UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
École Doctorale Biologie–Santé

N° d'ordre : 40458

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Présentée et soutenue publiquement par

Rémy BEAUJOIS

Le 17 décembre 2010

MOTIFS DE RÉGULATION ET DYNAMIQUE DE LA VOIE MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE LORS DE LA TRANSITION G2/M DES OVOCYTES DE XÉNOPE

Devant la commission d'examen :

Président	**Professeur Annick PIERCE**
Rapporteurs	**Docteur Georges BAFFET** **Docteur Marie-Hélène VERLHAC**
Examinateurs	**Docteur Franck CHESNEL** **Docteur Bernard VANDENBUNDER**
Directeur de thèse	**Professeur Jean-François BODART**

EA4479, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division
Université Lille I Sciences et Technologies – UFR de biologie - Bâtiment SN3
Avenue Paul Langevin 59655 Villeneuve d'ascq Cedex

RÉSUMÉ

MOTIFS DE RÉGULATION ET DYNAMIQUE DE LA VOIE MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE LORS DE LA TRANSITION G2/M DES OVOCYTES DE XÉNOPE

Au cours de la transition G2/M des ovocytes de Xénope, l'activation de la voie de signalisation p39Mos-MEK1-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) présente des propriétés dynamiques et physiques particulières telles que l'ultrasensibilité, la bistabilité, l'irréversibilité et un caractère tout-ou-rien. L'objectif de cette thèse s'est focalisé sur le rôle de l'oncoprotéine p39Mos et le recrutement des motifs de régulation qui permettent l'apparition de ces propriétés.

Des approches expérimentales et *in silico* ont été menées pour réaliser une modélisation physiquement et biologiquement réaliste de ce réseau. Cette démarche a été faite en étroite collaboration avec R. Blossey (IRI, CNRS USR3078) et M. Lefranc (PhLAM, Université Lille 1). Nous avons développé un modèle qui tient compte de l'influence du MPF sur l'accumulation de p39Mos, et ajuste le rôle de la boucle de rétrocontrôle positif. Des résultats inédits ont été observés quant à l'évolution temporelle de p39Mos après stimulation des ovocytes par la progestérone en présence d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. Nos observations soulignent l'importance de l'activation et du profil temporel du MPF dans l'accumulation de p39Mos. Sur de longues périodes de culture, soit 48 heures après l'entrée en phase M des ovocytes, nous avons pu mettre en évidence que la protéine p90Rsk, cible des MAPK, est dégradée. En corrélation avec un effondrement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et la disparition de p90Rsk, un fragment d'environ 37 kDa est détecté.

Afin de déterminer le rôle de p39Mos dans l'établissement des propriétés physiques de la voie MAPK, plusieurs conditions expérimentales ont été testées. En nous appuyant sur des observations antérieures, un chélateur du zinc, la 1,10-Phénanthroline monohydrate (1,10-PA), a été utilisé pour activer les MAPK en absence de p39Mos. Nos résultats montrent que la 1,10-PA induit une activité MAPK non négligeable, supérieure à celle mesurée dans les ovocytes contrôles traités par la progestérone, et ce même si les MAPK ne sont pas totalement recrutées. Cette activation est indépendante des MAP3K, de p39Mos et de Raf1. En outre, la 1,10-PA bloque l'expression hétérologue d'une sonde fluorescente de type GFP rendue membranaire, et d'un récepteur chimère de type tyrosine kinase (PDGFR-FGFR1). L'action de la 1,10-PA est donc exercée en absence de synthèse protéique et de toute boucle de rétrocontrôle positif. Dans ces conditions, nous avons observé que l'activation des MAPK est graduelle et ultrasensible. La perte du caractère tout-ou-rien de la réponse MAPK peut être attribuée à l'absence de p39Mos et de rétrocontrôle. Nous avons émis l'hypothèse que l'action de la 1,10-PA soit dépendante de l'inactivation d'une MEK-phosphatase. Dans ce contexte, un modèle de pro-action (feed-forward loop) peut être discuté et des inhibiteurs de sérine/thréonine et de tyrosine-phosphatases ont été utilisés pour activer les MAPK en absence de p39Mos.

Nos résultats discutent du rôle attribué à la boucle de rétroaction positive dans l'activation des MAPK, et montrent que l'ultrasensibilité de cette réponse peut être générée par des motifs de régulation de type pro-action.

SUMMARY

REGULATION MOTIFS AND DYNAMIC OF MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADE DURING XENOPUE LAEVIS OOCYTES G2/M TRANSITION

During G2/M transition in *Xenopus* oocyte, activation of p39Mos-MEK1-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) signaling pathway harbors specific dynamic and physical properties, such as ultrasensibilty, bistability, irreversibility, and all-or-none response. The objective of this Ph.D work was focused onto p39Mos oncoprotein and regulation motifs recruitment enabling together the generation of such properties.

Both experimental and *in silico* approaches were undertaken in order to yield a model, physically and biologically relevant for this network. This strategy was implemented in close collaboration with R. Blossey (IRI, CNRS USR3078) and M. Lefranc (PhLAM, Université Lille 1). We developed a model that takes into account the influence of MPF onto p39Mos accumulation, and adjusts the role of the positive feedback loop. Novel and original results were generated concerning p39Mos temporal evolution following progesterone stimulation of oocytes in presence of U0126, a MEK inhibitor. Our observations underline the major role of MPF activation and temporal pattern for p39Mos accumulation. We were able to show for instance that for long culture period, *i.e*. 48 hours after M phase entry, p90Rsk, target of MAPK, was degraded. Simultaneously to p39Mos-MEK1-MAPK pathway breakdown and p90Rsk degradation, a 37 kDa protein fragment is detected.

In order to assess p39Mos role onto MAPK physical properties implementation, this signaling pathway was activated through several experimental conditions. Based on previous observations, a zinc chelator, 1,10-Phenanthroline monohydrate (1,10-PA), was used for MAPK activation in the absence of p39Mos. Our results show that 1,10-PA is able to raise a non negligible MAPK activity, superior to the one obtained for control oocytes treated by progesterone, even though the whole pool of MAPK is not recruited. This activation is MAPKKK p39Mos- and Raf1-independent. In addition, 1,10-PA results in blockade of heterologous expression of either membrane anchored GFP or chimera tyrosine kinase receptor (PDGFR-FGFR1). 1,10-PA action is then exerted in the absence of protein synthesis and positive feedback loop. We observed that MAPK activation is then gradual and ultrasensitive. The loss of MAPK all-or-none response could be attributed to the absence of p39Mos and positive feedback loop. We hypothesized that 1,10-PA action is MEK-phosphatase dependent. In this context, a feed forward loop model can be envisaged, and sérine/threonine and tyrosine-phosphatase inhibitors were used for MAPK activation in the absence of p39Mos.

Our results confront the role attributed to the positive feedback loop in MAPK activation, and show that this ultrasensitive response can be generated *in vivo* through feed forward regulation motifs.

CADRE DU TRAVAIL, COLLABORATION ET FINANCEMENT

Cette thèse a été réalisée à l'Université de Lille 1, Sciences et Technologies, au sein de l'EA4479, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division dirigé par le Professeur Jean-François Bodart. L'EA4479 s'intéresse à l'étude des mécanismes moléculaires et physiologiques de la transition G2/M des ovocytes de *Xenopus laevis*. L'ovocyte de Xénope est un paradigme pour l'étude des voies de signalisation et de transduction de signaux mitogènes, qu'elles soient stimulées par une hormone, la progestérone ou l'insuline, ou un facteur de croissance, l'IGF1. L'activation des voies Ras-Raf1-MEK1-MAPK ou p39Mos-MEK1-MAPK y est étudiée dans le contexte de la reprise méiotique et des processus associés, tels que la rupture de l'enveloppe nucléaire, la morphogenèse du fuseau de division ou l'établissement d'une activité cytostatique.

