A	963085	ppp2r1b; ppp2r1b.S	78	2086	5660	4634	5504	2764	9434	7779	4015	3273	3644	5333	2579
	Regulatory subunit A α	148222150	ppp2r1a-b; ppp2r1a.S	82	2201	4326	3524	4524	2122	7476	4180	2097	2325	2632	3411	1351
	Regulatory subunit A α	148224496	ppp2r1a-a; ppp2r1a.L	81	1917	4171	3297	4108	2099	7265	4094	2030	2220	2549	3347	1302
PP2A-C	Catalytic subunit α	148230509	ppp2ca; ppp2ca.L	89	1521	3288	2771	2870	1788	6924	3284	1889	1527	952	1296	831
	Catalytic subunit β [X. tropicalis]	53749698	ppp2cb	89	1476	3191	2877	2817	1790	7260	3336	1932	1562	951	1405	842
B55	Regulatory subunit B α	148234757	ppp2r2a; ppp2r2a.S	79	818	3241	240	414	969	3338	476	166	377	834	39	51
	55 kDa regulatory subunit B δ	147900119	ppp2r2d; ppp2r2d.S	62	1028	3330	109	287	1023	4991	277	176	165	788	80	67
	55 kDa regulatory subunit B β	148231951	ppp2r2b; ppp2r2b.L		275	1052	87	120	319	1418	151	43	64	308	29	48
B56	Regulatory subunit B' α	168693595	ppp2r5a; ppp2r5a.S	54					19	50			779	1057	639	272
	Regulatory subunit B' β	148234627	ppp2r5b; ppp2r5b.L	50					19	40			721	803	489	195
	Regulatory subunit B' γ	148236119	ppp2r5c; ppp2r5c.L	40	71	324			131	141			125	105	121	113
	Regulatory subunit B' ϵ	148236023	ppp2r5e; ppp2r5e.S	51	34				27				700	491	827	485
	Regulatory B' ϵ	147902694	ppp2r5e1	54	34				27				546	462	901	623
PP1	Catalytic subunit α	147903539	ppp1ca; ppp1ca.L	69	111				906	41			1589	44	17	22
	Catalytic subunit B γ	148224548	ppp1cc	64	203				752				1308	60	15	
	Catalytic subunit β [X. tropicalis]	58332786	ppp1cb	64	161				775	30			1164	41	15	
PP1-R	Regulatory subunit 11	148229062	ppp1r11; ppp1r11.L	38					33				224			
PP2C	PP1A	147905165	ppm1a; ppm1a.L	90	14	223		28	57	290			1484	3921	8960	8659
	Mg2+/Mn2+ dependent, 1B	148227634	ppm1b; ppm1b.L	31	14	99				144			310	1354	3181	3049
PP3	Catalytic subunit α	148235473	ppp3ca; ppp3ca.L	31	57	176			62	85			176	88		
PP4	Catalytic subunit [X. tropicalis]	45360541	ppp4c	17	173		25	143	320	539	58	60	517	34	75	0
PP6	Catalytic subunit	147906292	ppp6c; ppp6c.L	6					33							

Hence, the biochemical procedure to isolate S109-phosphatase activity led to PP2A-A/C and excluded PP1, PP4, PP5 and PP6. As PP2C is insensitive to OA²⁵, this phosphatase is unlikely responsible for S109-phosphatase activity. Remarkably, S109-phosphatase activity was carried by PP2A-A/C associated with either B55 α/δ or B56 $\alpha/\beta/\epsilon$. The biochemical isolation procedure was performed 4 times, with 3 of these 4 experiments analyzed by LC-MS/MS. Experiment 1 was presented in Figs. 3-5, Supplementary Fig. 3 and Table 1, while Supplementary Table 1 summarizes the two other experiments. In experiment 2, fractions 5 to 8 from the Mono Q column were pooled before Phenyl-Superose. In experiment 3, S109-phosphatase was eluted in a single fraction from the Mono Q column. The final fractions from the Superose 12 column containing S109-phosphatase activity were analyzed by LC-MS/MS analysis (Supplementary Table 1). PP2A-B56 isoform was recovered in the final fractions of experiment 2, in which fractions 5 to 8 from the Mono Q column were pooled, whereas it was barely detectable in experiment 3 where S109-phosphatase was found in a single fraction after the Mono Q column. This argues for B56 contaminating S109-phosphatase fractions when the Mono Q fractions are pooled. In contrast, PP2A-B55 isoform was recovered in all experiments (Supplementary Table 1), arguing for PP2A-B55 α/δ being the main phosphatase carrying S109-phosphatase activity.

PP2A-B55 δ dephosphorylates Arpp19 at S109 in prophase extracts

If PP2A-B55 δ □□□□□□□□□□ to the S109-phosphatase, it should be active in prophase-arrested oocytes. PP2A-B55 δ is known to dephosphorylate Arpp19 at S67¹⁶. To assay its activity in prophase extracts, we used Arpp19 phosphorylated at both S67 and S109 (pS67-pS109-GST-Arpp19). This substrate allows monitoring the concomitant dephosphorylation of S109 and S67, respectively catalyzed by S109-phosphatase and PP2A-B55 δ . As expected, S109-phosphatase dephosphorylated pS67-pS109-GST-Arpp19 at S109 in a PKI- and OA-dependent manner (Fig. 6a). Interestingly, pS67-pS109-GST-Arpp19 was also dephosphorylated at S67 by PP2A-B55 δ in extracts (Fig. 6b). This event was prevented by OA but insensitive to PKI (Fig. 6b), an expected result as S67 is targeted by Gwl but not by PKA¹⁹. This result indicates that PP2A-B55 δ is active in prophase oocytes and not affected by PKA.

Figure 6 | Inhibition of PP2A-B55 δ impairs Arpp19 dephosphorylation at S109 in prophase extracts. (a-b) Prophase extracts were supplemented or not with PKI and further incubated with Arpp19 phosphorylated at both S109 and S67, pS67-pS109-GST-Arpp19, in the presence or in the absence of either 1 μ M or 10 μ M OA. Total GST-Arpp19 (^{9st}Arpp19) was western blotted with the anti-GST antibody. The phosphorylation of GST-Arpp19 at S109 (a) and at S67 (b) was visualized by western blot with antibodies directed against S109-phosphorylated Arpp19 (pS109) or S67-phosphorylated Arpp19 (pS67). "S": starting pS67-pS109-GST-Arpp19 substrate. (c) Prophase extracts were incubated twice with either microcystin beads (μ Cys), GSH-beads (GSH) or GST-Arpp19 thiophosphorylated at S67 and bound to GSH-beads (tpS67). After separation, the supernatants (SPN) and the beads resulting from the two incubation rounds were analyzed by western blot with antibodies directed against PP2A scaffold subunit (PP2A-A), PP2A catalytic subunit (PP2A-C) and PP2A regulatory subunit B55 δ . "I": prophase extracts before depletion. (d) Supernatants of (c) were supplemented or not with PKI. S109-phosphatase activity was assayed using pS109-GST-Arpp19. After incubation, S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{9st}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 (pS109) and GST antibodies. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S.

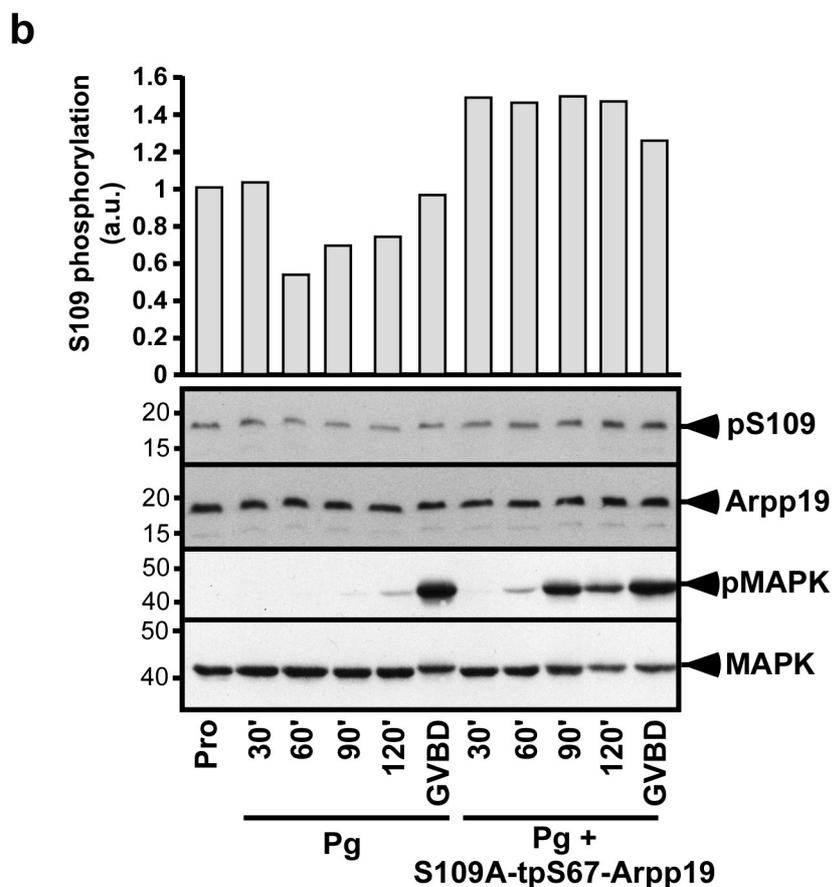
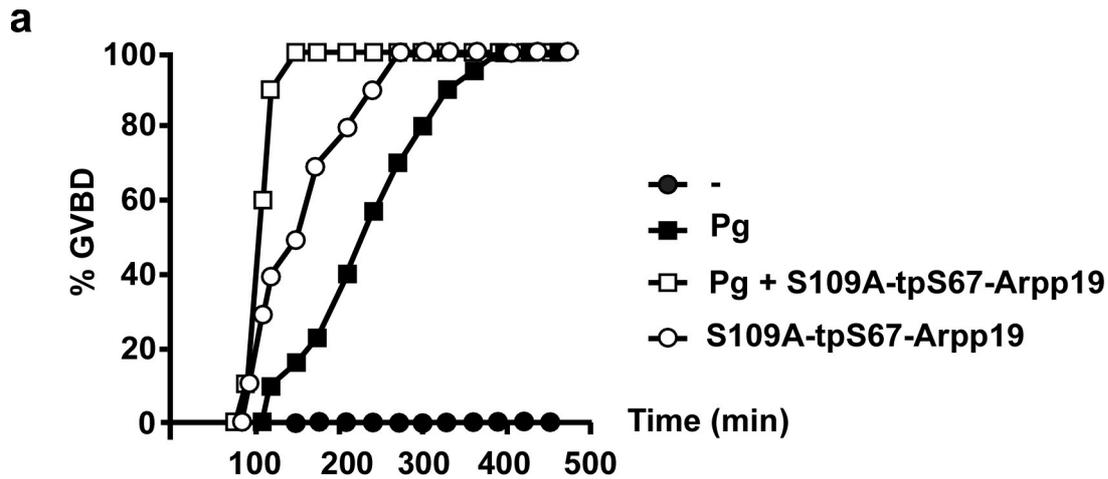


To ascertain that PP2A-B55 δ is responsible for Arpp19 dephosphorylation at S109, this phosphatase was specifically depleted from prophase extracts using its specific inhibitor, S67-phosphorylated Arpp19, coupled to GSH beads. To avoid S67 dephosphorylation, GST-Arpp19 was thiophosphorylated with ATP- γ S (tpS67-GST-Arpp19)¹⁹. As a positive control, microcystin-beads known to inhibit all PP2A-A/C isoforms were used²⁶. After incubation with either tpS67-GST-Arpp19-beads or microcystin-beads, supernatants and beads were separated. As expected from the pan-specificity of microcystin, nearly all PP2A subunits were depleted from the supernatant and recovered on the microcystin-beads (Fig. 6c). Given the specificity of tpS67-GST-Arpp19 towards PP2A-B55 δ isoform, B55 δ was almost fully depleted after incubation with tpS67-GST-Arpp19-beads, whereas some PP2A-A/C subunits were still detected (Fig. 6c). S109-phosphatase activity was then assayed in the supernatants. In the absence of PKI, Arpp19 phosphorylation at S109 was increased in PP2A-depleted supernatants with either microcystin- or tpS67-GST-Arpp19- beads (Fig. 6d), showing that PKA actively phosphorylates Arpp19 at S109 in the absence of PP2A. Inhibiting PKA with PKI led to a strong S109 dephosphorylation of Arpp19 in prophase extracts (Fig. 6d). In contrast, such a dephosphorylation was no longer observed in the microcystin-depleted supernatants and was strongly reduced in the supernatants depleted for PP2A-B55 δ using tpS67-GST-Arpp19 (Fig. 6d). Altogether, these results indicate that PP2A-B55 δ behaves as the S109-phosphatase in prophase extracts: it is active in dephosphorylating Arpp19 and counterbalanced by PKA.

PP2A-B55 δ dephosphorylates Arpp19 at S109 in intact oocytes

Whether PP2A-B55 δ also dephosphorylates Arpp19 at S109 in intact oocytes was ascertained using its specific inhibitor, tpS67-GST-Arpp19. To avoid any side-specific effect due to S109 phosphorylation, a non-phosphorylatable Arpp19 mutant, in which S109 was replaced by alanine, was used (S109A-tpS67-GST-Arpp19)²². S109A-tpS67-GST-Arpp19 was injected in prophase oocytes. As expected^{7,19,27}, this protein promoted meiosis resumption and accelerated the process induced by progesterone (Fig. 7a). Cdk1 activation was ascertained by western blotting phosphorylated MAPK (Fig. 7b), a marker of Cdk1 activation²⁸. Arpp19 dephosphorylation at S109 was analyzed by western blot (Fig. 7b). As previously shown³, the protein was partially dephosphorylated at S109 within 1h after progesterone addition and was then rephosphorylated at this residue before GVBD in control oocytes (Fig. 7b). In contrast, Arpp19 was not dephosphorylated at S109 when PP2A-B55 δ was specifically inhibited by S109A-tpS67-GST-Arpp19 (Fig. 7b). Hence, inhibiting PP2A-B55 δ in oocytes is sufficient to abolish Arpp19 dephosphorylation at S109 induced by progesterone. PP2A-B55 δ is therefore responsible for Arpp19 dephosphorylation during oocyte meiosis resumption. Arpp19 phosphorylation at S109 is even increased upon PP2A-B55 δ inactivation (Fig. 7b). Hence, Arpp19 is not fully phosphorylated in prophase oocytes and can be over-phosphorylated by PKA when its opposing phosphatase, PP2A-B55 δ , is inhibited.

Figure 7 | Inhibition of PP2A-B55 δ prevents Arpp19 dephosphorylation at S109 in intact oocytes. (a) Prophase oocytes were injected or not with GST-Arpp19 thiophosphorylated at S67 and where S109 was mutated into A109 (S109A-tpS67-Arpp19) and then stimulated or not with progesterone (Pg). GVBD was scored as a function of time. (b) Same experiment as (a). Oocytes were collected in prophase (Pro) or at the indicated times after Pg addition and western blotted for S109-phosphorylated endogenous Arpp19 (pS109), total endogenous Arpp19, phosphorylated MAPK (pMAPK) and total MAPK. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to Arpp19 phosphorylation level in prophase oocytes.