Initialement sous la co-tutelle des Professeurs Jean-Pierre Vilain et Jean-François Bodart, mes travaux de recherche sont dirigés par le Professeur Jean-François Bodart depuis septembre 2008. Pendant ces trois années, j'ai bénéficié d'une allocation de recherche ministérielle ainsi que d'un poste de moniteur de l'enseignement supérieur. Depuis mon arrivée au laboratoire en qualité d'étudiant en Master Recherche (septembre 2006), le Professeur Jean-François Bodart a entrepris une étude qui vise à mieux comprendre le rôle de chacun des membres de la voie p39Mos-MEK1-MAPK dans la dynamique particulière d'activation des MAPK, et dans la mise en place des processus cellulaires associés à la reprise méiotique, telle que la formation du fuseau de division. Différentes collaborations ont permis à ce travail de bénéficier de compétences dans le domaine des mathématiques, de la bioinformatique et de la physique non-linéaire.

Collaborations :

- **Dr Ralf Blossey** et **Dr Christophe Russo** de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, CNRS USR3078, groupe Nanosystèmes Biologiques ; Villeneuve d'Ascq, France). Christophe Russo a été recruté en thèse en 2006 à l'aide d'un financement INCa (Institut National du Cancer) appuyant les sujets mêlant biologie et bioinformatique.

- **Dr Marc Lefranc** du Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM, unité mixte de recherche de l'Université de Lille 1 et du CNRS UMR 8523 ; Villeneuve dAscq, France).

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci au ***Dr Marie-Hélène VERLHAC*** *et au* ***Dr Georges BAFFET*** *d'examiner ce travail en tant que rapporteurs. Merci au* ***Dr Franck CHESNEL*** *et au* ***Dr Bernard VANDENBUNDER*** *de siéger dans ce jury en qualité d'examinateurs. Enfin, merci au* ***Pr Annick PIERCE*** *de présider ce jury.*

***

Cette thèse de doctorat repose sur 4 piliers sans lesquels je n'aurais su m'élever à ce niveau d'étude : les collègues, la famille, les amis et les coéquipiers sportifs. À l'image de tout édifice, cet humble travail a été érigé suivant des périodes d'efforts, de doutes, de joies et de peines…mais toujours en votre compagnie et avec votre soutien. Pour cela, je vous remercie et, d'en l'espoir de n'oublier personne, je vais m'efforcer de tous vous citer.

Sur le plan professionnel, mes collègues ont été le pilier fondateur de cette thèse. ***Jean-François****, tu es le géomètre de ce travail et pour la première fois je te tutoie. C'est ma façon de te remercier, de m'émanciper et de marquer le rapport particulier, voire indéfinissable, que nous avons eu pendant ces quatre années : du Mastère, où tu m'as pris sous ton aile, à cette thèse que je vais bientôt soutenir grâce à tes conseils. Tu m'as donné bien des surnoms et tu m'as défini par bien des qualificatifs, le(s)quel(s) garderas-tu en mémoire ?* ***Jean-Pierre****, vous avez été mon tout premier enseignant de cours magistral quand j'ai commencé le DEUG en 2002 puis, en septembre 2006, vous m'avez accueilli dans votre laboratoire. Au cours de mon cursus, vous m'avez encouragé à montrer que dans cette population d'étudiants, certains aiment l'embryologie et veulent réussir. Je vous remercie et je vous souhaite une agréable retraite.* ***Matthieu****, tu es arrivé en même temps que moi au laboratoire et nos relations sont rapidement devenues amicales. Merci pour ta sympathie, ta patience et ton aide tout au long de cette thèse.* ***Arlette****, tu es le prototype de la mère universelle. Simplement, merci d'être là. Je remercie également* ***Édith et Katia****, le "duo de choc", pour nos discussions, votre aide et vos conseils scientifiques tant sur le plan pratique que théorique.* ***Franck****, merci pour ton volontariat, ta ténacité, et ta contribution à mes manips.* ***Anne-Frédérique****, merci pour tes questions pertinentes lors de mes présentations. Merci également d'entretenir ma silhouette avec tous ces gâteaux et bonbons qui me régalent et font grimper ma glycémie. Bienvenue à* ***François*** *et* ***Pauline****, puissiez vous réaliser une thèse brillante. Merci encore à* ***Valérie****, notre force administrative, et à* ***Chantal****,* ***Vanessa****,* ***Thavy*** *et* ***Julie*** *pour votre soutien et notre amitié. Enfin merci à* ***Evangelos****,* ***Sophie****,* ***Djamila****,* ***Alexandre*** *et* ***Théophile****, les stagiaires qui ont travaillé à mes côtés et m'ont permis de réaliser mes premiers encadrements. Je vous remercie pour votre enthousiasme et pour m'avoir suivi dans des manips parfois répétitives.*

Mes remerciements vont également aux collègues de l'IRI et du PhLAM. ***Ralf****,* ***Christophe*** *et* ***Marc****, j'espère que ce travail fera honneur à notre collaboration.* ***Laurent****,* ***Corentin****,* ***Dorothée****,* ***Inès****,* ***Laurence*** *et* ***Sonia****, que dire sinon merci pour votre sympathie, votre appui technique et administratif.*

*Enfin, merci à **Christophe** et **Robert-Alain** d'être toujours prêt à répondre à mes questions et à me dépanner en cas de besoin ; et un grand merci aux membres du laboratoire d'Ecotox, **Alain**, **Céline**, **Sébastien**, **Claude**, **Sylvain**, **Franck**, **Fabien** et **Patrick** de m'accompagner tous les midis et surtout de m'apprendre à 'cruciverb-inventer' des mots qui existent.*

*Sur le plan personnel, je commencerai par remercier ma famille. **Papa**, **Maman**, **Peggy**, **Nicolas**, **Olivier**, vous êtes le pilier, l'assise et le ciment de ce travail. Je ne le vous rends pas à la hauteur de votre mérite mais sachez que bien souvent je pense à vous et je me félicite d'être votre fils ou votre frangin. La famille s'est agrandie depuis quelques années. **Manon**, **Marine** et **Lucas**, bien que vous ayez encore le temps, j'espère que vous trouverez votre voie. Profitez de cette douce innocence qui fait de vous une filleule, une nièce et un neveu adorables. **Yvonne** et **Jacky**, merci d'être là. Vous contribuez à notre épanouissement à tous.*

***Flore**, un an et déjà beaucoup d'épreuves endurées. Je ne peux que m'attacher à cette gentillesse, cette douceur et cette générosité qui te caractérisent. Tu m'attendris par tes attentions, ta patience et ton soutien sans faille quand les nuits de travail se font longues. À ta manière tu as contribué à l'édification de cette thèse et je compte bien te le rendre le plus longtemps possible. Je tiens également à remercier ta famille, et tout particulièrement **Véronique** et **Frédéric**. Vous m'accueillez et vous m'ouvrez d'ores et déjà la porte de chez vous comme le fait une famille. J'ai à cœur de vous retourner l'aide et la joie que vous me procurez.*

*Je remercie chaleureusement **Sophie**, **Catherine**, **Francis** et **Audrey**. Votre bienveillance à mon égard a été très précieuse dans les moments difficiles de mon Mastère et de mes premières années de Doctorat.*

*Les deux derniers piliers de cette thèse sont mes amis et mes coéquipiers sportifs. Je vous connais tous depuis de nombreuses années et vous êtes la clef de voûte de tous ces bons moments passés en dehors du laboratoire. Je ne peux malheureusement pas tous vous citer mais je suis sûr que vous comprendrez. **Aurélie**, **Romain** (alias binôme), **Gaylord**, **Yoann**, **Nicolas**, **Émeric** et tous les autres, merci pour nos sorties, nos voyages, nos franches rigolades et le partage de nos expériences personnelles.*

*La pratique du Volley-Ball m'a permis de me lier d'amitié avec de nombreuses personnes. Je remercie tous mes coéquipiers de l'ASP-Lille1, du VBBV et plus récemment du Volley Club de Wasquehal. Merci à **François**, **Matthieu**, **Hervé**, **Jocelyn**, **Jacopo**, **Sophie**, **Aurélien** et tous les autres pour notre complicité sur le terrain et en dehors. Je remercie enfin l'association BioAddoct et le SUAPS-Lille1, particulièrement **Sophie**, **Jean-Marie** et **Fabrice**, de m'avoir permis de participer à la vie sportive de Lille1 pendant de nombreuses années, et de m'avoir soutenu dans l'organisation de trois tournois de Volley-Ball entre décembre 2009 et mai 2010.*

***

*I finally want to thank **Michal**, **Radko**, **Marketa**, **Hana** and **Petra** from Czech Republic. Since 2006, we developed a sincere friendly relationship which allowed me to visit you many times in Prague and Brno. "Děkuji" for our linking, I wish you all the best.*

TABLE DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES 7

LISTE DES FIGURES 14

LISTE DES TABEAUX 16

CONVENTIONS DE REPRÉSENTATION 17

ABRÉVIATIONS 18

AVANT-PROPOS 20

INTRODUCTION 21

PARTIE I : LE CYCLE CELLULAIRE 22

1. Les différentes phases du cycle cellulaire 22
2. Les points de contrôle du cycle cellulaire 22
3. La mitose 24
4. La méiose, une double division 24

PARTIE II : L'OVOCYTE DE *XENOPUS LAEVIS* *27*

1. Présentation du modèle animal et cellulaire 27
1.1. *Xenopus laevis,* le dactylètre du Cap 27
1.2. L'ovocyte de Xénope : un modèle de gamète femelle 27
1.2.1 Classification ovocytaire *27*
1.2.2 Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI *28*
1.2.3. Propriétés physiologiques des ovocytes de Xénope *30*
2. L'ovogenèse chez le Xénope 30
2.1. Généralités 30
2.2. La vitellogenèse 32
2.3. Activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse 33
2.3.1 Synthèse des ARN ribosomaux *33*
2.3.2. Synthèse des ARNm maternels *33*
2.4. Formation de l'enveloppe vitelline 33
2.5. Migration des granules corticaux 33

PARTIE III : LA REPRISE MÉIOTIQUE DES OVOCYTES DE XÉNOPE

34

1. Stimulation de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **34**

1.1. Les hormones stéroïdes **34**

1.1.1. La progestérone *34*

1.1.2. Les autres hormones stéroïdes *34*

1.2. Les récepteurs aux stéroïdes **34**

1.2.1. Un récepteur membranaire à la progestérone *34*

1.2.2. Identification du récepteur à la progestérone *36*

1.3. Les facteurs de croissance **37**

1.3.1. L'insuline et l'IGF1 *37*

1.3.2. Les autres facteurs de croissance *37*

2. Événements cytologiques et bases moléculaires de la reprise méiotique **37**

2.1. Rupture de l'enveloppe nucléaire : GVBD **37**

2.2. Morphogénèse du fuseau méiotique **39**

2.2.1. Structure du fuseau *39*

2.2.3. Morphogenèse acentriolaire du fuseau de division méiotique **39**

3. Évènements précoces de la reprise méiotique **41**

3.1. Diminution de l'AMPc et inhibition de la PKA **41**

3.1.1. Régulation du taux d'AMPc par les protéines G hétérotrimériques *43*

3.*1.2. Rôle de l'AMPc et de la PKA dans la reprise méiotiqu*e 43

3.2. Hydrolyse des lipides membranaires **44**

3.2.1. La Phospholipase C (PLC) *44*

3.2.2. Les Protéines Kinases C (PKC) *46*

3.2.3. La Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) *46*

3.3. Cas spécifique d'une stimulation par l'insuline ou l'IGF1 **47**

4. Contrôle de la traduction par la polyadénylation cytoplasmique **50**

4.1. La synthèse protéique est nécessaire à la reprise méiotique **50**

4.2. Formation et régulation du complexe de polyadénylation **51**

4.3. Régulation temporelle de la polyadénylation **53**

4.3.1. *Polyadénylation précoce des ARNm de classe I* *53*

4.3.2. *Polyadénylation tardive des ARNm de classe II* *55*

5. Le MPF : M-phase Promoting Factor **57**

5.1. Nature moléculaire du MPF **58**

5.1.1. p34Cdc2/Cdc2/Cdk1 (34 kDa) *58*

5.1.2. Cycline B (45 kDa) *58*

5.2. Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique 60
5.3. Mécanismes de régulation du MPF lors de la reprise méiotique 61
5.3.1. Régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation 61
5.3.1.1. CAK 61
5.3.1.2. Myt1 62
5.3.1.3. Wee1 62
5.3.1.4. Cdc25C 62
5.3.2. Régulation du MPF par la PKA 66
5.3.3. Régulation du MPF par la synthèse et la dégradation des Cyclines 66
5.3.3.1. Synthèse de la Cycline B 66
5.3.3.2. Dégradation de la Cycline B 68
5.3.4. Les protéines associées à Cdc2 69
5.3.4.1. Xe-p9 69
5.3.4.2. Ringo/Speedy 69
5.3.5. La boucle d'autoamplification du MPF 70
5.4. Les principales cibles du MPF lors de la reprise méiotique 72
5.4.1. La CPEB 72
5.4.2. Le facteur d'élongation EF1 73
5.4.3. Les Lamines 73
5.4.4. Les Histones 73
5.4.5. Les MAP 73
6. Les voies MAPK 74
6.1. Généralités 74
6.1.1. Les différentes voies MAPK 74
6.1.2. La voie MAPK/Erk dans l'ovocyte de Xénope 76
6.2. Les membres de la voie MAPK identifiés dans l'ovocyte de Xénope 76
6.2.1. Les MAPKKK/MAP3K/MEKK 76
6.2.1.1. Raf1 (70-74 kDa) 76
6.2.1.2. p39Mos (39 kDa) 78
α. *Généralités 78*
β. *Mécanismes de régulation de la synthèse de p39Mos 79*
γ. Mécanismes de régulation post-traductionnelle de p39Mos 80
δ. Les partenaires régulateurs de p39Mos 83
6.2.2. La MAPKK/MAP2K/MEK1 (44kDa) 83
6.2.3. Les MAPK 84
6.2.3.1. MAPK/Xp42Mpk1/Erk2 (42 kDa) 84
6.2.3.2. MAPK/JNK (40 et 49 kDa) 85

6.2.3.3. MAPK/p38MAPK (38 kDa) *85*
6.2.4. La principale MAPKAPK/p90Rsk (90 kDa) **85**
6.2.5. Les Phosphatases **86**
6.2.5.1. Les MAPK-Phosphatases ou MKP *86*
6.2.5.2. Les phosphatases non-spécifiques des MAPK *87*
6.3. Rôles physiologiques de la voie MAPK dans le modèle ovocytaire **88**
6.3.1. Rôle des MAPK dans l'entrée en phase M **88**
6.3.1.1. Activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et GVBD *88*
6.3.1.2. Inhibition de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et GVBD *88*
6.3.1.3. Autres voies MAPK et GVBD *90*
6.3.2. Rôle des MAPK dans la morphogénèse du fuseau de division **90**
6.3.2.1. Chez les Mammifères *90*
6.3.2.2. Chez les Batraciens *91*
6.3.3. Rôle des MAPK dans le contrôle de l'assemblage du fuseau **92**
6.3.4. Rôle des MAPK dans la suppression de la phase S **92**
6.3.5. Rôle des MAPK dans l'activité cytostatique **93**
6.3.5.1. Implication de la voie MAPK dans l'activité CSF *94*
6.3.5.2. La voie MAPK stabilise l'activité MPF en inhibant la dégradation des Cyclines *94*
6.3.5.3. MAPK, calcium et activité cytostatique *94*
6.3.5.4. Rôle de XErp1/Emi2 dans l'activité du CSF *95*
6.3.6. Rôle des MAPK dans l'apoptose **95**

PARTIE IV : DYNAMIQUE D'ACTIVATION DES MAPK LORS DE LA TRANSITION G2/M DES OVOCYTES DE XÉNOPE **97**

1. Interconnections et motifs de régulation des voies p39Mos-MEK1-MAPK et Plx1-Cdc25C-MPF **97**
1.1. Motifs de régulation intra-cascades **97**
1.1.1. Régulations au sein de la voie Plx1-Cdc25C-MPF *97*
1.1.2. Régulations au sein de la voie p39Mos-MEK1-MAPK *98*
1.2. Interconnections **100**
1.2.1. Rétrocontrôle positif : renforcement de la voie Plx1-Cdc25C-MPF par la voie p39Mos-MEK1-MAPK *100*
1.2.2. Rétrocontrôle positif : renforcement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK par la voie Plx1-Cdc25C-MPF *100*