Arpp19 dephosphorylation at S109 by PP2A-B55 δ is independent of Cdk1

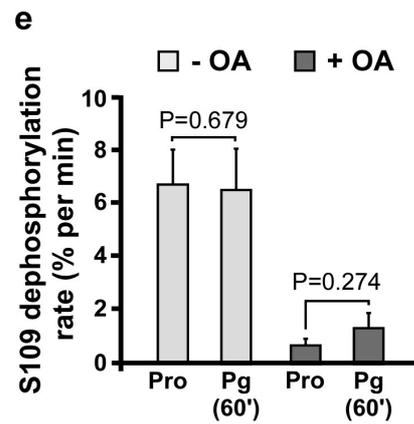
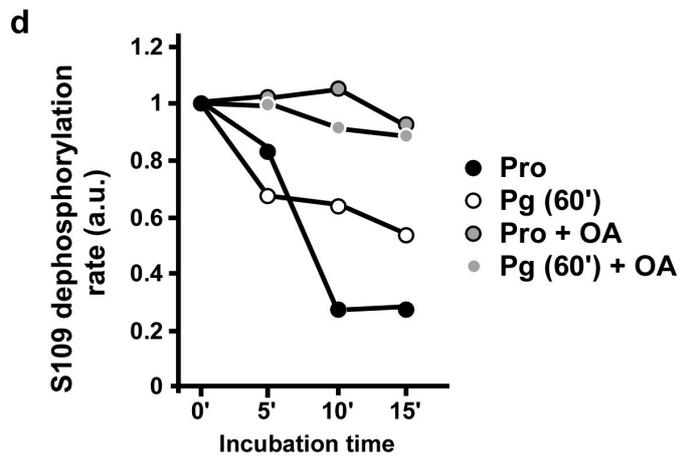
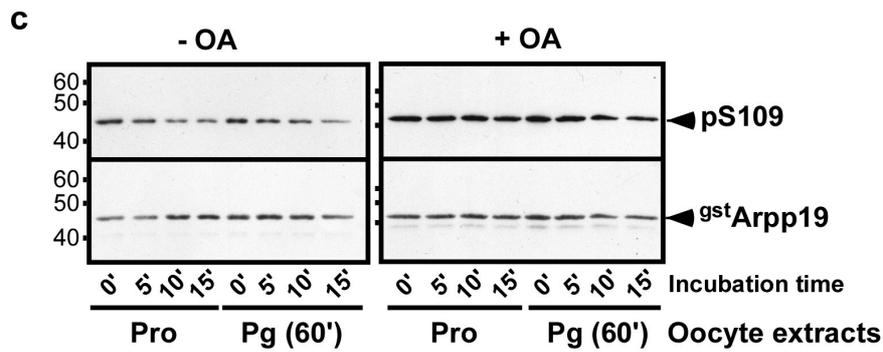
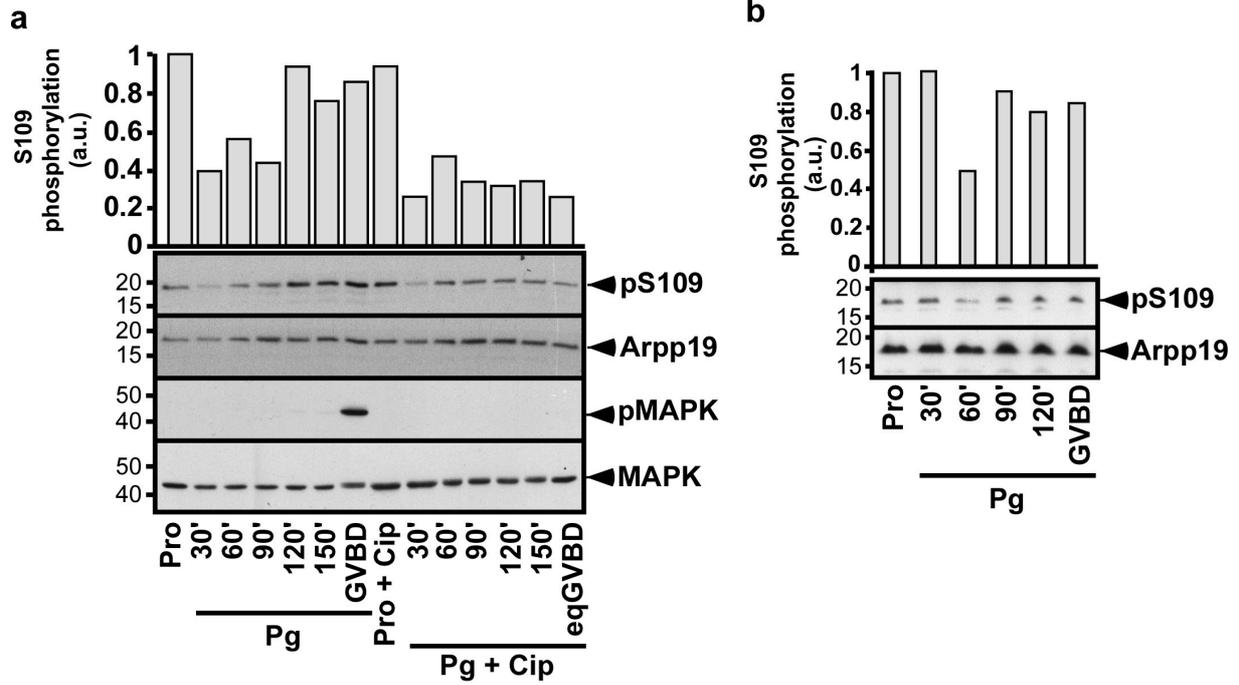
Cdk1 activation depends on PP2A-B55 δ inhibition thanks to Arpp19 phosphorylation at S67 that occurs at GVBD¹⁹. This negative action of PP2A-B55 δ is controlled by Cdk1 itself, which indirectly activates Gwl, constituting a positive feedback loop⁴. Remarkably, our present results reveal that PP2A-B55 δ also positively regulates meiosis resumption by dephosphorylating Arpp19 at S109 upstream Cdk1 activation, as early as 1h after progesterone stimulation³. Hence, both steps, critical for Cdk1 activation, involve PP2A-B55 δ and Arpp19 but occur sequentially over time. To ensure that the early action of PP2A-B55 δ is disconnected from its late function, we investigated whether Arpp19 dephosphorylation at S109 is independent of Cdk1 activity. Prophase oocytes were injected with a specific inhibitor of Cdk1²⁹, the protein p21^{Cip1} and were then stimulated with progesterone. In control oocytes, Arpp19 was phosphorylated at S109 in prophase, partially dephosphorylated at S109 within 1h after progesterone addition and then rephosphorylated at this residue just before GVBD (Fig. 8a).

P21^{Cip1} injection efficiently prevented Cdk1 activation in response to progesterone (Fig. 8a). Under these conditions, Arpp19 was still dephosphorylated at S109 in response to progesterone and was then maintained in its partially dephosphorylated state (Fig. 8a). This result indicates that PP2A-B55 δ actively dephosphorylates Arpp19 at S109 well before and independently of Cdk1 activation. Both actions of PP2A-B55 δ are therefore temporally and functionally disconnected in the oocyte.

PP2A-B55 δ activity is not regulated in the early stages of meiosis resumption

In prophase oocytes, Arpp19 phosphorylation at S109 depends on a balance between PKA and PP2A-B55 δ in favor of PKA. Arpp19 dephosphorylation could be either promoted by the sole inhibition of PKA or by the concomitant up-regulation of PP2A-B55 δ activity. To address this issue, we assayed PP2A-B55 δ activity in extracts from oocytes either in prophase or collected 1h after progesterone stimulation. As expected, endogenous Arpp19 was partially dephosphorylated at S109 at that time (Fig. 8b). PP2A-B55 δ substrate, pS109-GST-Arpp19, was added to oocyte lysates in the presence or in the absence of OA, and its dephosphorylation was ascertained as a function of time. As shown in Fig. 8c-d, Arpp19 was dephosphorylated in an OA-dependent manner, at a similar rate in extracts from oocytes in prophase or stimulated by progesterone. The experiment was performed 7 times using different females (Fig. 8e). No statistical difference was observed regarding the specific activity of PP2A-B55 δ at both stages. Therefore, PP2A-B55 δ activity is not up-regulated by progesterone at the early stages of meiosis resumption and Arpp19 dephosphorylation at S109 solely depends on PKA downregulation.

Figure 8 | Level of PP2A-B55 δ activity in intact oocytes. (a) Prophase oocytes (Pro) were injected or not with p21^{Cip1} (Cip) and then stimulated with progesterone (Pg). GVBD occurred at 200 min in control oocytes and was prevented by Cip injection. Oocytes were collected at the indicated times after Pg addition and western blotted with antibodies against S109-phosphorylated Arpp19 (pS109), total Arpp19, phosphorylated MAPK (pMAPK) and total MAPK. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to Arpp19 phosphorylation level in prophase oocytes. (b) Prophase oocytes (Pro) were stimulated with progesterone (Pg). GVBD occurred at 150 min in control oocytes. Oocytes were collected at the indicated times after Pg addition and western blotted with antibodies against S109-phosphorylated Arpp19 (pS109) and total Arpp19. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to Arpp19 phosphorylation level in prophase oocytes. (c) Same experiment as (b). Extracts from either prophase oocytes (Pro) or oocytes stimulated for 1h with progesterone (Pg 60') were supplemented or not with 10 μ M OA. The activity of S109-phosphatase was assayed from 0 to 15 min, using pS109-GST-Arpp19 as a substrate. The reaction was stopped by adding SDS-buffer⁶⁰. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{gst}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. (d) Quantification of S109 phosphorylation of GST-Arpp19 illustrated in (c). An arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the level of S109 phosphorylation of GST-Arpp19 at time 0 for each condition. (e) S109-phosphatase activity in prophase oocytes and oocytes stimulated for 1h by progesterone (Pg 60'). S109-phosphatase activity was assayed and quantified as in (c-d). The rate of S109 dephosphorylation was calculated for each experiment. Values represent means of 7 independent experiments using 7 different females, 3 of them performed with and without OA, and 4 of them performed without OA. Vertical bars represent standard error. P values were obtained by a two-tailed paired Student t-test.



DISCUSSION

In all vertebrates, a high level of PKA activity arrests oocytes in prophase of the first meiotic division for long periods. In *Xenopus*, Arpp19 phosphorylated at S109 by PKA plays an important part in maintaining the prophase block³. Progesterone releases this block by decreasing cAMP levels and PKA activity within 1h, resulting in a partial dephosphorylation of Arpp19 at S109 sufficient to trigger a signaling pathway that leads, 3 to 5h later, to Cdk1 activation^{3,30-32}. We have now uncovered the phosphatase responsible for Arpp19 dephosphorylation at S109, unexpectedly finding it to be the same PP2A isoform that opposes Cdk1 during M-phase entry.

PP1 was initially an attractive candidate to oppose the action of PKA during oocyte prophase arrest. PKA and PP1 antagonistically regulate the activity of many physiological effectors involved in cell cycle regulation. In particular, PP1 inhibition blocks progesterone and PKI-induced meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. PP1 was thus proposed to dephosphorylate a PKA substrate, still unknown at that time³³. PP1 also positively regulates mitosis by contributing to Cdc25C activation and by controlling structural events such as centrosome splitting, spindle assembly and microtubules-kinetochores attachment³⁴. PP1 activity is then repressed at mid-mitosis by Cdk1 phosphorylation and reactivated at the end of mitosis where it contributes to the dephosphorylation of Cdk1 substrates³⁴⁻³⁶. Nevertheless, we have ruled out the possibility that PP1 is responsible for Arpp19 dephosphorylation on S109. PP1 did not associate with S109-phosphatase activity in the ammonium sulfate precipitates nor after the Mono Q column.

All our *in vitro* or *in vivo* approaches demonstrate that the phosphatase that acts on Arpp19 at S109 is a PP2A isoform. We were further able to determine that this activity is predominantly carried by the B55 subunit, *i.e.* the same isoform that participates as an essential component of the M-phase switch. We detected B55, in some cases accompanied by B56, in the active S109-phosphatase fractions obtained from all three biochemical isolation procedures analyzed by western blot and LC-MS/MS, as well as in an initial isolation experiment monitored by western blot only. While PP2A-B55 is thus clearly the main phosphatase responsible for S109 dephosphorylation of Arpp19, PP2A-B56 can also potentially contribute, at least in extracts. A contribution of PP2A-B56 to Arpp19 S109 dephosphorylation in oocyte extracts could explain why the pan-isoform PP2A inhibitor microcystin blocks this activity more effectively than specific inhibition of PP2A-B55 δ using S67-phosphorylated Arpp19. In strong contrast with these results in extracts, inhibiting PP2A-B55 δ using S67-phosphorylated Arpp19 in intact oocytes fully abolishes S109 dephosphorylation of endogenous Arpp19 induced by progesterone and even increases its phosphorylation level. These experiments unequivocally establish that *in vivo*, PP2A-B55 is the physiological phosphatase that dephosphorylates Arpp19 at S109. The minor contribution of PP2A-B56 in oocyte extracts could result from its release from discrete subcellular compartments during extract preparation. It has been established that PP2A-B56 localizes specifically to kinetochores and centromeres, participating in chromatid-microtubule interactions and silencing of the spindle assembly checkpoint^{37,38}. Likely relating to this M-phase role, PP2A-B56 is involved in the metaphase II-arrest of *Xenopus* oocyte by regulating the APC/C inhibitor, XErp1^{39,40}. These M-phase roles of PP2A-B56 are not directly connected to Cdk1 regulation and do not involve Arpp19. Accordingly, Arpp19 lacks the two known binding motifs for PP2A-B56 but includes bipartite recognition determinants for PP2A-B55⁴¹⁻⁴³.

Each of the four B subfamilies comprises several isoforms with very closely related sequences, no discernible differences in their substrate binding pockets and substantial substrate specificity overlap⁴⁴. In the present study, our biochemical isolation procedures identify B55 δ as being associated with PP2A-A/C that dephosphorylates Arpp19 at S109. B55 α was also detected by LC-MS/MS experiment. Since we have no specific anti-B55 α antibody, we cannot exclude that S109-phosphatase activity is a mixture of PP2A-B55 α and PP2A-B55 δ . Nevertheless, in *Xenopus* oocytes, B55 δ accounts for 70% or more of the total B55 subunits, with B55 α and B55 β antibodies failing to detect endogenous proteins, due to their low expression level^{7,45}. Moreover, Arpp19 is not detected within the protein interactome of PP2A-

B55 α ⁴⁶. We therefore ascribe the majority of the phosphatase responsible for dephosphorylating Arpp19 at S109 to the PP2A subset containing the B55 δ subunit. Similarly, in *Xenopus* egg extracts, PP2A-B55 δ is the key phosphatase isoform that acts on Cdk1 substrates and is inhibited by Arpp19 phosphorylated at S67, a property not shared by the three other *Xenopus* PP2A-B55 holoenzymes^{7,8,45}.

Our results revealed that Arpp19 phosphorylation at S109 is subject to dynamic turnover in prophase-arrested oocytes. The two mutually antagonistic enzymes, PKA and PP2A-B55 δ , work simultaneously, with the action of PP2A-B55 δ being swamped by PKA. This contrasts with other systems in which PKA plays a critical role in phosphate removal by regulating protein phosphatase activities⁴⁷, for example by phosphorylating B56 and activating PP2A-B56 δ in human brain⁴⁸. The simultaneous activities of PKA and PP2A-B55 δ result in a futile phosphorylation cycle. This not only renders impossible a full switch-like interconversion of Arpp19 phosphorylation state, but also allows the two opposed active enzymes to carry important functions independently of each other. As such, PKA certainly targets substrates other than Arpp19, important to keep oocytes arrested in prophase, such as Cdc25 or Wee1/Myt1^{49,50}. Meantime, the sustained activity of PP2A-B55 δ also ensures the stability of the prophase arrest by impeding Cdk1 activation and its substrates phosphorylation.