1.3. Propriétés d'activation des MAPK lors de la reprise méiotique 100
1.3.1. Ultrasensibilité et coopérativité 101
1.3.1.1. Coopérativité et coefficient de Hill 101
1.3.1.2. Ultrasensibilité de la voie p39Mos-MEK1-MAPK 102
1.3.2. Bistabilité et réponse tout-ou-rien des MAPK 103
1.3.3. Irréversibilité de réponse des MAPK 105
1.3.4. Robustesse et redondance du réseau p39Mos-MEK1-MAPK 106
1.4. Dynamique d'activation des MAPK et réponse cellulaire 107
2. Approche modulaire des voies de signalisation 108
2.1. Généralités sur les notions de modules et de modularité 108
2.2. Modularité et cascade MAPK 109
2.3. Exemple d'approche modulaire impliquant le réseau MAPK dans la morphogenèse du fuseau de division méiotique des ovocytes de Batraciens 110

OBJECTIFS 112

RÉSULTATS 114

PARTIE I : MODÉLISATION DU RÉSEAU DE RÉGULATION DE LA VOIE P39MOS-MEK1-MAPK 115

1. Modélisation du réseau de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK 115
1.1. Approche bibliographique : vers une simplification du modèle 115
1.2. Présentation du modèle de prédiction et de sa nomenclature 117
1.2.1. Présentation du modèle et de sa nomenclature 117
1.2.2. Définitions des paramètres et constantes 118
1.3. Paramétrisation du modèle et analyse de bifurcation 120
1.3.1. Paramétrisation du modèle 120
1.3.2. Analyse de bifurcations 120
2. Confrontation entre le modèle prédictif et l'analyse expérimentale 122
2.1. Résumé de la PUBLICATION 1 123
2.3. Résultats complémentaires 124
3. Limites temporelles du modèle de prédiction mathématique 125
3.1. Cinétique de rupture du réseau p39Mos-MEK1-MAPK 125
3.2. Identification d'un résidu de dégradation de p90Rsk 127
3.3. Tentative de purification de Ct-ΔRsk 128

4. Matériel et méthodes complémentaires **129**

4.1. Anticorps anti-Cdc6 **129**

4.2. Immunoprécipitation anti-Rsk **129**

4.3. Coloration des protéines totales **130**

- **PUBLICATION 1** **131**

  Russo C*, Beaujois R*, Bodart J-F, Blossey R (2009) Kicked by Mos and tuned by MPF—the initiation of the MAPK cascade in Xenopus oocytes. HFSP Journal 3: pp. 428-440.

PARTIE II : ACTIVATION DES MAPK EN ABSENCE DE P39MOS **132**

1. Activation ultrasensible des MAPK par la 1,10-Phénanthroline monohydrate **132**

1.1. Contexte de l'étude **132**

1.2. Résumé de la PUBLICATION 2 (en préparation) **132**

1.3. Résultats complémentaires **133**

1.3.1. p90Rsk est dégradée malgré une forte activité MAPK *133*

1.3.2. Modifications morphologiques provoquées par la 1,10-PA *134*

2. Raf1 active les MAPK selon une réponse de type graduel en absence de p39Mos **135**

3. Effet des inhibiteurs de phosphatases sur l'activation des MAPK **137**

3.1. Inhibiteurs de tyrosine-phosphatases **137**

3.1.1. bpV(phen) **137**

3.1.2. Déphostatine **139**

3.2. Inhibiteurs de sérine/thréonine-phosphatases **139**

3.2.1. Acide Okadaïque **139**

3.2.1.1. L'OA stimule la GVBD et active les MAPK *139*

3.2.1.2. Les MAPK sont activées en absence de p39Mos *142*

3.2.1.3. Rétablissement de l'activité des MAPK par l'OA *142*

3.2.2. Acide Cantharidique **144**

3.2.2.1. L'AC provoque la phosphorylation des MAPK *144*

3.2.2.2. L'AC active les MAPK en absence de p39Mos *145*

3.2.3. Cyperméthrine **146**

3.2.4. Tautomycétine et NIPP-1 **147**

4. Matériel et méthodes complémentaires **148**

4.1. Traitement des ovocytes de *Xenopus laevis* ***148***

4.1.1. Injection de Raf1 *148*

4.1.2. Inhibition de la synthèse de p39Mos *148*

4.1.3. Inhibition des protéines phosphatases *149*

4.2. Immunohistochimie **149**

- **PUBLICATION 2 (en préparation)** **150**

  "Ultrasensitive MAPK/Erk activation in absence of protein synthesis in *Xenopus* oocytes." Beaujois Rémy, Riquet Franck, Cailliau Katia, Browaeys-Poly Edith, Russo Christophe, Blossey Ralf, Vicogne Dorothée, Marin Matthieu, Vilain Jean-Pierre and Bodart Jean-François

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **151**

1. Modélisation du réseau p39Mos-MEK1-MAPK **152**

2. Activation des MAPK indépendamment de p39Mos **155**

3. Évaluation du motif de pro-boucle **159**

BIBLIOGRAPHIE **162**

ANNEXES **212**

- **PUBLICATION 3** **213**

  "Nitric Oxide (NO)-donor SNAP induces Xenopus eggs activation." Ješeta Michal, Tichovska Hana, Beaujois Rémy, Melicharova Petra, Lescuyer-Rousseau Arlette, Petr Jaroslav, Sedmikova Marketa and Bodart Jean-François

- **PUBLICATION 4** **214**

  "G2/M cell cycle transition monitoring by Zn2+ chelation in amphibian oocytes." Beaujois Rémy, Blossey Ralf, Panopoulos Evangelos,Vilain Jean-Pierre and Bodart Jean-François

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les phases du cycle cellulaire. 22

Figure 2 : Les complexes Cdk/Cyclines et les points de contrôle du cycle cellulaire. 23

Figure 3 : Représentation schématique des différentes phases de mitose. 25

Figure 4 : Représentation schématique des différentes phases de la méiose. 26

Figure 5 : Femelle *Xenopus laevis.* 27

Figure 6 : Classification ovocytaire de Dumont (1972). 28

Figure 7 : Représentation d'une coupe méridienne d'un ovocyte de stade VI. 29

Figure 8 : De l'ovogonie au zygote de *Xenopus laevis.* 31

Figure 9 : Vitellogenèse chez le Xénope. 32

Figure 10 : Stimulation de la reprise méiotique par les stéroïdes. 35

Figure 11 : Événements cytologiques associés à la reprise méiotique. 38

Figure 12 : Morphogenèse du fuseau de division lors de la reprise méiotique ovocytaire. 40

Figure 13 : Mécanismes d'activation de la PKA. 41

Figure 14 : Régulation de l'AC et de la PKA par les protéines G hétérotrimériques. 43

Figure 15 : Métabolisme des phosphoinositides et activation de la voie PI3-K lors de la reprise méiotique. 45

Figure 16 : Événements précoces lors d'une reprise méiotique stimulée par l'insuline. 49

Figure 17 : Activation de la polyadénylation cytoplasmique lors de la reprise méiotique. 52

Figure 18 : Cinétique de polyadénylation et de synthèse protéique lors de la reprise méiotique. 54

Figure 19 : Régulation de la polyadénylation des ARNm de type I et II. 56

Figure 20 : Mise en évidence du MPF par injection de cytoplasme. 57

Figure 21 : Représentation schématique de la structure des Cyclines. 59

Figure 22 : Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. 60

Figure 23 : Mécanismes de régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation. 63

Figure 24 : Mécanismes de régulation de la phosphatase Cdc25C lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. 65

Figure 25 : Mécanismes moléculaires de régulation de la transition G2/M des ovocytes de Xénope. 71

Figure 26 : Organisation en cascade des voies MAPK. 75

Figure 27 : Mécanismes de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK lors de la reprise méiotique. 77

Figure 28 : Mécanismes de régulation post-traductionnelle de l'oncoprotéine p39Mos, de MEK et des MAPK lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. 82

Figure 29 : Mise en évidence de l'activité CSF. 93

Figure 30 : Régulation de l'activité cytostatique par XErp1/Emi2 dans les ovocytes de Batraciens. 96

Figure 31 : Motifs de régulation des voies Plx1-Cdc25c-MPF et p39Mos-MEK1-MAPK. 99

Figure 32 : Influence du coefficient de Hill sur la courbe dose-réponse. 102

Figure 33 : La réponse bistable des MAPK s'oppose à la réponse de type graduel. 104

Figure 34 : Rôle de la dynamique d'activation des MAPK dans la réponse cellulaire. 107

Figure 35 : Approche modulaire de la morphogenèse du fuseau. 111

Figure 36 : Réseau de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. 119

Figure 37 : Illustration du phénomène d'hystérèse. 122

Figure 38 : Les MAPK régulent la synthèse protéique tardive. 125

Figure 39 : Rupture de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. 126

Figure 40 : Identification d'un fragment de dégradation de la MAPKAPK/p90Rsk. 128

Figure 41 : p90Rsk est dégradée en condition 1,10-PA malgré une forte activité MAPK. 134

Figure 42 : Coupe histologique d'un ovocyte incubé 72 heures dans la 1,10-PA. 135

Figure 43 : Recrutement des MAPK par Raf1 en présence ou non de p39Mos. 136

Figure 44 : Effets du bpV(phen) sur la voie MAPK. 138

Figure 45 : Effets de la Déphostatine sur la voie MAPK. 139

Figure 46 : Effets de l'Acide Okadaïque sur la voie MAPK et la reprise méiotique. 140

Figure 47 : Cinétique d'activation des MAPK par l'OA en absence de p39Mos. 141

Figure 48 : l'OA restaure l'activité des MAPK en absence de p39Mos. 143

Figure 49 : Gamme de concentrations et cinétique d'activation des MAPK par l'Acide Cantharidique. 144

Figure 50 : Effets de l'AC sur la voie MAPK et le MPF. 146

Figure 51 : Effets de la Cyperméthrine sur la voie MAPK et le MPF. 147

Figure 52 : Effets de la Tautomycétine sur la voie MAPK. 147

Figure 53 : Activation des MAPK par le recrutement d'un motif de pro-action. 160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des différents stades ovocytaires. 28

Tableau 2 : Accumulation des différentes Cyclines B dans l'ovocyte de Xénope. 67

Tableau 3 : Principales cibles du MPF. 72

Tableau 4 : Les différentes voies MAPK. 75

Tableau 5 : Effets de différents inhibiteurs sélectifs des membres de la voie MAPK sur la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. 89

Tableau 6 : Résumé des paramètres du modèle prédictif. 119

Tableau 7 : Résumé bibliographique des paramètres relatifs aux divers ARNm. 121

Tableau 8 : Résumé bibliographique des paramètres relatifs aux protéines de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et des phosphatases (PPases). 121

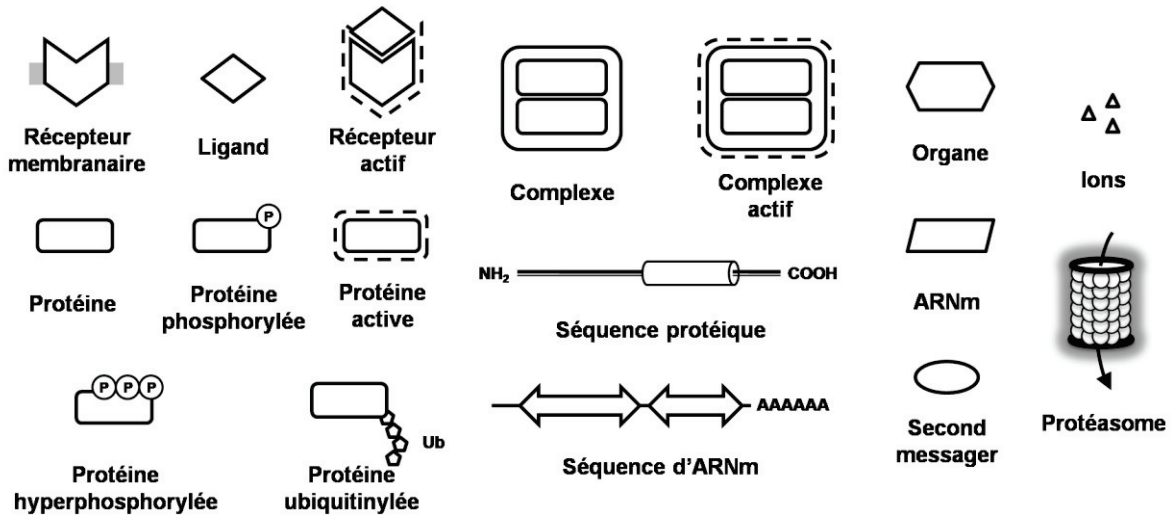
Tableau 9 : Sélection d'inhibiteurs de phosphatase. 137

Tableau 10 : Activation des MAPK par inhibition des phosphatases. 148

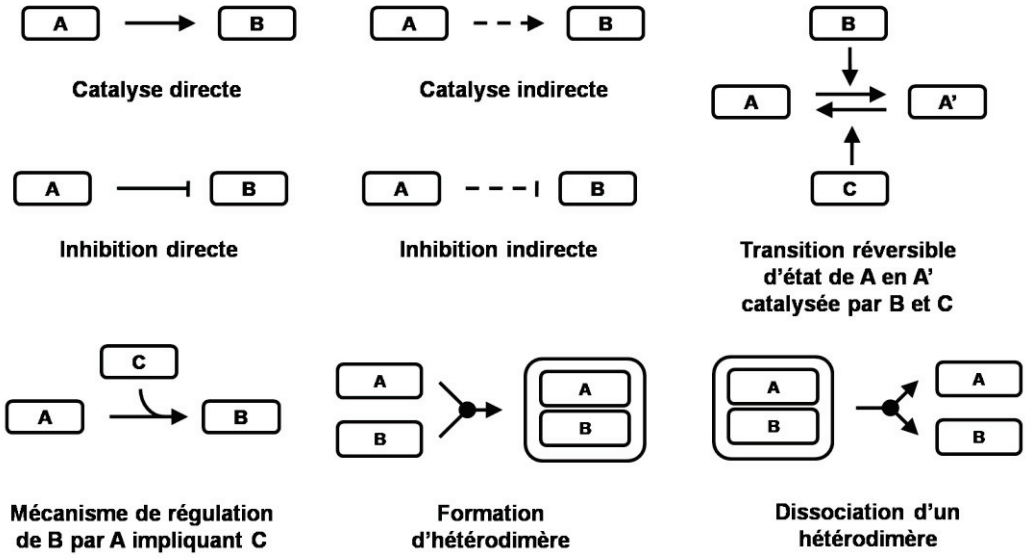
CONVENTIONS DE REPRÉSENTATION

Les conventions de représentation de certaines figures sont adaptées du logiciel CellDesigner™, Ver. 3.2, The Systems Biology Institute

Formes Basiques



Interactions Basiques



ABRÉVIATIONS

1,10-PA : 1,10-Phénanthroline monohydrate

6-DMAP : 6-Dimethylaminopurine

AC : Adénylate cyclase

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

APC/c : Anaphase Promoting Complex / cyclosome

AS-Mos : Oligonucléotides antisens *mos*

CA : Acide Cantharidique

CAK : Cdk Activating Kinase

CaMKII : Calcium/calmoduline-dependent Kinase II

Cdc : Cell division cycle

Cdk : Cyclin dependent kinase

Chk1, 2 : Checkpoint kinase 1, 2

CHX : Cycloheximide

CK2β : Caséine Kinase II beta

CKI : Cdk Inhibitor

CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Element

CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein

CPSF : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor

CSF : Cytostatic Factor

D.O. : Densité Optique

DAG : 1,2-Diacylglycérol

DMSO : DimethylSulfoxide

DSP/DUSP : Dual-Specificity Phosphatase

EGF : Epidermal Growth Factor

EIF-4A, 4E ou 4G : Eucaryotic Initiation Factor-4A, 4E ou 4G

Erk : Extracellular signal-Regulated Kinase

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : FGF-Receptor

FSH : Follicle Stimulating Hormone

GDP : Guanosine Diphosphate

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

GSK3β : Glycogène Synthetase Kinase 3β

GTP : GuanosineTriphosphate

GVBD : Germinal Vesicle Breakdown

HAT : Histone Acetyltransferase

HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor / Scattor Factor

Hsp90 : Heat Shock Protein 90

IGF1 : Insulin Growth Factor 1

IGF1R : Insulin Growth Factor 1 Receptor

IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

IRS1 : Insulin Receptor Specific 1

JNK : Jun N-terminal protein Kinase

LF : Facteur Létal de l'anthrax

LV : Lipovitelline

Mad : Mitotic arrest deficiency

MalE-Mos : Maltose-binding protein Mos fusion protein

MAP : Microtubule Associated Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKAPK : MAPK Activated Protein Kinase