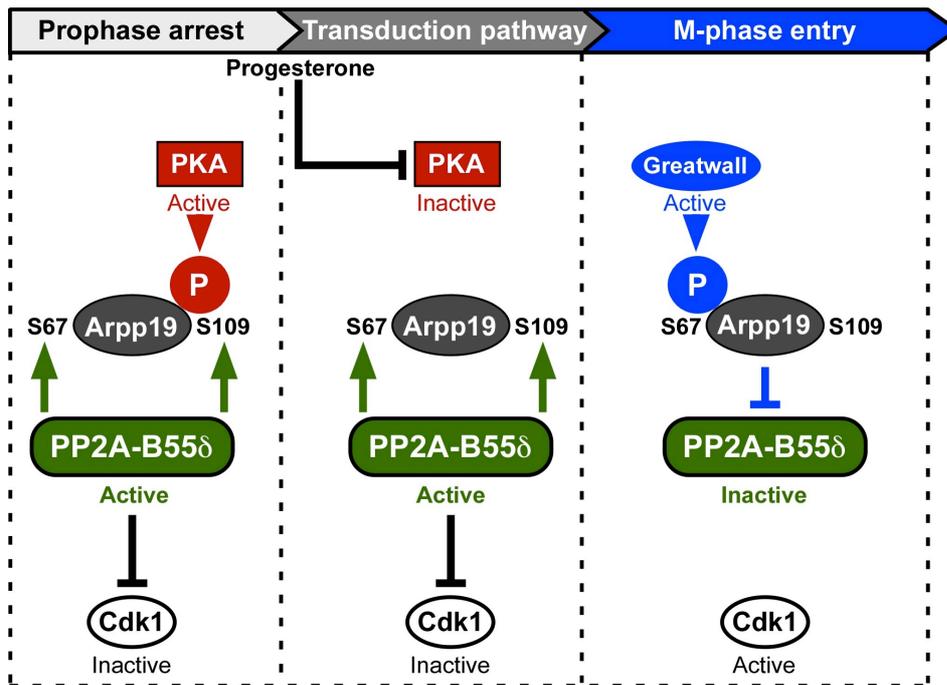
Remarkably, both Arpp19 sites important for the control of meiosis resumption, S109 and S67, are dephosphorylated by a unique phosphatase, PP2A-B55 δ . The function of Arpp19 phosphorylation at S67 in converting this protein into a PP2A-B55 δ inhibitor is well documented, whereas the action of S109 phosphorylation of Arpp19 in ensuring the prophase arrest remains unknown. It is tempting to speculate that, by mirroring the function of S67-phosphorylated Arpp19, S109-phosphorylated Arpp19 regulates one of its regulatory kinases or phosphatase. Such a dual function has been described for two Arpp19-related proteins, DARPP-32 and Arpp16. Depending on its phosphorylation by PKA or by Cdk5 at two distinct sites, DARPP-32 acts as an inhibitor of either PP1 or PKA^{51,52}. Arpp16, exclusively expressed in the brain, and Arpp19, ubiquitously expressed, are alternatively spliced variants of the same gene^{53,54}. Like Arpp19, Arpp16 is phosphorylated by Gwl at S46 and by PKA at S88^{53,55}. As reported for Arpp19, Arpp16 is converted into a strong inhibitor of specific PP2A isoforms when phosphorylated by Gwl⁵⁵. Interestingly, the PKA phosphorylated form of Arpp16 at S88 makes PP2A non-inhibitable⁵⁶ and, in contrast to Arpp19, phosphorylation of Arpp16 at S88 and S46 is mutually antagonistic^{22,56}. These findings raise the question of whether Arpp19 is a dual-function protein, like DARPP-32 or Arpp16. Although our preliminary attempts failed to show that S109-phosphorylated Arpp19 interacts with PP2A and regulates its activity, this hypothesis deserves deeper investigation. Another possibility is that Arpp19 behaves as a PP1 inhibitor when phosphorylated by PKA, similarly to DARPP-32. In response to progesterone, S109 dephosphorylation of Arpp19 by PP2A-B55 δ would activate PP1, an event that positively regulates entry into cell division^{33,57}.

Our results highlight how the reciprocal regulation of PP2A-B55 δ and Arpp19 orchestrates the timing of the first meiotic division in *Xenopus* oocytes in a 3-step process (Fig. 9).

Figure 9 | A reciprocal regulation of PP2A-B55 δ and Arpp19 orchestrates the timing of the first meiotic division. Prophase arrest (left box): both PP2A-B55 δ and PKA are active, resulting in Arpp19 phosphorylation at S109. S109-phosphorylated Arpp19 locks the oocyte in prophase by an unknown mechanism, PKA contributes to this arrest through Arpp19 phosphorylation and possibly other substrates, PP2A-B55 δ prevents Cdk1 activation.

Transduction pathway (middle box): in response to progesterone, PKA is inhibited while PP2A-B55 δ stays active, allowing Arpp19 dephosphorylation. Dephosphorylated Arpp19, possibly together with other dephosphorylated PKA substrates, launches a several hours long transduction pathway. Active PP2A-B55 δ prevents Cdk1 activation, generating the time window necessary to set up the cascade of molecular events required for Cdk1 activation.

M-phase entry (right box): Gwl is activated by a Cdk1 activity threshold and phosphorylates Arpp19 at S67. Hence, PP2A-B55 δ is inhibited and Cdk1 fully activated. This hysteretic switch triggers M-phase entry.



First, S109-phosphorylated Arpp19 and PP2A-B55 δ secure the prophase arrest: PP2A-B55 δ prevents any protein phosphorylation that could lead to unscheduled Cdk1 activation, while the action of S109-phosphorylated Arpp19 is not yet known. Second, progesterone triggers PKA inhibition while PP2A-B55 δ stays active. As a consequence, Arpp19 is dephosphorylated at S109 and launches a several hours signaling pathway that ends with Cdk1 activation. Keeping PP2A-B55 δ active prevents premature activation of Cdk1 and thus allows sufficient time for the signaling pathway, especially the translation of new proteins required for meiotic divisions. The third step is a switch conversion, relying on a threshold of a few active Cdk1 molecules. These activate Gwl, which in turn phosphorylates Arpp19 at S67 and inhibits PP2A-B55 δ , setting up the bistable switches that govern irreversible M-phase entry^{20,58}. Since PP2A-B55 δ is inhibited, Arpp19 can be rephosphorylated at S109. Indeed, this is achieved by a kinase distinct from PKA and depending on Cdk1 activity³. The role of this new S109 phosphate, if any, is unknown. Hence, we discovered that a double function of PP2A-B55 δ and its substrate, Arpp19, governs oocyte meiosis resumption, opening new avenues in the control of oocyte meiosis, but more widely in the control of cell cycle progression and its dysfunction in human pathologies related to fertility and cancer.

METHODS

Materials

Xenopus laevis adult females (Centre de Ressources Biologiques Xenopes, CNRS, France) were bred and maintained under laboratory conditions (Animal Facility Agreement: #A75-05-25). All reagents, unless otherwise specified, were from Sigma. Okadaic acid (OA) and magnetic GSH-beads were purchased from EnzoLifeSciences and Promega. Uno Q-25 was purchased from Bio-Rad, Mono Q 4.6/100PE, Phenyl-Superose HR5/5 and Superose 12 HR10/30 were from GE Healthcare.

***Xenopus* Oocyte handling**

Full-grown prophase oocytes were obtained from unprimed *Xenopus laevis* females as described⁵⁹. Oocytes were microinjected with OA (2 μ M) or His-K71M-Gwl mRNA (150 μ g) or the following recombinant proteins: Cter-GST-Arpp19 (125 ng, 250 ng or 500 ng), S109A-tpS67-Arpp19 (250 ng), p21^{Cip1} (35 ng) or PKI (75 ng) in 50 nl final volume per oocyte. 2 μ M progesterone was added to the external medium. Each *in vivo* experimental condition was applied to groups of 15 to 30 oocytes. Oocytes were referred to as GVBD when the first pigment rearrangement was detected at the animal pole.

Western blots

Oocytes were homogenized at 4°C in 10 volumes of Extraction Buffer (80 mM β -glycerophosphate pH 7.3, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂) and centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C. For all proteins except endogenous Arpp19, an equivalent of 0.6 oocyte was subjected to SDS (12%, 10% or 8%) gel electrophoresis⁶⁰ and then transferred onto nitrocellulose as described⁶¹. To visualize endogenous Arpp19 protein, an equivalent of 1.2 oocytes was loaded on 15.5% Tris-Tricine gels⁶². The antibodies directed against the following proteins were used: Arpp19⁶³ (1:1,000, gift of Dr Angus Nairn, Yale University, USA), S109-phosphorylated Arpp19³ (1:500), S67-phosphorylated Arpp19¹⁹ (1:1,000), MAP kinase (1:1,000, Abcam SC-154), phosphorylated MAP kinase (1:1,000, Cell Signaling 9106), PKA catalytic subunit (1:1,000, Abcam ab26322), PKI (1:1,000, Abcam ab122816), PP1 catalytic subunit (1:100, gift of Dr M. Bollen, KU Leuven, Belgium), PP2A-C catalytic subunit⁶⁴ (1:500), PP2A-A scaffold subunit⁶⁴ (1:500), B55 δ regulatory subunit⁷ (1:500, gift of Dr S. Mochida, Kumamoto University, Japan), B56 ϵ regulatory subunit⁷ (1:500, gift of Dr S. Mochida, Kumamoto University, Japan), PP4 catalytic subunit (1:500, Abcam ab115741), PP5 catalytic subunit⁷ (1:500, gift of Dr S. Mochida, Kumamoto University, Japan), PP6 catalytic subunit (1:500, Bethyl A300-844A) and GST (1:10,000, Sigma A-7340). Appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Jackson Immunoresearch) were revealed by chemiluminescence (Pierce). All western blots are representative of at least three different experiments.

Oocyte extracts, PP2A depletion and ammonium sulfate precipitation

Oocyte were homogenized in 5 volumes of Purification Buffer (PB: 80 mM β -Glycerophosphate pH 7.4, 10 mM EDTA, 30 mM NaCl, 3 mM DTT) and centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C. Extracts were then supplemented or not with OA for 0.5h at 18°C and then with recombinant PKI at 0.15 mg/ml final concentration. For PP2A depletion, oocyte extracts were incubated twice for 30 min at 30°C with either 50 μ l of Microcystin-Sepharose beads (Upstate) or 20 μ l of magnetic GSH-beads, previously coupled or not to 2.5 μ g of S67-thiophosphorylated GST-Arpp19. Supernatants were then used for further analysis after removal of the beads. For ammonium sulfate precipitation, proteins of extracts from 100 oocytes were precipitated by salting out using ammonium sulfate, successively 20%, 40% and 60% as described⁶⁵. Ammonium sulfate pellets were resuspended in 1 ml of PB.

Cloning and recombinant protein purification

Plasmids encoding either GST-tagged wild-type Arpp19³, GST-S109A-mutated Arpp19³, GST-p21^{Cip1}²⁹, Histidine-tagged PKA catalytic subunit (a gift from Susan Taylor, Addgene plasmid #14921) and PKI³ were previously described. The cDNA encoding the Cter-Arpp19 (amino-acids 68-117 of Arpp19) was cloned by PCR into a pGEX-6P-1 vector. Recombinant proteins

were produced in *E. coli* by autoinduction⁶⁶. Wild-type, mutated and truncated GST-Arpp19 proteins, GST-p21^{Cip1}, His-PKA catalytic subunit and PKI were purified as described in^{3,29,67}, dialyzed overnight against Phosphate Buffered Saline (PBS: 4.3 mM KH₂PO₄, 1.4 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl) and stored at -80°C.

***In vitro* phosphorylation of Arpp19 and GST pull-down**

His-K71M-Gwl was obtained as described¹⁹. *In vitro* phosphorylation by PKA or thiophosphorylation by Gwl of recombinant GST-Arpp19 were respectively described in²² and¹⁹. The double S109-S67 phosphorylated form of GST-Arpp19 was obtained by coupling 10 µg of recombinant GST-Arpp19 protein to 10 µl GSH-sepharose beads. After washing in PBS, beads were incubated for 3h at 30°C with 100 µl of metaphase II oocyte extracts supplemented with 2 mM ATP. The beads were then isolated, washed in PBS and used in prophase extracts to monitor S109 and S67 phosphatase activities. For GST pull-down, GST-Arpp19 proteins were recovered from oocyte lysates as described previously¹⁹.

S109-phosphatase and PKA assays

1 µg of either pS109-GST-Arpp19 or GST-Arpp19, respectively used as substrates for S109-phosphatase or PKA, was coupled to 20 µl of magnetic GSH-beads for 0.5h at 18°C. After washing in PBS, GSH-beads coupled to Arpp19 proteins were incubated for 3h at 30°C with either 20 µl of oocyte extracts or 40 µl ammonium sulfate precipitates or 100 µl fractions from chromatography columns, supplemented with 2 mM ATP and 200 mM MgCl₂. pS109-GST-Arpp19 or GST-Arpp19 coupled to beads were then isolated and western blotted using antibodies directed against S109-phosphorylated Arpp19 and GST. S109 phosphorylation level of Arpp19 was further quantified and normalized on total GST using Image J software.

Biochemical isolation of S109-phosphatase

20,000 prophase oocytes were homogenized at 4°C in 5 volumes of PB and successively centrifuged at 4°C at 300g for 5 min, at 1,100g for 20 min, at 15,000g for 20 min and at 100,000g for 2h (rotor TFT-45). The supernatant was then incubated with recombinant PKI at 0.15 mg/ml final concentration for 0.5h at 30°C and then loaded on a Uno Q-25 column previously equilibrated in PB. Proteins were eluted with a linear gradient of 0 to 1 M NaCl. The flow through containing S109-phosphatase activity was loaded on a Mono Q 4.6/100PE column equilibrated in PB. Proteins were eluted with a linear 0 to 0.6 M NaCl gradient. Active S109-phosphatase fractions were dialyzed overnight against Dialysis Buffer (DB: 20 mM Hepes pH 7.4, 1mM EDTA and 1mM DTT) and then supplied with 1M (NH₄)₂SO₄. Fractions were loaded on a Phenyl-Superose HR5/5 column equilibrated in DB supplemented with 1 M (NH₄)₂SO₄. Proteins were eluted with a linear 1 to 0 M (NH₄)₂SO₄ gradient. The active S109-phosphatase fractions were then lyophilized, resuspended in 200 µl of DB and further loaded on a gel size exclusion Superose 12 HR10/30 column.

LC-MS/MS data acquisition and processing

Proteins were incubated overnight at 37°C with 20 µl of 25 mM NH₄HCO₃ containing sequencing-grade trypsin (12.5µg/ml, Promega) at 37°C. The resulting peptides were desalted using ZipTip µ-C18 Pipette Tips (Millipore) and analyzed in technical triplicates or individually by a Q-Exactive Plus coupled to a Nano-LC Proxeon 1000 equipped with an easy spray ion source (all from Thermo Scientific). Peptides were separated by chromatography with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column (2cm, 75µm i.d., 3µm, 100Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50cm, 75µm i.d., 2µm, 100 Å), 300 nl/min flow rate, gradient from 95 % solvent A (water, 0.1% formic acid) to 35% solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 98 min, followed by a column regeneration for 23 min, giving a total run time of 2h. Peptides were analyzed in the Orbitrap cell, in full ion scan mode, at a resolution of 70,000 (at *m/z* 200), with a mass range of *m/z* 375-1,500 and an AGC target of 3x10⁶. Fragments were obtained by high collision-induced dissociation (HCD) activation with a collisional energy of 30%, and a quadrupole isolation window of 1.4 Da. MS/MS data were acquired in the Orbitrap cell in a Top20 mode, at a resolution of 17,500 with an AGC target of

2×10^5 , with a dynamic exclusion of 30 sec. MS/MS of most intense precursor were firstly acquired. Peptides with unassigned charge states or monocharged were excluded from the MS/MS acquisition. The maximum ion accumulation times were set to 50 ms for MS acquisition and 45 ms for MS/MS acquisition. The LC-MS/MS raw files were processed using the Mascot search engine (version 2.5.1) coupled to Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) for peptide identification with the Refseq non-redundant database of *Xenopus laevis* from NCBI (July 2016).

REFERENCES

1. Deguchi, R., Takeda, N. & Stricker, S.A. Comparative biology of cAMP-induced germinal vesicle breakdown in marine invertebrate oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 708-725 (2011).
2. Jaffe, L.A. & Norris, R.P. Initiation of the meiotic prophase-to-metaphase transition in mammalian oocytes, in *Oogenesis. The universal process.* (eds. M.H. Verlhac & A. Villeneuve) 181-197 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester; 2010).
3. Dupre, A., Daldello, E.M., Nairn, A.C., Jessus, C. & Haccard, O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nat. Commun.* **5**, 3318 (2014).
4. Dupre, A. & Jessus, C. ARPP19 Phosphorylations by PKA and Greatwall: The Yin and the Yang of the Cell Decision to Divide, in *Protein Phosphorylation.* (ed. C. Prigent) 3-29 (IntechOpen, Rijeka, Croatia; 2017).
5. Haccard, O. & Jessus, C. Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep.* **7**, 321-325 (2006).
6. Gaffre, M. *et al.* A critical balance between Cyclin B synthesis and Myt1 activity controls meiosis entry in *Xenopus* oocytes. *Development* **138**, 3735-3744 (2011).
7. Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J. & Hunt, T. Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* **28**, 2777-2785 (2009).
8. Mochida, S., Maslen, S.L., Skehel, M. & Hunt, T. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* **330**, 1670-1673 (2010).
9. Gharbi-Ayachi, A. *et al.* The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science* **330**, 1673-1677 (2010).
10. Virshup, D.M. & Shenolikar, S. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell* **33**, 537-545 (2009).
11. Shi, Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-484 (2009).
12. Castro, A. & Lorca, T. Greatwall kinase at a glance. *J. Cell. Sci.* **131** (2018).
13. Kim, M.Y. *et al.* Bypassing the Greatwall-Endosulfine pathway: plasticity of a pivotal cell-cycle regulatory module in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **191**, 1181-1197 (2012).
14. Labandera, A.M., Vahab, A.R., Chaudhuri, S., Kerk, D. & Moorhead, G.B. The mitotic PP2A regulator ENSA/ARPP-19 is remarkably conserved across plants and most eukaryotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 739-744 (2015).
15. Mochida, S. & Hunt, T. Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO Rep.* **13**, 197-203 (2012).
16. Williams, B.C. *et al.* Greatwall-phosphorylated Endosulfine is both an inhibitor and a substrate of PP2A-B55 heterotrimers. *eLife* **3**, e01695 (2014).
17. Hached, K. *et al.* ENSA and ARPP19 differentially control cell cycle progression and development. *J. Cell Biol.* **218**, 541-558 (2019).
18. Zhao, Y. *et al.* Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1317-1327 (2008).
19. Dupre, A. *et al.* The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* **126**, 3916-3926 (2013).
20. Mochida, S., Rata, S., Hino, H., Nagai, T. & Novak, B. Two Bistable Switches Govern M Phase Entry. *Curr. Biol.* **26**, 3361-3367 (2016).
21. Girault, J.A. Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* **970**, 407-429 (2012).
22. Dupre, A.I., Haccard, O. & Jessus, C. The greatwall kinase is dominant over PKA in controlling the antagonistic function of ARPP19 in *Xenopus* oocytes. *Cell Cycle* **16**, 1440-1452 (2017).

23. Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D. & Fischer, E.H. Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **246**, 1977-1985 (1971).
24. Cohen, P., Holmes, C.F. & Tsukitani, Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98-102 (1990).
25. Bialojan, C. & Takai, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**, 283-290 (1988).
26. Honkanen, R.E. *et al.* Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **265**, 19401-19404 (1990).
27. Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. & Merlevede, W. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **245**, 91-94 (1989).
28. Jessus, C. *et al.* Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* **111**, 813-820 (1991).
29. Frank-Vaillant, M., Jessus, C., Ozon, R., Maller, J.L. & Haccard, O. Two Distinct Mechanisms Control the Accumulation of Cyclin B1 and Mos in *Xenopus* Oocytes in Response to Progesterone. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3279-3288 (1999).
30. Ozon, R., Belle, R., Huchon, D. & Mulner, O. Roles of cyclic AMP and calcium in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Steroid Biochem.* **11**, 709-713 (1979).
31. Wang, J. & Liu, X.J. Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J. Cell Sci.* **117**, 5107-5116 (2004).
32. Maller, J.L., Butcher, F.R. & Krebs, E.G. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 579-582 (1979).
33. Huchon, D., Ozon, R. & Demaille, J.G. Protein phosphatase-1 is involved in *Xenopus* oocyte maturation. *Nature* **294**, 358-359 (1981).
34. Rebelo, S., Santos, M., Martins, F., da Cruz e Silva, E.F. & da Cruz e Silva, O.A. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. *Cell. Signal.* **27**, 2589-2598 (2015).
35. Heim, A., Konietzny, A. & Mayer, T.U. Protein phosphatase 1 is essential for Greatwall inactivation at mitotic exit. *EMBO Rep.* **16**, 1501-1510 (2015).
36. Ma, S. *et al.* Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1. *J. Cell Sci.* **129**, 1329-1339 (2016).
37. Wassmann, K. Sister chromatid segregation in meiosis II: deprotection through phosphorylation. *Cell Cycle* **12**, 1352-1359 (2013).
38. Saurin, A.T. Kinase and Phosphatase Cross-Talk at the Kinetochores. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**, 62 (2018).
39. Isoda, M. *et al.* Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Pik1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs. *Dev. Cell* **21**, 506-519 (2011).
40. Heim, A., Tischer, T. & Mayer, T.U. Calcineurin promotes APC/C activation at meiotic exit by acting on both XErp1 and Cdc20. *EMBO Rep.* **19** (2018).
41. Wang, X., Bajaj, R., Bollen, M., Peti, W. & Page, R. Expanding the PP2A Interactome by Defining a B56-Specific SLiM. *Structure* **24**, 2174-2181 (2016).
42. Hertz, E.P. *et al.* A Conserved Motif Provides Binding Specificity to the PP2A-B56 Phosphatase. *Mol. Cell* **63**, 686-695 (2016).
43. Cundell, M.J. *et al.* A PP2A-B56 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit. *J. Cell Biol.* **214**, 539-554 (2016).
44. Moura, M. & Conde, C. Phosphatases in Mitosis: Roles and Regulation. *Biomolecules* **9** pii: E55 (2019).
45. Castilho, P.V., Williams, B.C., Mochida, S., Zhao, Y. & Goldberg, M.L. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4777-4789 (2009).
46. Wang, F. *et al.* Protein interactomes of protein phosphatase 2A B55 regulatory subunits reveal B55-mediated regulation of replication protein A under replication stress. *Scientific reports* **8**, 2683 (2018).

47. Leslie, S.N. & Nairn, A.C. cAMP regulation of protein phosphatases PP1 and PP2A in brain. *Biochim. Biophys. Acta. Molecular cell research* **1866**, 64-73 (2019).
48. Ahn, J.H. *et al.* Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 2979-2984 (2007).
49. Duckworth, B.C., Weaver, J.S. & Ruderman, J.V. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 16794-16799 (2002).
50. Han, S.J., Chen, R., Paronetto, M.P. & Conti, M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr. Biol.* **15**, 1670-1676 (2005).
51. Hemmings, H.C., Jr., Greengard, P., Tung, H.Y. & Cohen, P. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**, 503-505 (1984).
52. Bibb, J.A. *et al.* Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* **402**, 669-671 (1999).
53. Horiuchi, A., Williams, K.R., Kurihara, T., Nairn, A.C. & Greengard, P. Purification and cDNA cloning of ARPP-16, a cAMP-regulated phosphoprotein enriched in basal ganglia, and of a related phosphoprotein, ARPP-19. *J. Biol. Chem.* **265**, 9476-9484 (1990).
54. Girault, J.A., Horiuchi, A., Gustafson, E.L., Rosen, N.L. & Greengard, P. Differential expression of ARPP-16 and ARPP-19, two highly related cAMP-regulated phosphoproteins, one of which is specifically associated with dopamine-innervated brain regions. *J. Neurosci.* **10**, 1124-1133 (1990).
55. Andrade, E.C. *et al.* ARPP-16 is a striatal-enriched inhibitor of protein phosphatase 2A regulated by microtubule-associated serine/threonine kinase 3 (Mast 3 kinase). *J. Neurosci.* **37**, 2709-2722 (2017).
56. Musante, V. *et al.* Reciprocal regulation of ARPP-16 by PKA and MAST3 kinases provides a cAMP-regulated switch in protein phosphatase 2A inhibition. *eLife* **6** (2017).
57. Margolis, S.S. *et al.* A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1779-1789 (2006).
58. Rata, S. *et al.* Two Interlinked Bistable Switches Govern Mitotic Control in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* **28**, 3824-3832 e3826 (2018).
59. Jessus, C., Thibier, C. & Ozon, R. Levels of microtubules during the meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *J. Cell Sci.* **87**, 705-712 (1987).
60. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
61. Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R. & Haccard, O. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **21**, 4026-4036 (2002).
62. Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**, 16-22 (2006).
63. Dulubova, I. *et al.* ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins. *J. Neurochem.* **77**, 229-238 (2001).
64. Bosch, M. *et al.* The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. molecular cloning and developmental regulation of expression. *Eur. J. Biochem.* **230**, 1037-1045 (1995).
65. De Smedt, V. *et al.* Thr-161 Phosphorylation of Monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **277**, 28592-28600 (2002).
66. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207-234 (2005).
67. Thomas, J. *et al.* Expression in *Escherichia coli* and characterization of the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 10906-10911 (1991).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of our laboratory, Dr O. Haccard and Dr T. Lorca for helpful discussions, as well as Dr T. Hunt and Dr E. Houlston for their precious advice. We are very grateful to Dr S. Mochida for providing the antibodies against B55 δ , B56 ϵ and PP5, as well as to Dr M. Bollen for the kind gift of the anti-PP1 antibody, Dr A. Nairn for the anti-Arpp19 antibody and Dr S. Taylor for the His-PKA plasmid. We thanks the members of proteomics core facility at the Institute Jacques Monod for the LC-MS/MS experiments, especially Thibault Léger and Laurent Lignières who performed database identification searches, the region Ile-de-France (SESAME), the Paris-University and The National Center for Scientific Research (CNRS) for funding parts of the LC-MS/MS equipment. ToL received a PhD grant from Sorbonne University. This work was supported by The National Center for Scientific Research (CNRS), Sorbonne University, the National Research Agency (ANR grants 13-BSV2-0008-01 and 18-CE13-0013-01 to CJ and AD respectively) and the ARC foundation (Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, grant PJA 2017-12-06-185 to AD).

AUTHOR CONTRIBUTION

AD and CJ conceived the original idea. ToL, AD and CJ designed and planned the experiments, analyzed the data and wrote the paper. ToL, AD, EMD, RP, TrL and MM performed experiments and analyzed the results. EMD, RP, TrL and MM assisted in writing the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY DATA

The M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55 δ opposes protein kinase A on Arpp19 to initiate meiotic division

Tom Lemonnier, Enrico Maria Daldello[#], Robert Poulhe, Tran Le, Marika Miot, Catherine Jessus^{*}, Aude Dupré^{*§}

Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement - Institut de Biologie Paris Seine, LBD - IBPS, F-75005 Paris, France

[#]Present address: Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, CA 94143, USA

[§]Corresponding author

^{*}These authors contributed equally to this work.

List of Supplementary Figures and Table

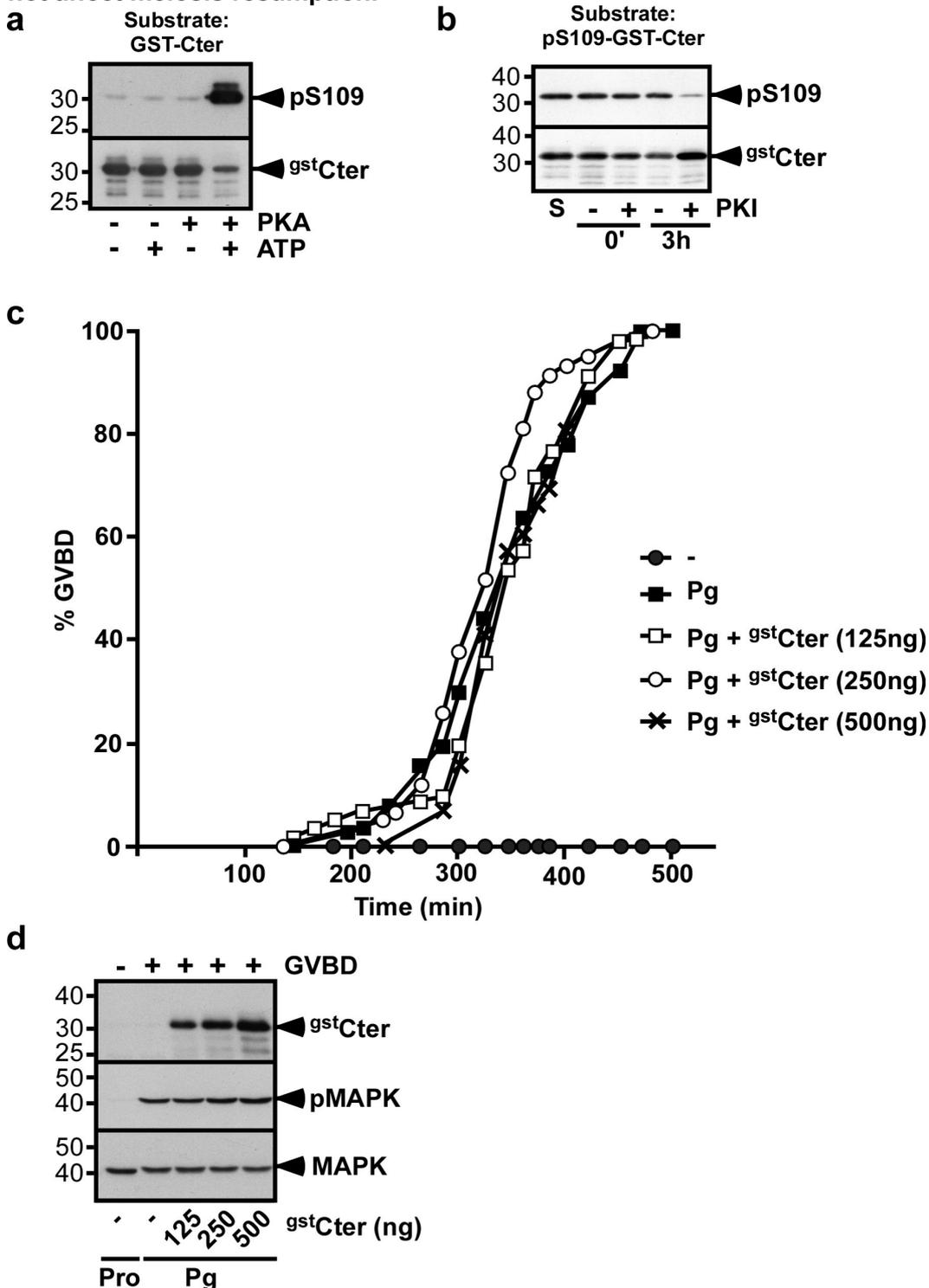
Supplementary Figure 1. Cter-GST-Arpp19 is phosphorylated at S109 by PKA and does not affect meiosis resumption

Supplementary Figure 2. Protocol of S109-phosphatase biochemical isolation

Supplementary Figure 3. Biochemical isolation of S109-phosphatase from prophase extracts - Separation of fraction 6 from the Mono Q column with Phenyl-Superose and Superose 12 columns

Supplementary Table 1. LC-MS/MS analysis of the S109-phosphatase enriched fractions from two distinct isolation experiments