MAPKK/MAP2K : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK/MAP3K : Mitogen-Activated Protein Kinase KinaseKinase

MEK/MKK : MAPK/Erk protein kinase

MIH : Maturation Inducing Hormone

MKP : MAPK Phosphatase

Mos : Moloney sarcoma

MPF : M-phase / Maturation Promoting Factor

MTOC : Microtubule Organizing Center

NGF : Nerve Growth Factor

OA : Acide Okadaïque

PABP : Poly(A) Binding Protein

PARN : Poly(A) Ribonucléase

PDE : Phosphodiestérase

PDK1 ou 2 : Phosphatidylinositol Dependent protein Kinase1 et 2

PG : Progestérone

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol 3, 4,5-triphosphate

PKA, B ou C : Protéine Kinase A, B ou C

PLC : Phospholipase C

Plkk1 : Xenopus Polo-like kinase kinase 1

Plx1 : Polo-like kinase *Xenopus* 1

PP1 : Protein Phosphatase 1

PP2A : Protein Phosphatase 2A

PPase : Protéine Phosphatase

PRE : Polyadenylation Response Element

PTP : Protein Tyrosine Phosphatase

RINGO : Rapid Inducer of G2/M progression

ROS : Reactive Oxygen Species

Rsk : Ribosomal S6 subunit protein kinase

SAPK : Stress-Activated Protein Kinase

SDS-PAGE : Sodium Deodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SH2 : Src Homology domain 2

siARN : Small interfering ARN

S-Mos : Oligonucléotides sens *mos*

SOS : Son Of Sevenless

tGVBD : Temps GVBD, ou moment de l'apparition de la tache de maturation

TMA : Transient Microtubule Array

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U0126 : U0126 ethanolate

UTR : Untranslated Region

VG : Vésicule Germinative

VTG : Vitellogénine

VTGR : Vitellogénine-Receptor

WS : White Spot

xAR : *Xenopus* Androsterone Receptor

XCdh1 : Xenopus Cadherin-1

Xe-p9 : *Xenopus* Suc1/Cks protein

XErp1/Emi2 : *Xenopus* Emi-related protein 1/Early mitotic inhibitor 2

XGld2 : *Xenopus* Germ-line development factor 2

XIRS1 : *Xenopus* Insulin Receptor Substrate 1

Xp42Mpk1 : *Xenopus* protein 42 kDa MAPK

XPR : *Xenopus* Progesterone Receptor

AVANT-PROPOS

À la frontière entre la biologie cellulaire et la biologie systémique, mon travail de doctorat se concentre sur les propriétés physiques et dynamiques de la voie de signalisation des MAPK/Erk (Mitogen Activated Protein Kinases / Extracellular regulated kinase). Nous avons développé un modèle de cascade non linéaire de la voie p39Mos-MEK1-MAPK qui rend compte de la transition G2/M des ovocytes de Xénope dans un système cellulaire particulièrement adapté à l'étude des mécanismes moléculaires.

La compréhension des actions concertées des molécules au sein du réseau dynamique que constitue la voie p39Mos-MEK1-MAPK nécessite une présentation bibliographique détaillée. Les deux premières parties de ce mémoire introduisent le cycle cellulaire et un modèle d'étude de la transition G2/M, l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Une troisième partie présente les voies et les effecteurs moléculaires responsables de l'entrée en phase M des ovocytes de Xénope. Une bonne connaissance de ces effecteurs est indispensable pour cerner la complexité du réseau de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK dans ce modèle. Une quatrième et dernière partie introductive récapitule les nombreux motifs de régulation présents dans ce réseau. Les notions de redondance et de robustesse sont abordées dans ce contexte, et les propriétés physiques et dynamiques d'activation des MAPK sont définies. Enfin, une approche modulaire du réseau est proposée quant à la morphogenèse du fuseau de division méiotique.

INTRODUCTION

PARTIE I : LE CYCLE CELLULAIRE

1. Les différentes phases du cycle cellulaire

Dans un organisme vivant, les cellules sont en majorité différenciées et ne se divisent pas. Elles sont alors dites quiescentes ou en phase G0 (Gap0). Toutefois, sous l'effet de signaux mitogènes, hormones ou facteurs de croissance, elles entrent dans le cycle cellulaire : deux cellules filles génétiquement identiques sont formées à l'issue de la division cellulaire. Le cycle cellulaire se décompose en quatre phases. Les cellules s'engagent d'abord en phase G1 (Gap1), phase de croissance et de synthèse protéique qui précède la phase S de réplication du matériel génétique par un mécanisme semi-conservatif. La phase S est suivie de la phase G2 (Gap2), deuxième phase de croissance qui prépare la phase M (Mitose) de division proprement dite. L'ensemble des phases G1, S et G2 constituent l'interphase **(Figure 1)**.

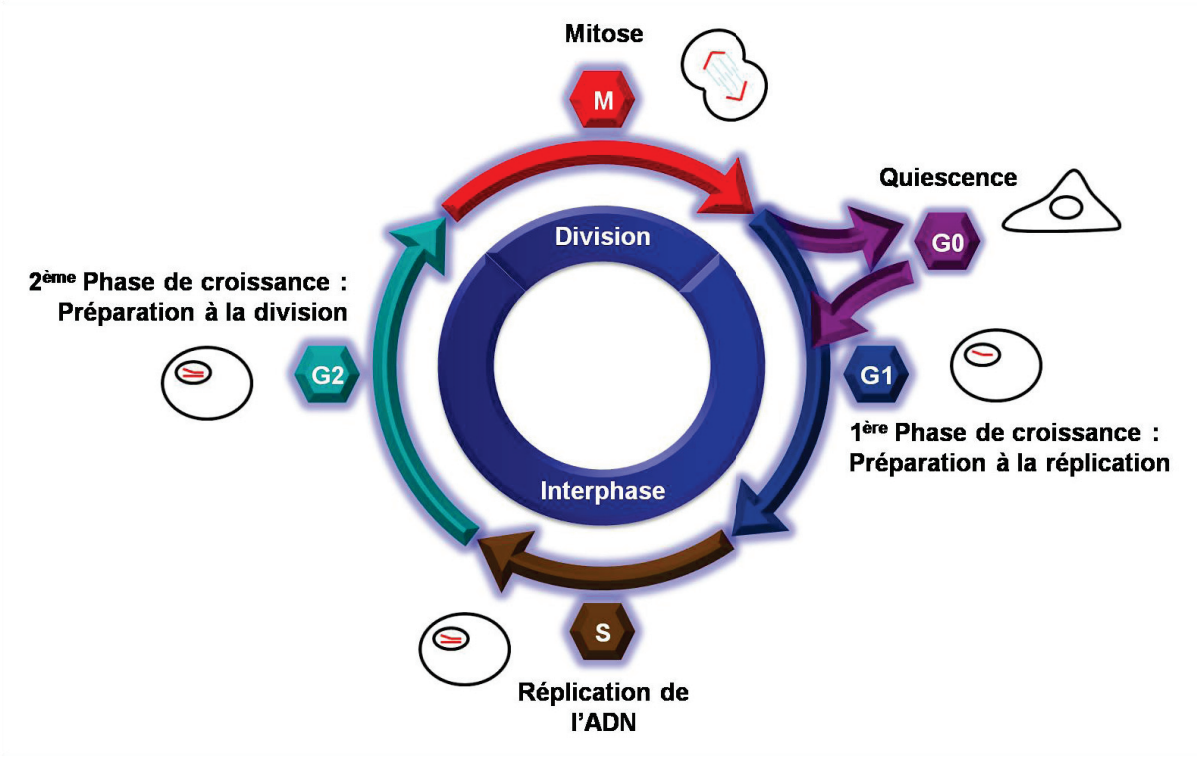


Figure 1 : Les phases du cycle cellulaire. Sous l'effet des signaux mitogènes, une cellule quiescente (G0), entre dans le cycle de division cellulaire. Celui-ci se divise en deux grandes phases : l'interphase (G1, S, G2) et la mitose (M).