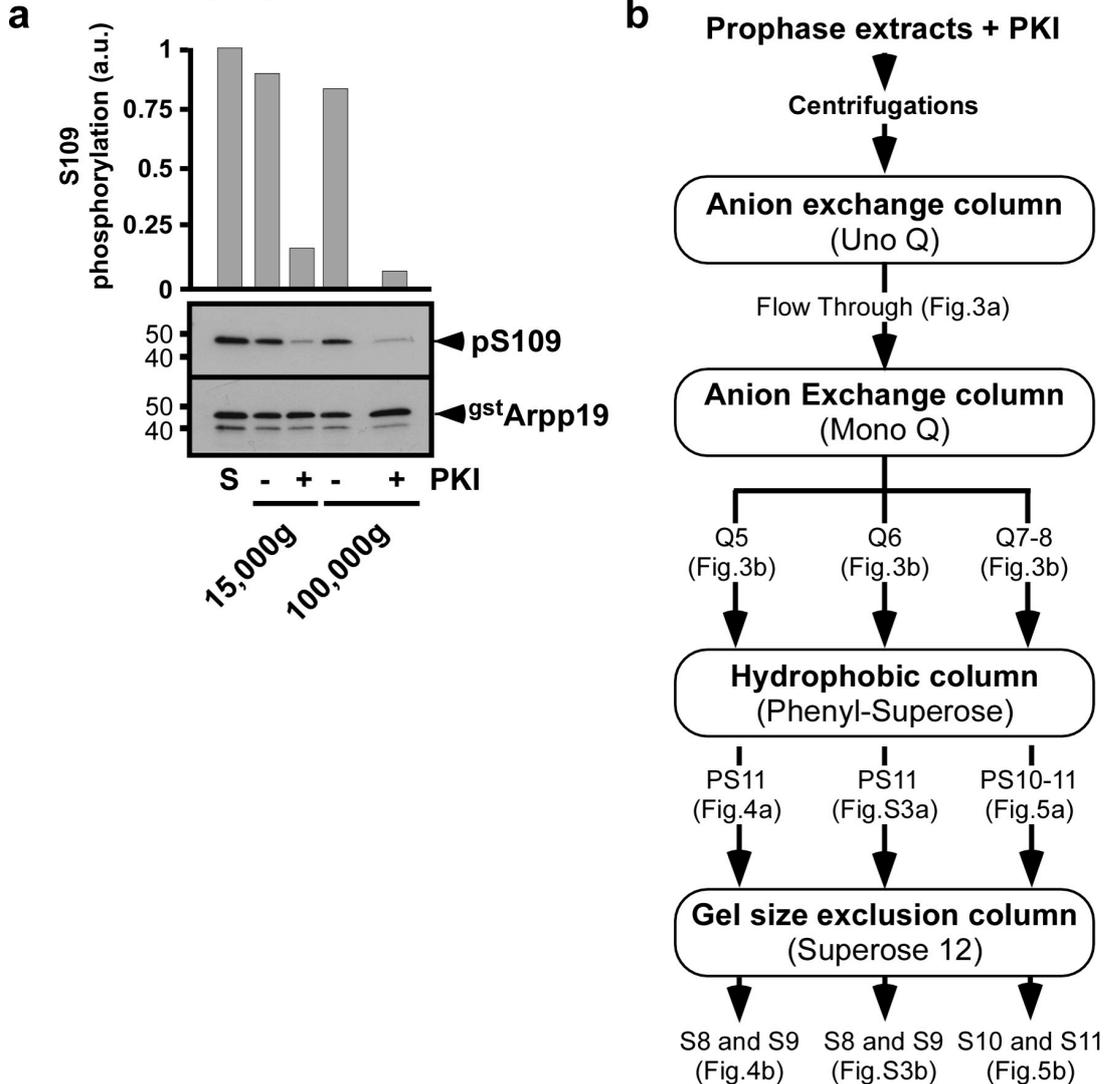
Supplementary Figure 1. Cter-GST-Arpp19 is phosphorylated at S109 by PKA and does not affect meiosis resumption.



(a) Cter-GST-Arpp19 was incubated with or without PKA catalytic subunit in the presence or in the absence of ATP. S109 phosphorylation of Cter-GST-Arpp19 (pS109) and total Cter-GST-Arpp19 (^{gst}Cter) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. (b) Cter-GST-Arpp19 was *in vitro* phosphorylated by PKA and then incubated for 3h in prophase extracts, supplemented or not with PKI. S109 phosphorylation of Cter-GST-Arpp19 (pS109) and total Cter-GST-Arpp19 (^{gst}Cter) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. (c) Prophase oocytes were injected with various amounts of Cter-GST-Arpp19 (^{gst}Cter) as indicated, and stimulated with progesterone (Pg). GVBD was scored as a function of time. (d) Same experiment as in (C). Prophase (Pro) or

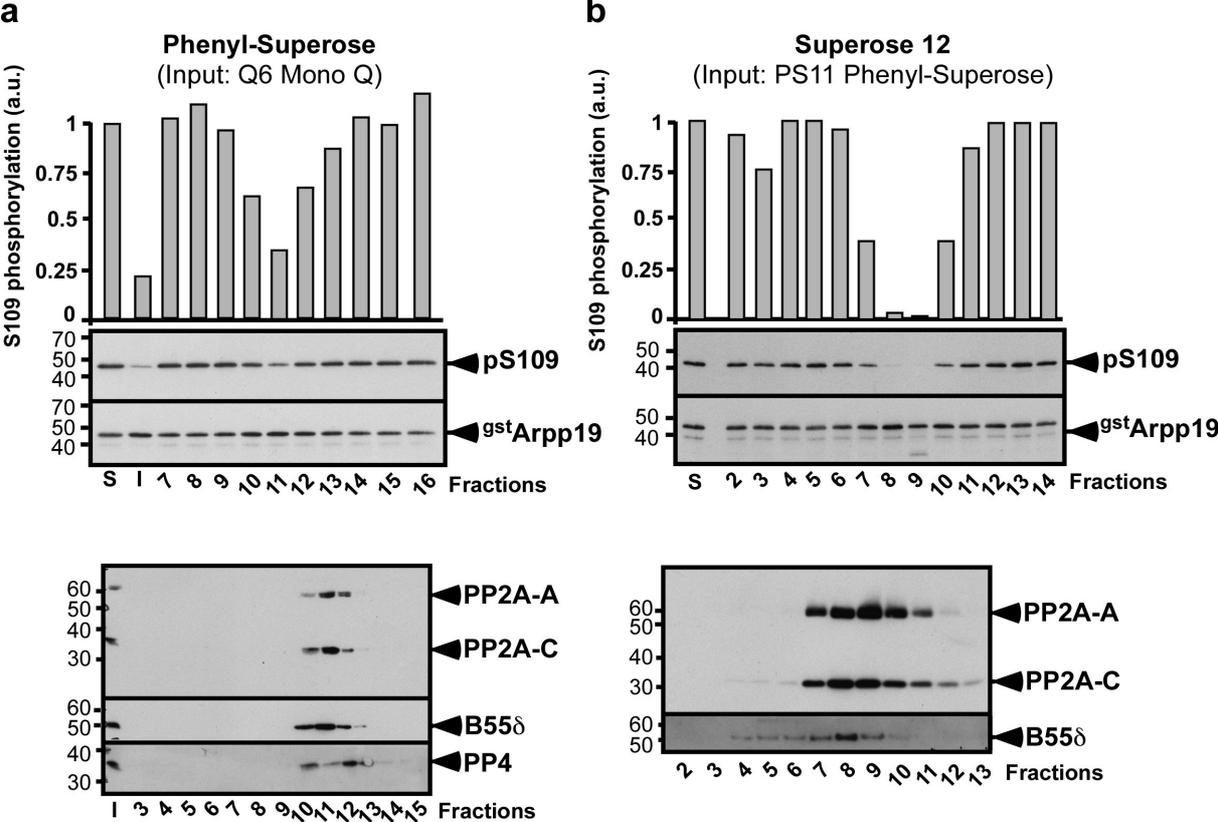
progesterone-stimulated oocytes (Pg), injected or not with Cter-GST-Arpp19, were collected at the time of GVBD. Cter-GST-Arpp19 (gstCter) was pulled-down and western blotted with the anti-GST antibody. Total oocyte extracts were western blotted with antibodies against phosphorylated MAPK (pMAPK) and total MAPK.

Supplementary Figure 2. Protocol of S109-phosphatase biochemical isolation.



(a) 20,000 prophase oocytes were lysed and successively centrifuged at 300g, 1100g and 15,000g for 20 min. The 15,000g supernatant was ultracentrifuged at 100,000g for 2h. S109-phosphatase activity was assayed in the 15,000g and 100,000g supernatants by adding pS109-GST-Arpp19 in the presence or in the absence of PKI. S109 phosphorylation of GST-Arpp19 (pS109) and total GST-Arpp19 (^{gst}Arpp19) were western blotted using respectively phospho-S109-Arpp19 and GST antibodies. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (b) Scheme of the protocol used for the biochemical isolation of S109-phosphatase illustrated in Figs. 3-5 and Supplementary Fig. 3.

Supplementary Figure 3. Biochemical isolation of S109-phosphatase from prophase extracts - Separation of fraction 6 from the Mono Q column with Phenyl-Superose and Superose 12 columns.



Continuation of experiment illustrated in Fig. 3. "S": starting pS109-GST-Arpp19 substrate. "I": input sample loaded on the column. S109 phosphorylation quantification: an arbitrary unit (a.u.) of 1 was attributed to the phosphorylation level of S. (a) Phenyl-Superose. Fraction 6 from the Mono Q column (see Fig. 3b) was loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Phenyl-Superose column and western blot analysis of fractions 3 to 15 with antibodies directed against catalytic subunits of PP2A (PP2A-C) and PP4, PP2A scaffold subunit A (PP2A-A) and PP2A regulatory subunit B55δ. (b) Superose 12. Fraction 11 from the Phenyl-Superose column (see a) was loaded on the column. Elution profile of S109-phosphatase activity after Superose 12 column and western blot analysis of fractions 2 to 13 with antibodies directed against PP2A scaffold subunit (PP2A-A), PP2A catalytic subunit (PP2A-C) and PP2A regulatory subunit B55δ.

Supplementary Table 1. LC-MS/MS analysis of the S109-phosphatase enriched fractions from two distinct isolation experiments.

The isolation procedure of S109-phosphatase was repeated 4 times with oocytes collected from different females. The results of the experiment 1 are shown in Table 1. Experiment 4 was analyzed by western blot but not by LC-MS/MS. In experiment 2, S109-phosphatase activity was recovered in fractions Q5 to Q8 after the Mono Q column. These fractions were pooled before loading on Phenyl-Superose column. In experiment 3, S109-phosphatase activity was recovered in a single fraction after the Mono Q column, Q8, which was further loaded on the Phenyl-Superose column. For both experiments 2 and 3, S109-phosphatase activity was recovered in PS11 after the Phenyl-Superose column. PS11 was loaded on the Superose 12 column. The phosphatase content estimated by LC-MS/MS sequencing in PS11 of experiment 3 and in fractions from Superose 12 column of experiments 2 and 3 is summarized in **(a)** and **(b)** for experiments 2 and 3 respectively. S109-phosphatase activity is indicated with "+" or "-". When S109-phosphatase is present, the column is in grey.

(a) LC-MS/MS analysis of Superose fractions from experiment 2 (input: pool of Q5 to 8 > PS11).

Family	Description	Accession	Gene Symbol	Coverage (%)	Mascot scores			
					S5	S7	S8	S9
PP2A-A	Regulatory subunit A, β	148230849	ppp2r1b; ppp2r1b.S	60	810	2675	2392	1509
	65 kDa regulatory subunit A β isoform-like	148227844	LOC398563	58	829	2625	2458	1509
	Regulatory subunit A α	148222150	ppp2r1a-b; ppp2r1a.S	52	650	1380	1566	706
	Regulatory subunit A α	148224496	ppp2r1a-a; ppp2r1a.L	52	562	1205	1438	764
PP2A-C	Catalytic subunit, α	148230509	ppp2ca; ppp2ca.L	56	399	1332	1014	472
	Catalytic subunit β [<i>X. tropicalis</i>]	53749698	ppp2cb	53	399	1306	1003	472
B55	55 kDa regulatory subunit B δ	147900119	ppp2r2d; ppp2r2d.S	34	65	171	296	233
	phosphorylase phosphatase/B55 α	963087	ppp2r2a; ppp2r2a.S	33	66	324	403	427
B56	Regulatory subunit B' α	168693595	ppp2r5a; ppp2r5a.S	51	317	761	707	404
	Regulatory subunit B' ϵ	148236023	ppp2r5e; ppp2r5e.S	32	35	226	181	126
		147902694	ppp2r5e1	26	35	251	138	105
	Regulatory subunit B' γ	148236119	ppp2r5c; ppp2r5c.L	8		105	70	43
PP2C	PP1A	147905165	ppm1a; ppm1a.L	26				184
	Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1B	148227634	ppm1b; ppm1b.L	18				164
PP1	Catalytic subunit, α	147903539	ppp1ca; ppp1ca.L	9	67	35	34	36
PP3	Catalytic subunit, α	148235616	ppp3ca	9	82		62	108
PP4	Catalytic subunit [<i>Xenopus tropicalis</i>]	45360541	ppp4c	13		113	60	37
PP6	Catalytic subunit	147906292	ppp6c; ppp6c.L	3	23			
S109-phosphatase activity					-	-	+	-

(b) LC-MS/MS analysis of PS11 and Superose fractions from experiment 3 (input: Q8 > PS11).

Family	Description	Accession	Gene symbol	Coverage (%)	Mascot scores						
					PS11	Superose fractions					
					S5	S6	S7	S8	S9	S10	
PP2A-A	65 kDa regulatory subunit A β isoform-like	148227844	LOC398563	52,63157895	1888	388	251	415	620	838	403
	Regulatory subunit A β	148230849	ppp2r1b; ppp2r1b.S	52,12224109	1825	347	255	395	572	814	403
	Regulatory subunit A α	148222150	ppp2r1a-b; ppp2r1a.S	42,44482173	1181	141	51	290	370	454	218
	Regulatory subunit A α	148224496	ppp2r1a-a; ppp2r1a.L	41,93548387	1135	141	51	321	399	484	218
PP2A-C	Catalytic subunit α	148230509	ppp2ca; ppp2ca.L	53,07443366	721	171	69	108	214	227	99
	Catalytic subunit β [X. tropicalis]	53749698	ppp2cb	50,48543689	690	155	69	132	233	243	99
B55	Regulatory subunit B α	148234757	ppp2r2a; ppp2r2a.S	46,17117117	866	56	67	106	81	151	42
	55 kDa regulatory subunit B δ	147900119	ppp2r2d; ppp2r2d.S	27,74049217	706	65	88	88	66	71	33
B56	Regulatory subunit B' α	168693595	ppp2r5a; ppp2r5a.S	23,52941176	438	41				43	
	Regulatory subunit B' β	148234627	ppp2r5b; ppp2r5b.L	26,2605042	452						
	Regulatory subunit B' ϵ	148236023	ppp2r5e; ppp2r5e.S	18,84368308	268						
		147902694	ppp2r5e1	17,55888651	249						
PP2C	PP1A	147905165	ppm1a; ppm1a.L	46,73629243	1011		41	31		218	389
	Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1B	148227634	ppm1b; ppm1b.L	15,42168675	549						
PP1	Catalytic subunit B γ	148224548	ppp1cc	23,043	206						
PP3	Catalytic subunit, α	148235616	ppp3ca	5,598455598	94						
PP6	Catalytic subunit	147906292	ppp6c; ppp6c.L	10,16393443	15						
PP4	Regulatory subunit 2-B	147901735	ppp4r2; ppp4r2.S	3,768844221	19						
S109-phosphatase activity					+++	-	+	++	++	+	-

Bibliographie

Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J.C., and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* *111*, 1751-1757.

Adhikari, D., Diril, M.K., Busayavalasa, K., Risal, S., Nakagawa, S., Lindkvist, R., Shen, Y., Coppola, V., Tessarollo, L., Kudo, N.R., *et al.* (2014). Mast1 is required for timely activation of APC/C in meiosis I and Cdk1 reactivation in meiosis II. *J Cell Biol* *206*, 843-853.

Afshar, K., Werner, M.E., Tse, Y.C., Glotzer, M., and Gonczy, P. (2010). Regulation of cortical contractility and spindle positioning by the protein phosphatase 6 PPH-6 in one-cell stage *C. elegans* embryos. *Development* *137*, 237-247.

Alfieri, C., Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M., and Barford, D. (2016). Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature* *536*, 431-436.

Alfonso-Perez, T., Hayward, D., Holder, J., Gruneberg, U., and Barr, F.A. (2019). MAD1-dependent recruitment of CDK1-CCNB1 to kinetochores promotes spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* *218*, 1108-1117.

Alvarez-Fernandez, M., Sanchez-Martinez, R., Sanz-Castillo, B., Gan, P.P., Sanz-Flores, M., Trakala, M., Ruiz-Torres, M., Lorca, T., Castro, A., and Malumbres, M. (2013). Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 17374-17379.

Amiel, A., Leclere, L., Robert, L., Chevalier, S., and Houliston, E. (2009). Conserved functions for Mos in eumetazoan oocyte maturation revealed by studies in a cnidarian. *Curr Biol* *19*, 305-311.

Andrade, E.C., Musante, V., Horiuchi, A., Matsuzaki, H., Brody, A.H., Wu, T., Greengard, P., Taylor, J.R., and Naim, A.C. (2017). ARPP-16 is a striatal-enriched inhibitor of protein phosphatase 2A regulated by microtubule-associated serine/threonine kinase 3 (Mast 3 kinase). *J Neurosci*.

Antanaviciute, I., Gibieza, P., Prekeris, R., and Skeberdis, V.A. (2018). Midbody: From the Regulator of Cytokinesis to Postmitotic Signaling Organelle. *Medicina (Kaunas)* *54*.

Aono, S., Haruna, Y., Watanabe, Y.H., Mochida, S., and Takeda, K. (2019). The fission yeast Greatwall-Endosulfine pathway is required for proper quiescence/G0 phase entry and maintenance. *Genes Cells* *24*, 172-186.

Archambault, V., Zhao, X., White-Cooper, H., Carpenter, A.T., and Glover, D.M. (2007). Mutations in *Drosophila* Greatwall/Scant reveal its roles in mitosis and meiosis and interdependence with Polo kinase. *PLoS Genet* *3*, e200.

Birot, A., Eguienta, K., Vazquez, S., Claverol, S., Bonneu, M., Ekwall, K., Javerzat, J.P., and Vaur, S. (2017). A second Wpl1 anti-cohesion pathway requires dephosphorylation of fission yeast kleisin Rad21 by PP4. *Embo J* *36*, 1364-1378.

- Boettcher, J.M., Hartman, K.L., Lador, D.T., Qi, Z., Woods, W.S., George, J.M., and Rienstra, C.M. (2008). Membrane-induced folding of the cAMP-regulated phosphoprotein endosulfine- α . *Biochemistry* 47, 12357-12364.
- Bollu, L.R., Mazumdar, A., Savage, M.I., and Brown, P.H. (2017). Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 2136-2142.
- Bontron, S., Jaquenoud, M., Vaga, S., Talarek, N., Bodenmiller, B., Aebersold, R., and De Virgilio, C. (2013). Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A. *Cell reports* 3, 16-22.
- Booher, R.N., Holman, P.S., and Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* 272, 22300-22306.
- Booker, M.A., and DeLong, A. (2017). Positive selection analysis highlights key positions in plant PP2A regulatory subunits. *Plant signaling & behavior* 12, e1347245.
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 18, 185-191.
- Brautigan, D.L., and Shenolikar, S. (2018). Protein Serine/Threonine Phosphatases: Keys to Unlocking Regulators and Substrates. *Annu Rev Biochem* 87, 921-964.
- Brene, S., Herrera-Marschitz, M., Persson, H., and Lindfors, N. (1994). Expression of mRNAs encoding dopamine receptors in striatal regions is differentially regulated by midbrain and hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 21, 274-282.
- Burgess, A., Vigneron, S., Brioude, E., Labbe, J.C., Lorca, T., and Castro, A. (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12564-12569.
- 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, 697-709.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., and Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC evolutionary biology* 14, 10.
- Castilho, P.V., Williams, B.C., Mochida, S., Zhao, Y., and Goldberg, M.L. (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55 δ , a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell* 20, 4777-4789.
- Castro, A., Peter, M., Magnaghi-Jaulin, L., Vigneron, S., Galas, S., Lorca, T., and Labbe, J.C. (2001). Cyclin B/cdc2 Induces c-Mos Stability by Direct Phosphorylation in *Xenopus* Oocytes. *Mol Biol Cell* 12, 2660-2671.
- Chambon, J.P., Touati, S.A., Berneau, S., Cladiere, D., Hebras, C., Groeme, R., McDougall, A., and Wassmann, K. (2013). The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II. *Curr Biol* 23, 485-490.
- Chan, E.H., Santamaria, A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma* 117, 457-469.

- Charrasse, S., Gharbi-Ayachi, A., Burgess, A., Vera, J., Hached, K., Raynaud, P., Schwob, E., Lorca, T., and Castro, A. (2017). Ensa controls S-phase length by modulating Treslin levels. *Nature communications* 8, 206.
- Chatterjee, J., Beullens, M., Sukackaite, R., Qian, J., Lesage, B., Hart, D.J., Bollen, M., and Kohn, M. (2012). Development of a peptide that selectively activates protein phosphatase-1 in living cells. *Angewandte Chemie* 51, 10054-10059.
- Chau, A.S., and Shibuya, E.K. (1998). Mos-induced p42 mitogen-activated protein kinase activation stabilizes M-phase in *Xenopus* egg extracts after cyclin destruction. *Biology of the Cell (Paris)* 90, 565-572.
- Chen, M.J., Dixon, J.E., and Manning, G. (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Science signaling* 10.
- Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T., and Piwnica-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol* 21, 3853-3861.
- Chen, Q., Zhang, X., Jiang, Q., Clarke, P.R., and Zhang, C. (2008). Cyclin B1 is localized to unattached kinetochores and contributes to efficient microtubule attachment and proper chromosome alignment during mitosis. *Cell research* 18, 268-280.
- Cheng, A., Kaldis, P., and Solomon, M.J. (2000). Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem* 275, 34744-34749.
- Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P., and Solomon, M.J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* 13, 2946-2957.
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D.M., Weinstock, D.M., Pfeifer, G.P., and Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* 31, 33-46.
- Cicirelli, M.F., and Smith, L.D. (1985). Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 108, 254-258.
- Clarke, P., Leiss, D., Pagano, M., and Karsenti, E. (1992). Cyclin A- and cyclin B-dependent protein kinases are regulated by different mechanisms in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 11, 1751-1761.
- Clarke, P.R., Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase : Specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* 4, 397-411.
- Coll, O., Morales, A., Fernandez-Checa, J.C., and Garcia-Ruiz, C. (2007). Neutral sphingomyelinase-induced ceramide triggers germinal vesicle breakdown and oxidant-dependent apoptosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Lipid Res* 48, 1924-1935.
- Connell-Crowley, L., Solomon, M.J., Wei, N., and Harper, J.W. (1993). Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol Biol Cell* 4, 79-92.
- Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Ozon, R., and Belle, R. (1990). Protein phosphatase activities in vivo in *Xenopus laevis* oocyte: inhibition by okadaic acid. *Biol Cell* 69, 233-236.
- 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, 467-476.

- Cundell, M.J., Bastos, R.N., Zhang, T., Holder, J., Gruneberg, U., Novak, B., and Barr, F.A. (2013). The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation. *Mol Cell* 52, 393-405.
- Cundell, M.J., Hutter, L.H., Nunes Bastos, R., Poser, E., Holder, J., Mohammed, S., Novak, B., and Barr, F.A. (2016). A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit. *J Cell Biol* 214, 539-554.
- D'Angiolella, V., Mari, C., Nocera, D., Rametti, L., and Grieco, D. (2003). The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev* 17, 2520-2525.
- D'Angiolella, V., Palazzo, L., Santarpia, C., Costanzo, V., and Grieco, D. (2007). Role for non-proteolytic control of M-phase-promoting factor activity at M-phase exit. *PLoS One* 2, e247.
- Daldello, E.M., Le, T., Poulhe, R., Jesus, C., Haccard, O., and Dupré, A. (2015). Fine-tuning of Cdc6 accumulation by Cdk1 and MAP kinase is essential for completion of oocyte meiotic divisions. *J Cell Sci*.
- De Smedt, V., Crozet, N., and Jesus, C. (1999). In vitro binding of free cdc2 and raf kinase to membrane vesicles: a possible new regulatory mechanism for cdc2 kinase activation in *Xenopus* oocyte [In Process Citation]. *Microsc Res Tech* 45, 13-30.
- De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jesus, C., and Ozon, R. (2002). Thr-161 Phosphorylation of Monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocyte. *J Biol Chem* 277, 28592-28600.
- De Smedt, V., Rime, H., Jesus, C., and Ozon, R. (1995). Inhibition of glycosphingolipid synthesis induces p34cdc2 activation in *Xenopus* oocyte. *FEBS Lett* 375, 249-253.
- Deguchi, R., Takeda, N., and Stricker, S.A. (2011). Comparative biology of cAMP-induced germinal vesicle breakdown in marine invertebrate oocytes. *Mol Reprod Dev* 78, 708-725.
- den Elzen, N., and Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153, 121-136.
- Di Fiore, B., and Pines, J. (2010). How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 190, 501-509.
- Dohadwala, M., Silva, E., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonarohall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., and Berndt, N. (1994). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6408-6412.
- Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F. (2002). Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J* 21, 4875-4884.
- 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 USA* 99, 16794-16799.
- Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.-A., Franza, B.R., Karsenti, E., and Draetta, G. (1991). cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J* 10, 3311-3319.
- Dulubova, I., Horiuchi, A., Snyder, G.L., Girault, J.A., Czernik, A.J., Shao, L., Ramabhadran, R., Greengard, P., and Nairn, A.C. (2001). ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins. *J Neurochem* 77, 229-238.

- Dumollard, R., Levasseur, M., Hebras, C., Huitorel, P., Carroll, M., Chambon, J.P., and McDougall, A. (2011). Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs. *Development* 138, 885-895.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153-179.
- Duncan, P.I., Pollet, N., Niehrs, C., and Nigg, E.A. (2001). Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 270, 78-87.
- 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, 423-431.
- Dupré, A., Buffin, E., Roustan, C., Nairn, A.C., Jesus, C., and Haccard, O. (2013). The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 126, 3916-3926.
- Dupré, A., Daldello, E.M., Nairn, A.C., Jesus, C., and Haccard, O. (2014). Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications* 5, 3318.
- Dupré, A., Haccard, O., and Jesus, C. (2011). Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. *J Signal Transduct* 2011, 350412.
- Dupré, A., Jesus, C., Ozon, R., and Haccard, O. (2002). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 21, 4026-4036.
- Dupré, H.a.J. (2017). The greatwall kinase is dominant over PKA in controlling the antagonistic function of ARPP19 in *Xenopus* oocytes. *Cell Cycle*.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., *et al.* (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 117, 2523-2531.
- Elowe, S., Dulla, K., Uldschmid, A., Li, X., Dou, Z., and Nigg, E.A. (2010). Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J Cell Sci* 123, 84-94.
- Eyers, P.A., Liu, J., Hayashi, N.R., Lewellyn, A.L., Gautier, J., and Maller, J.L. (2005). Regulation of the G2/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*.
- Fattaey, A., and Booher, R.N. (1997). Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog Cell Cycle Res* 3, 233-240.
- 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, 2177-2189.
- 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, 2853-2860.
- Fisher, D.L., Brassac, T., Galas, S., and Dorée, M. (1999). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* 126, 4537-4546.
- Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.

- Foulkes, J.G., and Maller, J.L. (1982). In vivo actions of protein phosphatase inhibitor-2 in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 150, 155-160.
- 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, 279-288.
- 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, 3279-3288.
- Fung, T.K., Ma, H.T., and Poon, R.Y. (2007). Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol Biol Cell* 18, 1861-1873.
- 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 J* 13, 2399-2410.
- Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K., and Ellem, K.A.O. (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* 272, 28607-28614.
- Gaffre, M., Martoriati, A., Belhachemi, N., Chambon, J.P., Houliston, E., Jessus, C., and Karaiskou, A. (2011). A critical balance between Cyclin B synthesis and Myt1 activity controls meiosis entry in *Xenopus* oocytes. *Development* 138, 3735-3744.
- Gastwirt, R.F., McAndrew, C.W., and Donoghue, D.J. (2007). Speedy/RINGO regulation of CDKs in cell cycle, checkpoint activation and apoptosis. *Cell Cycle* 6, 1188-1193.
- Gautier, J., and Maller, J.L. (1991). Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *EMBO J* 10, 177-182.
- 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, 487-494.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-439.
- Gavet, O., and Pines, J. (2010a). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol* 189, 247-259.
- Gavet, O., and Pines, J. (2010b). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 18, 533-543.
- Gerhart, J., Wu, M., and Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 98, 1247-1255.
- Gharbi-Ayachi, A., Labbé, J.-C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.-M., Brioude, E., Van-Dorssele, A., Castro, A., and Lorca, T. (2010). The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science* 330, 1673-1677.
- Gheghiani, L., Loew, D., Lombard, B., Mansfeld, J., and Gavet, O. (2017). PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis. *Cell reports* 19, 2060-2073.

- Girault, J.A., Horiuchi, A., Gustafson, E.L., Rosen, N.L., and Greengard, P. (1990). Differential expression of ARPP-16 and ARPP-19, two highly related cAMP-regulated phosphoproteins, one of which is specifically associated with dopamine-innervated brain regions. *J Neurosci* *10*, 1124-1133.
- Girault, J.A., Shalaby, I.A., Rosen, N.L., and Greengard, P. (1988). Regulation by cAMP and vasoactive intestinal peptide of phosphorylation of specific proteins in striatal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 7790-7794.
- Godfrey, M., Touati, S.A., Kataria, M., Jones, A., Snijders, A.P., and Uhlmann, F. (2017). PP2A(Cdc55) Phosphatase Imposes Ordered Cell-Cycle Phosphorylation by Opposing Threonine Phosphorylation. *Mol Cell* *65*, 393-402 e393.
- 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 Lett* *245*, 91-94.
- Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34^{cdc2} function. *EMBO J* *10*, 3297-3309.
- Gould, K.L., and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* *342*, 39-45.
- Grallert, A., Boke, E., Hagting, A., Hodgson, B., Connolly, Y., Griffiths, J.R., Smith, D.L., Pines, J., and Hagan, I.M. (2015). A PP1-PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature* *517*, 94-98.
- 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*, 430-438.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D.O. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *Embo J* *11*, 3995-4005.
- Guo, F., Stanevich, V., Wlodarchak, N., Sengupta, R., Jiang, L., Satyshur, K.A., and Xing, Y. (2014). Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone. *Cell research* *24*, 190-203.
- 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. *Natl Cell Biol* *8*, 1084-1094.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a Human G1-Phase and S-Phase Protein Phosphatase That Associates with Cdk2. *Cell* *75*, 791-803.
- Haccard, O., Dupré, A., Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Jesus, C., and Ozon, R. (2012). Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates. *Mol Cell Endocrinol* *362*, 110-119.
- Haccard, O., and Jesus, C. (2006). Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep* *7*, 321-325.
- Hached, K., Goguet, P., Charrasse, S., Vigneron, S., Sacristan, M.P., Lorca, T., and Castro, A. (2019). ENSA and ARPP19 differentially control cell cycle progression and development. *J Cell Biol* *218*, 541-558.