2. Les points de contrôle du cycle cellulaire

La progression dans le cycle cellulaire est régulée par le franchissement de différents points de contrôle ou « checkpoints » lors des transitions G1/S, G2/M et métaphase-anaphase **(Figure 2)**. En effet, différents mécanismes de surveillance sont mis en place pour détecter d'éventuels dommages à l'ADN (DNA Damage CheckPoint), pour s'assurer que la cellule ne

se divise pas tant que la réplication n'est pas achevée (Replication Checkpoint) ou encore pour s'assurer que les chromosomes sont bien appariés et ancrés au fuseau de division lors de la métaphase (Spindle Assembly CheckPoint). Ces systèmes sont responsables du maintien de l'intégrité du génome dans les deux cellules filles. En cas d'anomalie non réparable, la cellule évolue vers l'apoptose.

Le contrôle biologique du cycle cellulaire a fait l'objet de travaux récompensés par un prix Nobel de médecine en 2001 (Leland Hartwell, Tim Hunt et Paul Nurse). Le déclenchement, la progression et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle sont sous le contrôle de complexes de type Cdk/Cycline (Cyclin dependent kinase) spécifiques de chaque phase et dont l'activité varie au cours du cycle cellulaire. Leur activité est principalement régulée par : (i) une alternance entre la synthèse et la dégradation des Cyclines, les sous-unités régulatrices de ces complexes, (ii) une interaction entre les Cdk et les CKI (Cdk Inhibitor) et (iii) des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation des Cdk. Lorsqu'une anomalie est détectée, les éléments régulateurs des points de contrôle modulent l'activité des complexes Cdk/Cycline pour stopper la progression du cycle et déclencher des processus de réparation ou de mort par apoptose si les dommages sont trop importants.

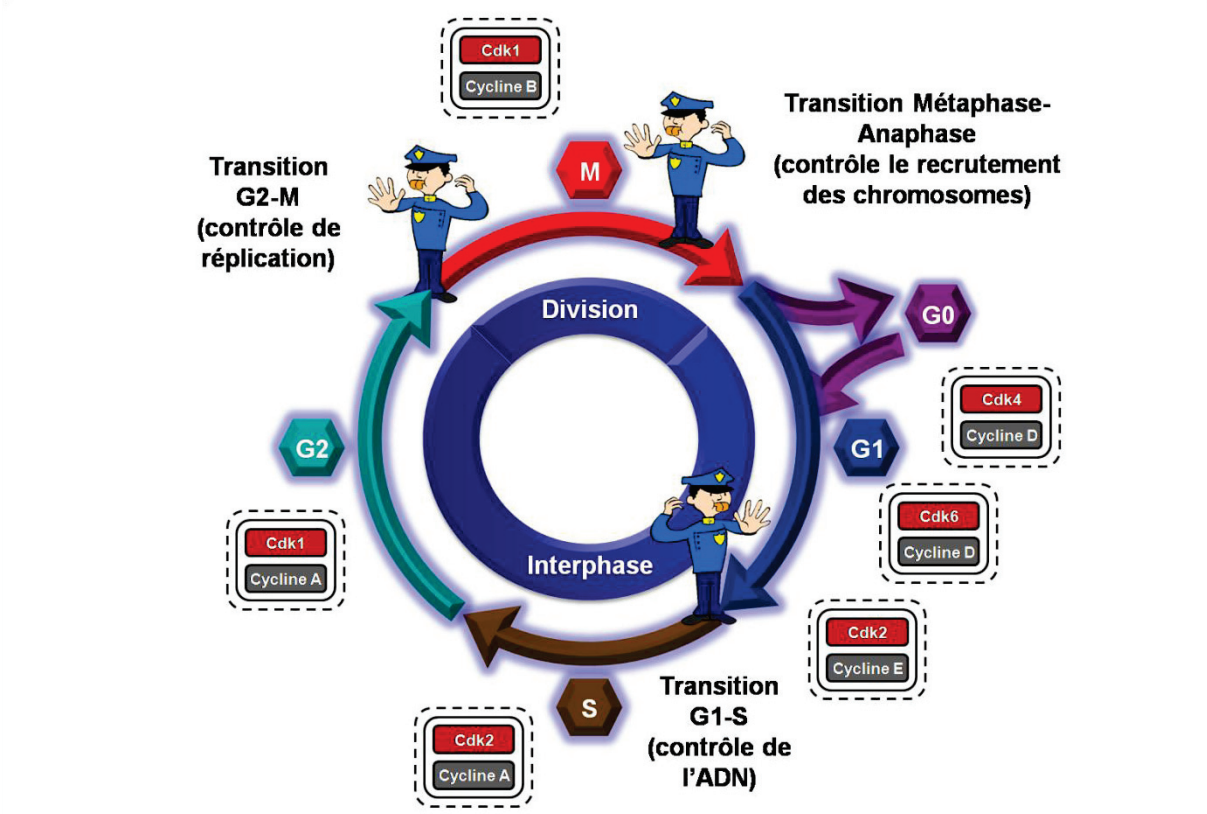


Figure 2 : Les complexes Cdk/Cycline et les points de contrôle du cycle cellulaire. Afin que les cellules ne s'engagent pas trop rapidement dans le cycle cellulaire, différents complexes Cdk/Cycline assurent la succession harmonieuse des différentes phases, et sont la cible de différents points de contrôle lors des transitions G1/S, G2/M et métaphase/anaphase.

3. La mitose

La phase M se divise en 5 phases **(Figure 3)** :

- Prophase : la chromatine se condense. Le fuseau de division se forme à partir des microtubules émanant des centrosomes.
- Prométaphase : l'enveloppe nucléaire se rompt. Les chromosomes s'attachent sur les fibres du fuseau de division bipolaire.
- Métaphase : les chromosomes s'alignent dans plan équatorial et forment la plaque métaphasique.
- Anaphase : les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles du fuseau.
- Télophase : les chromosomes se décondensent, le fuseau disparaît et le cytoplasme se separe (cytokinèse ou cytodiérèse) pour former deux cellules filles. Ce clivage par constriction est permis par la mise en place d'un anneau contractile principalement constitué d'actine et de myosine qui se resserre progressivement jusqu'à former un corps intermédiaire, le « mid-body ». Ce dernier forme un passage étroit entre les deux cellules filles. Il contient le reste du fuseau mitotique qui disparaît entièrement lorsque les deux cellules filles se séparent.

4. La méiose, une double division

La production des cellules germinales haploïdes, ovocytes et spermatozoïdes, à partir de précurseurs diploïdes résulte d'un processus de division cellulaire spécialisée : la méiose. La méiose consiste en deux divisions cellulaires successives (phases M) qui se succèdent sans interphase, ni réplication d'ADN **(Figure 4)**.

Mon travail de doctorat est centré sur l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'entrée en phase M des ovocytes de *Xenopus laevis.* Depuis plusieurs décennies, ce modèle est un paradigme pour l'étude de la transition G2/M du cycle cellulaire.