- Hammond, D., Zeng, K., Espert, A., Bastos, R.N., Baron, R.D., Gruneberg, U., and Barr, F.A. (2013). Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J Cell Sci* *126*, 3429-3440.
- 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*, 1670-1676.
- Han, S.J., and Conti, M. (2006). New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle* *5*, 227-231.
- Hannon, G.J., Casso, D., and Beach, D. (1994). Kap - A Dual Specificity Phosphatase That Interacts with Cyclin-Dependent Kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 1731-1735.
- Hansen, D.V., Pomerening, J.R., Summers, M.K., Miller, J.J., Ferrell, J.E., Jr., and Jackson, P.K. (2007). Emi2 at the Crossroads: Where CSF Meets MPF. *Cell Cycle* *6*.
- Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2012). Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature communications* *3*, 1059.
- Hayward, D., Alfonso-Perez, T., Cundell, M.J., Hopkins, M., Holder, J., Bancroft, J., Hutter, L.H., Novak, B., Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2019a). CDK1-CCNB1 creates a spindle checkpoint-permissive state by enabling MPS1 kinetochore localization. *J Cell Biol* *218*, 1182-1199.
- Hayward, D., Alfonso-Perez, T., and Gruneberg, U. (2019b). Orchestration of the spindle assembly checkpoint by CDK1-cyclin B1. *FEBS Lett*.
- Hayward, D., Bancroft, J., Mangat, D., Alfonso-Perez, T., Dugdale, S., McCarthy, J., Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2019c). Checkpoint signaling and error correction require regulation of the MPS1 T-loop by PP2A-B56. *J Cell Biol* *218*, 3188-3199.
- Hégarat Nadia, Crncec Adrijana, Suarez Peredo Rodriguez Maria F., Echegaray Iturra Fabio, Gu Yan, Paul F. Lang, Barr Alexis R., Bakal Chris, Kanemaki Masato T., Lamond Angus I., *et al.* (2018). Cyclin A triggers Mitosis either via Greatwall or Cyclin B. *bioRxiv* *bioRxiv 501684*.
- Heim, A., Konietzny, A., and Mayer, T.U. (2015). Protein phosphatase 1 is essential for Greatwall inactivation at mitotic exit. *EMBO Rep* *16*, 1501-1510.
- Heim, A., Tischer, T., and Mayer, T.U. (2018). Calcineurin promotes APC/C activation at meiotic exit by acting on both XErp1 and Cdc20. *EMBO Rep* *19*.
- Hein, J.B., Hertz, E.P.T., Garvanska, D.H., Kruse, T., and Nilsson, J. (2017). Distinct kinetics of serine and threonine dephosphorylation are essential for mitosis. *Natl Cell Biol* *19*, 1433-1440.
- Helps, N.R., Brewis, N.D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K., and Cohen, P.T. (1998). Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* *111 (Pt 10)*, 1331-1340.
- Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Den Abt, T., Van Eynde, A., Nicolaescu, E., Lesage, B., and Bollen, M. (2009). Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol* *16*, 365-371.
- Hertz, E.P., Kruse, T., Davey, N.E., Lopez-Mendez, B., Sigurethsson, J.O., Montoya, G., Olsen, J.V., and Nilsson, J. (2016). A Conserved Motif Provides Binding Specificity to the PP2A-B56 Phosphatase. *Mol Cell* *63*, 686-695.

- Hino, H., Takaki, K., and Mochida, S. (2015). Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 467, 297-302.
- Hiraoka, D., Hosoda, E., Chiba, K., and Kishimoto, T. (2019). SGK phosphorylates Cdc25 and Myt1 to trigger cyclin B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition. *J Cell Biol*.
- 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, 3795-3807.
- 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 J* 12, 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 J* 13, 4302-4310.
- Horiuchi, A., Williams, K.R., Kurihara, T., Nairn, A.C., and Greengard, P. (1990). Purification and cDNA cloning of ARPP-16, a cAMP-regulated phosphoprotein enriched in basal ganglia, and of a related phosphoprotein, ARPP-19. *J Biol Chem* 265, 9476-9484.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.
- Hu, M.W., Meng, T.G., Jiang, Z.Z., Dong, M.Z., Schatten, H., Xu, X., Wang, Z.B., and Sun, Q.Y. (2016). Protein Phosphatase 6 Protects Prophase I-Arrested Oocytes by Safeguarding Genomic Integrity. *PLoS Genet* 12, e1006513.
- Hu, M.W., Wang, Z.B., Teng, Y., Jiang, Z.Z., Ma, X.S., Hou, N., Cheng, X., Schatten, H., Xu, X., Yang, X., *et al.* (2015). Loss of protein phosphatase 6 in oocytes causes failure of meiosis II exit and impaired female fertility. *J Cell Sci* 128, 3769-3780.
- Huang, H., Hittle, J., Zappacosta, F., Annan, R.S., Hershko, A., and Yen, T.J. (2008). Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *J Cell Biol* 183, 667-680.
- Huchon, D., Ozon, R., and Demaille, J.G. (1981a). Protein phosphatase-1 is involved in *Xenopus* oocyte maturation. *Nature* 294, 358-359.
- 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. *Mol Cell Endocrinol* 22, 211-222.
- Huchon, D., Rime, H., Jesus, 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, 133-141.
- Huelgas-Morales, G., and Greenstein, D. (2018). Control of oocyte meiotic maturation in *C. elegans*. *Semin Cell Dev Biol* 84, 90-99.
- Ikegami, S., Tamura, S., and Kanatani, H. (1967). Starfish gonad: action and chemical identification of spawning inhibitor. *Science* 158, 1052-1053.
- Ikehara, T., Ikehara, S., Imamura, S., Shinjo, F., and Yasumoto, T. (2007). Methylation of the C-terminal leucine residue of the PP2A catalytic subunit is unnecessary for the catalytic activity and the binding of regulatory subunit (PR55/B). *Biochem Biophys Res Commun* 354, 1052-1057.

- 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, 1100-1104.
- Inoue, D., and Sagata, N. (2005). The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. *Embo J* 24, 1057-1067.
- Irwin, N., Chao, S., Goritchenko, L., Horiuchi, A., Greengard, P., Nairn, A.C., and Benowitz, L.I. (2002). Nerve growth factor controls GAP-43 mRNA stability via the phosphoprotein ARPP-19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12427-12431.
- Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., Ezaki, T., Kanemori, Y., Inoue, D., Ueno, H., *et al.* (2011). Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs. *Dev Cell* 21, 506-519.
- 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, 4513-4523.
- Izumi, T., and Maller, J.L. (1993). Elimination of Cdc2 Phosphorylation Sites in the Cdc25 Phosphatase Blocks Initiation of M-Phase. *Mol Biol Cell* 4, 1337-1350.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., and Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Natl Cell Biol* 5, 143-148.
- Janssens, V., Longin, S., and Goris, J. (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* 33, 113-121.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jessus, C., Goris, J., Staquet, S., Cayla, X., Ozon, R., and Merlevede, W. (1989). Identification of the ATP + Mg-dependent and polycation-stimulated protein phosphatases in the germinal vesicle of the *Xenopus* oocyte. *The Biochemical Journal* 260, 45-51.
- 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, 813-820.
- Ji, Z., Gao, H., and Yu, H. (2015). CELL DIVISION CYCLE. Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 348, 1260-1264.
- 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 J* 13, 1549-1556.
- Juanes, M.A., Khoueiry, R., Kupka, T., Castro, A., Mudrak, I., Ogris, E., Lorca, T., and Piatti, S. (2013). Budding yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for timely mitotic progression. *PLoS Genet* 9, e1003575.
- Kanatani, H. (1969). Induction of spawning and oocyte maturation by L-methyl-adenine in starfishes. *Exp Cell Res* 57, 333-337.
- 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, 491-500.

- Karaiskou, A., Jesus, 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*, 3747-3756.
- Karaiskou, A., Perez, L.H., Ferby, I., Ozon, R., Jesus, C., and Nebreda, A.R. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem* *276*, 36028-36034.
- Karasu, M.E., Bouftas, N., Keeney, S., and Wassmann, K. (2019). Cyclin B3 promotes anaphase I onset in oocyte meiosis. *J Cell Biol* *218*, 1265-1281.
- Kelm, O., Wind, M., Lehmann, W.D., and Nigg, E.A. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J Biol Chem* *277*, 25247-25256.
- Kim, M.Y., Bucciarelli, E., Morton, D.G., Williams, B.C., Blake-Hodek, K., Pellacani, C., Von Stetina, J.R., Hu, X., Somma, M.P., Drummond-Barbosa, D., *et al.* (2012). Bypassing the Greatwall-Endosulfine pathway: plasticity of a pivotal cell-cycle regulatory module in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *191*, 1181-1197.
- Kishimoto, T., Hirai, S., and Kanatani, H. (1981). Role of germinal vesicle material in producing maturation-promoting factor in starfish oocyte. *Dev Biol* *81*, 177-181.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* *441*, 46-52.
- 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.
- Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., and Newport, J. (1994). Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34^{cdc2} on threonine 14. *Mol Biology of the Cell* *5*, 273-282.
- Krek, W., and Nigg, E. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34^{cdc2} kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J* *10*, 305-316.
- Kremmer, E., Ohst, K., Kiefer, J., Brewis, N., and Walter, G. (1997). Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol* *17*, 1692-1701.
- Kruse, T., Zhang, G., Larsen, M.S., Lischetti, T., Streicher, W., Kragh Nielsen, T., Bjorn, S.P., and Nilsson, J. (2013). Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci* *126*, 1086-1092.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev* *13*, 1067-1072.
- Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y.W., Greengard, P., and Nairn, A.C. (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 2168-2173.
- Labandera, A.M., Vahab, A.R., Chaudhuri, S., Kerk, D., and Moorhead, G.B. (2015). The mitotic PP2A regulator ENSA/ARPP-19 is remarkably conserved across plants and most eukaryotes. *Biochem Biophys Res Commun* *458*, 739-744.

- Labbe, J.C., Capony, J.P., Caput, D., Cavadore, J.C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J.M., Picard, A., and Doree, M. (1989a). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 8, 3053-3058.
- Labbe, J.C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J.C., Nurse, P., and Doree, M. (1989b). Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* 57, 253-263.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 22, R966-980.
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.E., and Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol* 232, 400-413.
- Lee, D.H., Goodarzi, A.A., Adelmant, G.O., Pan, Y., Jeggo, P.A., Marto, J.A., and Chowdhury, D. (2012). Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *Embo J* 31, 2403-2415.
- 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, 718-722.
- 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, 1869-1877.
- Leslie, S.N., and Nairn, A.C. (2019). cAMP regulation of protein phosphatases PP1 and PP2A in brain. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 1866, 64-73.
- Li, C., Andrade, M., Dunbrack, R., and Enders, G.H. (2010). A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crml-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 30, 116-130.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.
- 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, 35-45.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* 185, 193-202.
- Liu, C.W., Wang, R.H., Dohadwala, M., Schonthal, A.H., Villa-Moruzzi, E., and Berndt, N. (1999a). Inhibitory phosphorylation of PP1alpha catalytic subunit during the G(1)/S transition. *J Biol Chem* 274, 29470-29475.
- Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (1999b). 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, 5113-5123.
- Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z.Q., and PiwnicaWorms, 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, 571-583.
- Lobjois, V., Froment, C., Braud, E., Grimal, F., Burlet-Schiltz, O., Ducommun, B., and Bouche, J.P. (2011). Study of the docking-dependent PLK1 phosphorylation of the CDC25B phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 87-90.

- 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, 270-273.
- Luo, X., Talarek, N., and De Virgilio, C. (2011). Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA Biol* 8, 14-17.
- Ma, S., Vigneron, S., Robert, P., Strub, J.M., Cianferani, S., Castro, A., and Lorca, T. (2016). Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1. *J Cell Sci* 129, 1329-1339.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119-123.
- Macurek, L., Lindqvist, A., and Medema, R.H. (2009). Aurora-A and hBora join the game of Polo. *Cancer Res* 69, 4555-4558.
- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E.D., and Earnshaw, W.C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* 117, 5461-5477.
- Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2004). Kinetochore-microtubule interactions during cell division. *Chromosome Res* 12, 585-597.
- Maller, J.L., Butcher, F.R., and Krebs, E.G. (1979). Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'- monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 254, 579-582.
- 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, 1712-1718.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 15, 122.
- 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., *et al.* (2006a). Role for the PP2A/B56delta Phosphatase in Regulating 14-3-3 Release from Cdc25 to Control Mitosis. *Cell* 127, 759-773.
- 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, 1779-1789.
- 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, 5734-5745.
- Masui, Y. (1967). Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 166, 365-376.
- Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177, 129-145.
- Matthews, L.M., and Evans, J.P. (2014). alpha-endosulfine (ENSA) regulates exit from prophase I arrest in mouse oocytes. *Cell Cycle* 13, 1639-1649.

- McGowan, C.H., and Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J* 12, 75-85.
- Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci* 114, 3749-3757.
- Merrick, K.A., Laroche, S., Zhang, C., Allen, J.J., Shokat, K.M., and Fisher, R.P. (2008). Distinct activation pathways confer cyclin-binding specificity on Cdk1 and Cdk2 in human cells. *Mol Cell* 32, 662-672.
- Millar, J.B.A., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., and Russell, P. (1991a). 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., McGowan, C.H., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991b). p80^{cdc25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{cdc2} kinase in fission yeast. *EMBO J* 10, 4301-4309.
- Mochida, S. (2014). Regulation of alpha-endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A, by multisite phosphorylation. *FEBS J* 281, 1159-1169.
- Mochida, S., and Hunt, T. (2007). Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature* 449, 336-340.
- Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J., and Hunt, T. (2009). Regulated activity of PP2A-B55delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *Embo J*.
- Mochida, S., Maslen, S.L., Skehel, M., and Hunt, T. (2010). Greatwall Phosphorylates an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A That Is Essential for Mitosis. *Science* 330, 1670-1673.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, 261-291.
- Mori, M., Hara, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2006). p90Rsk is required for G1 phase arrest in unfertilized starfish eggs. *Development*.
- Morin, V., Prieto, S., Melines, S., Hem, S., Rossignol, M., Lorca, T., Espeut, J., Morin, N., and Abrieu, A. (2012). CDK-dependent potentiation of MPS1 kinase activity is essential to the mitotic checkpoint. *Curr Biol* 22, 289-295.
- Morrill, G.A., and Kostellow, A.B. (1998). Progesterone release of lipid second messengers at the amphibian oocyte plasma membrane: role of ceramide in initiating the G2/M transition. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 359-363.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1995a). Cell cycle regulation of a *Xenopus* wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6, 119-134.
- 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, 86-90.
- Mulner, O., Cartaud, A., and Ozon, R. (1980). Cyclic AMP phosphodiesterase activities in *Xenopus laevis* oocytes. *Differentiation* 16, 31-39.
- Mulner, O., Huchon, D., Thibier, C., and Ozon, R. (1979). Cyclic AMP synthesis in *Xenopus laevis* oocytes: inhibition by progesterone. *Biochim Biophys Acta* 582, 179-184.

- Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Cormier, P., Drawing, S., Minella, O., Poulhe, R., and Schmalzing, G. (1995). Brefeldin A provokes indirect activation of cdc2 kinase (MPF) in *Xenopus* oocytes, resulting in meiotic cell division. *Dev Biol* 170, 223-229.
- Musante, V., Li, L., Kanyo, J., Lam, T.T., Colangelo, C.M., Cheng, S.K., Brody, A.H., Greengard, P., Le Novere, N., and Nairn, A.C. (2017). Reciprocal regulation of ARPP-16 by PKA and MAST3 kinases provides a cAMP-regulated switch in protein phosphatase 2A inhibition. *eLife* 6.
- Nader, N., Courjaret, R., Dib, M., Kulkarni, R.P., and Machaca, K. (2016). Release from *Xenopus* oocyte prophase I meiotic arrest is independent of a decrease in cAMP levels or PKA activity. *Development* 143, 1926-1936.
- Nader, N., Dib, M., Courjaret, R., Hodeify, R., Machaca, R., Graumann, J., and Machaca, K. (2018). The VLDL receptor regulates membrane progesterone receptor trafficking and non-genomic signaling. *J Cell Sci* 131.
- Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9, 1019-1026.
- 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, 25277-25280.
- 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 Dev* 14, 328-338.
- Nasa, I., and Kettenbach, A.N. (2018). Coordination of Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatase Activities in Mitosis. *Frontiers in cell and developmental biology* 6, 30.
- Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 5, 166-179.
- Nebreda, A.R., Gannon, J.V., and Hunt, T. (1995). Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 14, 5597-5607.
- Newhall, K.J., Criniti, A.R., Cheah, C.S., Smith, K.C., Kafer, K.E., Burkart, A.D., and McKnight, G.S. (2006). Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Curr Biol* 16, 321-327.
- Nguyen, T.B., Manova, K., Capodiceci, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X.Y., Refik-Rogers, J., Pines, J., Wolgemuth, D.J., and Koff, A. (2002). Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem* 277, 41960-41969.
- Nigg, E.A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 8, 312-317.
- Nijenhuis, W., Vallardi, G., Teixeira, A., Kops, G.J., and Saurin, A.T. (2014). Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Natl Cell Biol* 16, 1257-1264.
- Nilsson, J. (2019). Protein phosphatases in the regulation of mitosis. *J Cell Biol* 218, 395-409.
- Nishimura, T., Sugiura, K., and Naito, K. (2013). A-kinase anchor protein 1 (AKAP1) regulates cAMP-dependent protein kinase (PKA) localization and is involved in meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 88, 85.

- Nishiyama, T., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* *446*, 1096-1099.
- Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34^{cdc2} protein kinase in vertebrates. *EMBO J* *10*, 3321-3329.
- Nunbhakdi-Craig, V., Schuechner, S., Sontag, J.M., Montgomery, L., Pallas, D.C., Juno, C., Mudrak, I., Ogris, E., and Sontag, E. (2007). Expression of protein phosphatase 2A mutants and silencing of the regulatory B alpha subunit induce a selective loss of acetylated and detyrosinated microtubules. *J Neurochem* *101*, 959-971.
- O'Connor, C.M., and Smith, L.D. (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev Biol* *52*, 318-322.
- Oh, J.S., Han, S.J., and Conti, M. (2010). Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol*.
- Ohama, T. (2019). The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* *1866*, 74-82.
- Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., and Sagata, N. (2007). Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* *303*, 157-164.
- Ohe, M., Kawamura, Y., Ueno, H., Inoue, D., Kanemori, Y., Senoo, C., Isoda, M., Nakajo, N., and Sagata, N. (2010). Emi2 Inhibition of the APC/C Absolutely Requires Emi2 Binding via the C-terminal RL Tail. *Mol Biol Cell*.
- 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. *Natl Cell Biol* *4*, 111-116.
- Okumura, E., Morita, A., Wakai, M., Mochida, S., Hara, M., and Kishimoto, T. (2014). Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism. *J Cell Biol* *204*, 881-889.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., *et al.* (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* *3*, ra3.
- 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. *EMBO J* *17*, 5037-5047.
- Pan, B., and Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol* *17*, 8.
- Parker, L.L., Atherton-Fessler, S.A., 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*, 1955-1957.
- Perdiguero, E., and Nebreda, A.R. (2004). Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle* *3*, 733-737.

- 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. *Natl Cell Biol* 3, 83-87.
- 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, 2129-2139.
- Petrone, A., Adamo, M.E., Cheng, C., and Kettenbach, A.N. (2016). Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* 15, 2448-2461.
- Picard, A., and Doree, M. (1984). The role of the germinal vesicle in producing maturation-promoting factor (MPF) as revealed by the removal and transplantation of nuclear material in starfish oocytes. *Dev Biol* 104, 357-365.
- Pirino, G., Wescott, M.P., and Donovan, P.J. (2009a). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 8.
- Pirino, G., Wescott, M.P., and Donovan, P.J. (2009b). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 8, 665-670.
- Potapova, T.A., Sivakumar, S., Flynn, J.N., Li, R., and Gorbsky, G.J. (2011). Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Mol Biol Cell* 22, 1191-1206.
- Qian, Y.W., Erikson, E., Li, C., and Maller, J.L. (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 18, 4262-4271.
- 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, 8625-8632.
- Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Leclere, L., Takeda, N., Deguchi, R., Jekely, G., Momose, T., and Houliston, E. (2018). A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish *Clytia*. *eLife* 7.
- Quiroga Artigas Gonzalo, Lapébie Pascal, Leclère Lucas, Bauknecht Philip, Uveira Julie, Chevalier Sandra, Jékely Gonzalo, Momose Tsuyoshi, and Evelyn, H. (2019). A G-protein-coupled receptor mediates neuropeptide-induced oocyte maturation in the jellyfish *Clytia*. *BioRxiv* 801225; doi:<https://doi.org/10.1101/801225>.
- Rangone, H., Wegel, E., Gatt, M.K., Yeung, E., Flowers, A., Debski, J., Dadlez, M., Janssens, V., Carpenter, A.T., and Glover, D.M. (2011). Suppression of scant identifies Endos as a substrate of greatwall kinase and a negative regulator of protein phosphatase 2A in mitosis. *PLoS Genet* 7, e1002225.
- Rauh, N.R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E.A., and Mayer, T.U. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437, 1048-1052.
- Refik-Rogers, J., Manova, K., and Koff, A. (2006). Misexpression of cyclin B3 leads to aberrant spermatogenesis. *Cell Cycle* 5, 1966-1973.
- 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. *J Biol Chem* 270, 6843-6855.

- Ren, D., Fisher, L.A., Zhao, J., Wang, L., Williams, B.C., Goldberg, M.L., and Peng, A. (2017). Cell cycle-dependent regulation of Greatwall kinase by protein phosphatase 1 and regulatory subunit 3B. *J Biol Chem* 292, 10026-10034.
- Reynhout, J.K., and Smith, L.D. (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Develop Biol* 38, 394-400.
- Rhind, N., and Russell, P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., *et al.* (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53-61.
- Rime, H., Haccard, O., and Ozon, R. (1992). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic amp-dependent protein kinase in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 151, 105-110.
- Rime, H., Huchon, D., De Smedt, V., Thibier, C., Galaktionov, K., Jesus, C., and Ozon, R. (1994). Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biology of the Cell (Paris)* 82, 11-22.
- Rogers, S., Fey, D., McCloy, R.A., Parker, B.L., Mitchell, N.J., Payne, R.J., Daly, R.J., James, D.E., Caldon, C.E., Watkins, D.N., *et al.* (2016). PP1 initiates the dephosphorylation of MASTL, triggering mitotic exit and bistability in human cells. *J Cell Sci* 129, 1340-1354.
- Roshak, A.K., Capper, E.A., Imburgia, C., Fornwald, J., Scott, G., and Marshall, L.A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 12, 405-411.
- 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, 507-514.
- Ruiz, E.J., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (2008). Meiotic inactivation of *Xenopus* Myt1 by CDK/XRINGO, but not CDK/cyclin, via site-specific phosphorylation. *Mol Cell* 32, 210-220.
- Ruiz, E.J., Vilar, M., and Nebreda, A.R. (2010). A Two-Step Inactivation Mechanism of Myt1 Ensures CDK1/Cyclin B Activation and Meiosis I Entry. *Curr Biol*.
- 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, 6368-6373.
- 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.
- 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, 643-646.
- 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, 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, 512-518.

- 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, 502-513.
- Schmitt, A., and Nebreda, A.R. (2002). Inhibition of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4361-4366.
- Schmitz, M.H., Held, M., Janssens, V., Hutchins, J.R., Hudecz, O., Ivanova, E., Goris, J., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., Poser, I., *et al.* (2010). Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Natl Cell Biol.*
- Schorderet-Slatkine, S., and Drury, K.C. (1973). Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differentiation* 2, 247-254.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Du, H., Jang, C.Y., Yates, J.R., 3rd, and Fang, G. (2008a). Plk1- and beta-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. *J Cell Biol* 181, 65-78.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008b). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320, 1655-1658.
- Shrestha, R.L., Conti, D., Tamura, N., Braun, D., Ramalingam, R.A., Cieslinski, K., Ries, J., and Draviam, V.M. (2017). Aurora-B kinase pathway controls the lateral to end-on conversion of kinetochore-microtubule attachments in human cells. *Nature communications* 8, 150.
- Slupe, A.M., Merrill, R.A., and Strack, S. (2011). Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme research* 2011, 398751.
- Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3, 13-27.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936.
- Sumiyoshi, E., Sugimoto, A., and Yamamoto, M. (2002). Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci* 115, 1403-1410.
- Swingle, M., Ni, L., and Honkanen, R.E. (2007). Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol* 365, 23-38.
- 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, 508-513.
- Takeda, N., Kon, Y., Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Barreau, C., Koizumi, O., Kishimoto, T., Tachibana, K., Houlston, E., and Deguchi, R. (2018). Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones. *Development* 145.
- Talarek, N., Cameroni, E., Jaquenoud, M., Luo, X., Bontron, S., Lippman, S., Devgan, G., Snyder, M., Broach, J.R., and De Virgilio, C. (2010). Initiation of the TORC1-regulated G0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway. *Mol Cell* 38, 345-355.

- Tang, W., Qiju Wu, J., Guo, Y., Hansen, D.V., Perry, J.A., Freil, C.D., Nutt, L., Jackson, P.K., and Kornbluth, S.A. (2008). Cdc2 and Mos Regulate Emi2 Stability to Promote the Meiosis I-Meiosis II Transition. *Mol Biol Cell*.
- Tang, X., and Wang, Y. (2006). Pds1/Esp1-dependent and -independent sister chromatid separation in mutants defective for protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 16290-16295.
- Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N.A., Mumby, M.C., and Yu, H. (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* *10*, 575-585.
- Tang, Z.H., Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1993). Two distinct mechanisms for negative regulation of the wee1 protein kinase. *EMBO J* *12*, 3427-3436.
- Tavernier, N., Noatynska, A., Panbianco, C., Martino, L., Van Hove, L., Schwager, F., Leger, T., Gotta, M., and Pintard, L. (2015). Cdk1 phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in *C. elegans* embryos. *J Cell Biol* *208*, 661-669.
- 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*, 55-66.
- Thibier, C., Mulner, O., and Ozon, R. (1982). In vitro effects of progesterone and estradiol-17 beta on cholera-activated *Xenopus* oocyte adenylate cyclase. *Journal of Steroid Biochemistry* *17*, 191-196.
- Thomas, Y., Cirillo, L., Panbianco, C., Martino, L., Tavernier, N., Schwager, F., Van Hove, L., Joly, N., Santamaria, A., Pintard, L., *et al.* (2016). Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in *C. elegans* and Human Cells. *Cell reports* *15*, 510-518.
- Thuret, J.Y., Valay, J.G., Faye, G., and Mann, C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* *86*, 565-576.
- Tomiya, A., and Ichimura, K. (2019). Signal transduction pathways and resistance to targeted therapies in glioma. *Semin Cancer Biol* *58*, 118-129.
- Tompa, P., Szasz, C., and Buday, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* *30*, 484-489.
- Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., *et al.* (2008). Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol* *180*, 1133-1147.
- Tung, J.J., Hansen, D.V., Ban, K.H., Loktev, A.V., Summers, M.K., Adler, J.R., 3rd, and Jackson, P.K. (2005). A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Ueki, Y., Kruse, T., Weisser, M.B., Sundell, G.N., Larsen, M.S.Y., Mendez, B.L., Jenkins, N.P., Garvanska, D.H., Cressey, L., Zhang, G., *et al.* (2019). A Consensus Binding Motif for the PP4 Protein Phosphatase. *Mol Cell*.
- Vigeneron, S., Robert, P., Hached, K., Sundermann, L., Charrasse, S., Labbe, J.C., Castro, A., and Lorca, T. (2016). The master Greatwall kinase, a critical regulator of mitosis and meiosis. *Int J Dev Biol* *60*, 245-254.
- Vigeneron, S., Sundermann, L., Labbe, J.C., Pintard, L., Radulescu, O., Castro, A., and Lorca, T. (2018). Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev Cell* *45*, 637-650 e637.

- Villoria, M.T., Gutierrez-Escribano, P., Alonso-Rodriguez, E., Ramos, F., Merino, E., Campos, A., Montoya, A., Kramer, H., Aragon, L., and Clemente-Blanco, A. (2019). PP4 phosphatase cooperates in recombinational DNA repair by enhancing double-strand break end resection. *Nucleic Acids Res.*
- Virsolvly-Vergine, A., Leray, H., Kuroki, S., Lupo, B., Dufour, M., and Bataille, D. (1992). Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: purification and partial characterization from ovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 6629-6633.
- Voets, E., and Wolthuis, R.M. (2010). MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle* *9*.
- Von Stetina, J.R., Tranguch, S., Dey, S.K., Lee, L.A., Cha, B., and Drummond-Barbosa, D. (2008). α -Endosulfine is a conserved protein required for oocyte meiotic maturation in *Drosophila*. *Development*.
- Walaas, S.I., Aswad, D.W., and Greengard, P. (1983). A dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* *301*, 69-71.
- Walter, S.A., Guadagno, T.M., and Ferrell, J.E. (1997). Induction of a G(2)-phase arrest in *Xenopus* egg extracts by activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* *8*, 2157-2169.
- Wang, J., Cao, W.L., and Liu, X.J. (2006). Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. *Cell Cycle* *5*, 213-217.
- Wang, J., and Liu, X.J. (2004). Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J Cell Sci* *117*, 5107-5116.
- Wang, R., Jung, S.Y., Wu, C.F., Qin, J., Kobayashi, R., Gallick, G.E., and Kuang, J. (2010). Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 19885-19890.
- Wang, X., Bajaj, R., Bollen, M., Peti, W., and Page, R. (2016). Expanding the PP2A Interactome by Defining a B56-Specific SLiM. *Structure* *24*, 2174-2181.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* *81*, 323-330.
- Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J.R., 3rd, Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* *38*, 383-392.
- Whitmire, E., Khan, B., and Coue, M. (2002). Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes. *Nature* *419*, 722-725.
- Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P.N., and Rogister, B. (2018). The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell division* *13*, 7.
- Williams, B.C., Filter, J.J., Blake-Hodek, K.A., Wadzinski, B.E., Fuda, N.J., Shalloway, D., and Goldberg, M.L. (2014). Greatwall-phosphorylated Endosulfine is both an inhibitor and a substrate of PP2A-B55 heterotrimers. *eLife* *3*, e01695.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* *293*, 321-331.

- Wu, J.Q., Guo, J.Y., Tang, W., Yang, C.S., Freel, C.D., Chen, C., Nairn, A.C., and Kornbluth, S. (2009). PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Natl Cell Biol* 11, 644-651.
- Wu, J.Q., Hansen, D.V., Guo, Y., Wang, M.Z., Tang, W., Freel, C.D., Tung, J.J., Jackson, P.K., and Kornbluth, S. (2007). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Wurzenberger, C., and Gerlich, D.W. (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 469-482.
- Xu, P., Raetz, E.A., Kitagawa, M., Virshup, D.M., and Lee, S.H. (2013). BUBR1 recruits PP2A via the B56 family of targeting subunits to promote chromosome congression. *Biology open* 2, 479-486.
- Xu, Y., Chen, Y., Zhang, P., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2008). Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol Cell* 31, 873-885.
- Yamano, H. (2019). APC/C: current understanding and future perspectives. *F1000Research* 8.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J* 18, 2174-2183.
- Yuan, K., and O'Farrell, P.H. (2015). Cyclin B3 is a mitotic cyclin that promotes the metaphase-anaphase transition. *Curr Biol* 25, 811-816.
- Yudkovsky, Y., Shteinberg, M., Listovsky, T., Brandeis, M., and Hershko, A. (2000). Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 299-304.
- Zeng, K., Bastos, R.N., Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2010). Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol* 191, 1315-1332.
- Zhang, S., Chang, L., Alfieri, C., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M., and Barford, D. (2016). Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* 533, 260-264.
- Zhao, Y., Haccard, O., Wang, R., Yu, J., Kuang, J., Jesus, C., and Goldberg, M.L. (2008). Roles of greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* 19, 1317-1327.