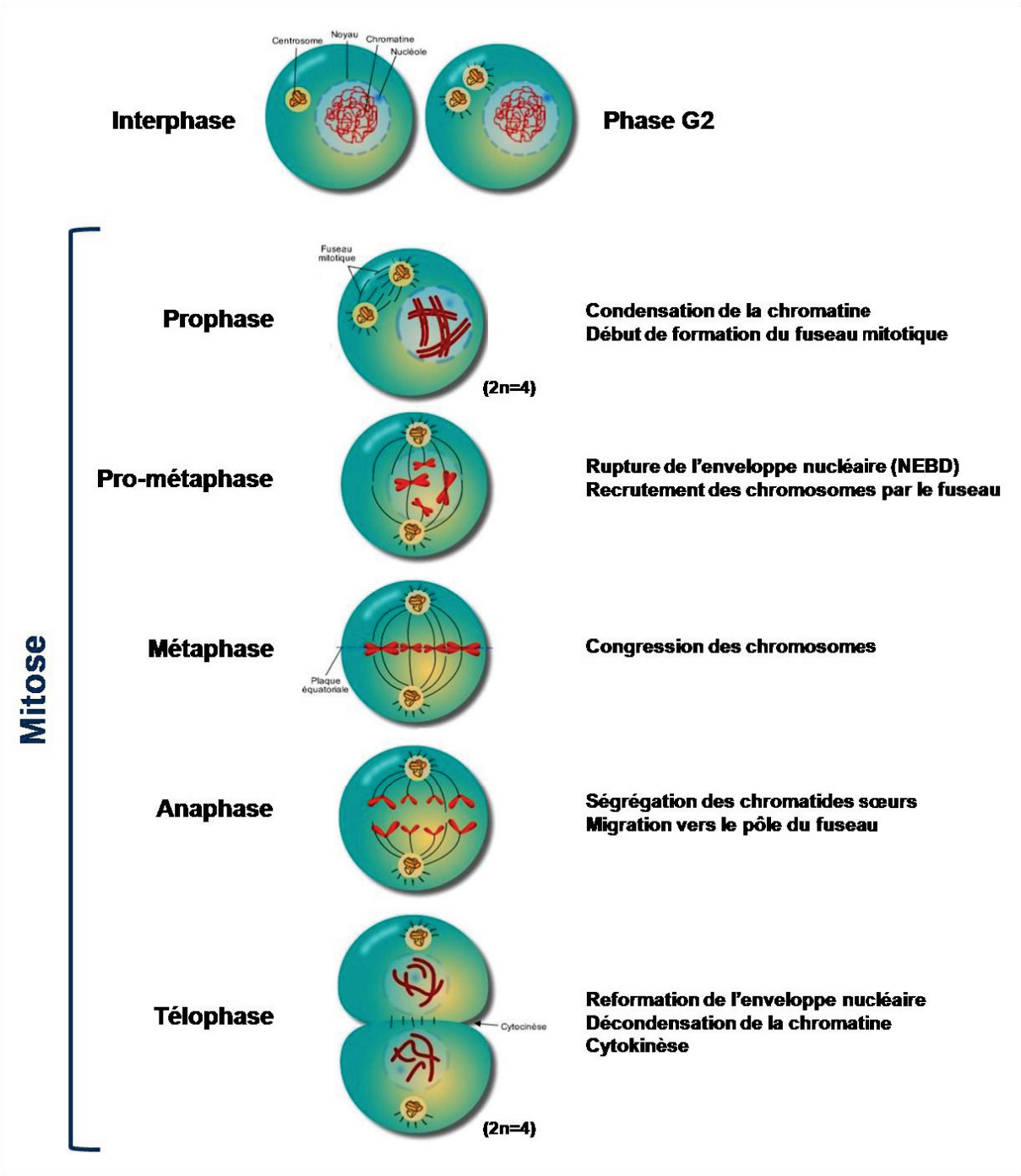


Figure 3 : Représentation schématique des différentes phases de mitose. La mitose représente la phase de division proprement dite et se décompose en 5 phases. Lors de la sortie d'interphase, *i.e.* en fin de phase G2, les centrosomes sont dupliqués. Ils organiseront la bipolarité du fuseau de division cellulaire. Adapté d'après http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/701/chap3c_contenu.htm

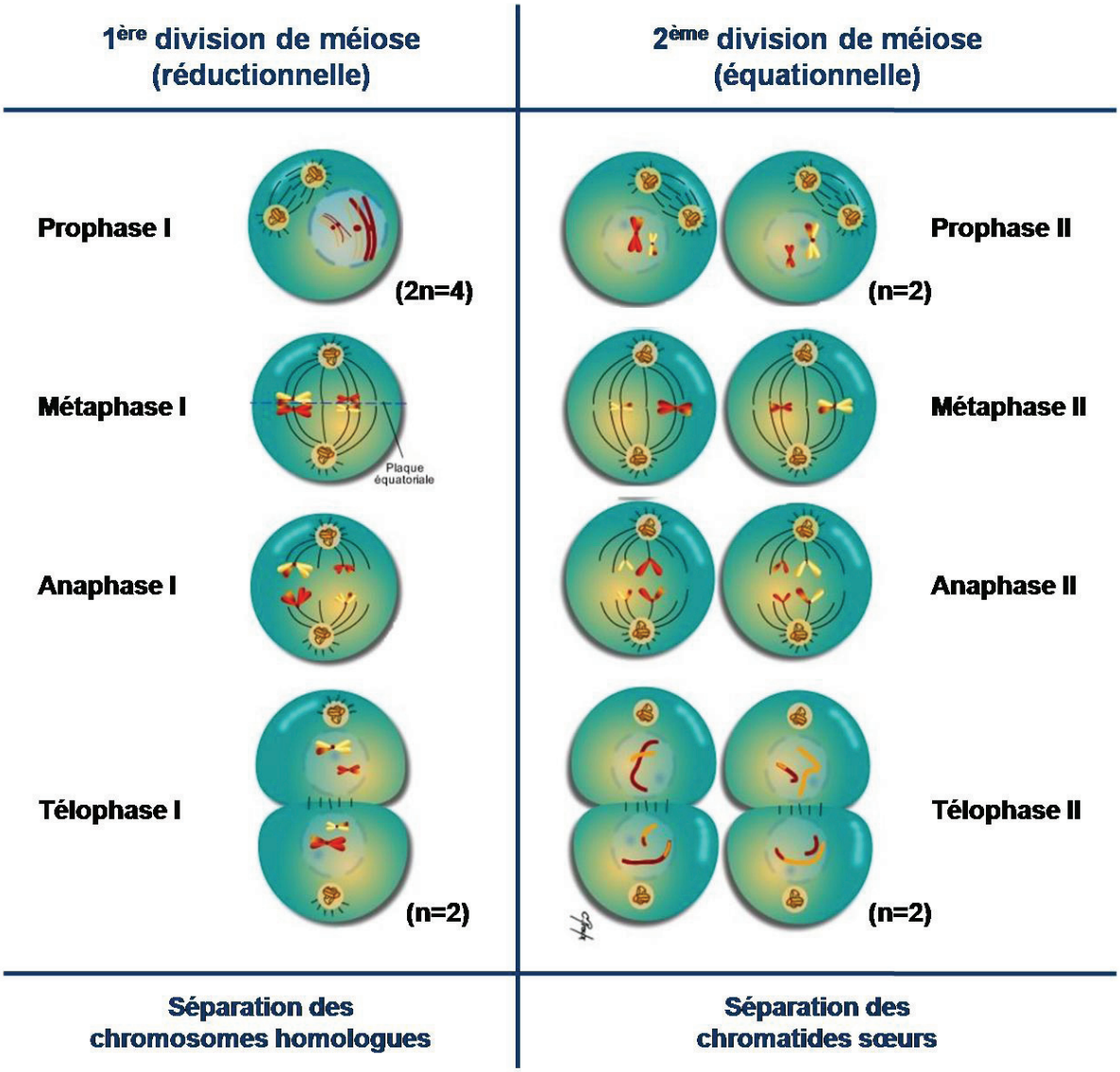


Figure 4 : Représentation schématique des différentes phases de la méiose. La méiose représente un type de division spécialisée permettant la production de cellules germinales haploïdes à partir de précurseurs diploïdes. La première division de méiose est dite réductionnelle puisqu'elle permet la séparation des chromosomes homologues et donc le passage à un génome haploïde. La seconde division de méiose est dite équationnelle et permet la ségrégation des chromatides sœurs. Adapté d'après http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/701/chap3c_contenu.htm

PARTIE II : L'OVOCYTE DE *XENOPUS LAEVIS*

1. Présentation du modèle animal et cellulaire

1.1. *Xenopus laevis,* le dactylètre du Cap

L'espèce *Xenopus laevis*, de la famille des Pipidés, se classe parmi les Batraciens Anoures. Surnommée « crapaud à griffe », cette espèce vit en Afrique du Sud et est exclusivement aquatique ; elle ne remonte en surface que pour respirer **(Figure 5)**. Le Xénope n'a ni de langue ni d'yeux mobiles. Son mode de reproduction est externe : les œufs sont pondus sous forme de grappes en eau douce, puis fécondés.



Figure 5 : Femelle *Xenopus laevis.* Parmi les caractéristiques majeures des Xénopes, il faut noter des pattes postérieures très musculeuses et garnies d'une large palmure. Trois des doigts de ses pattes postérieures sont garnis de griffes cornées. À l'état adulte, les femelles mesurent de 11 à 14 centimètres. Les mâles présentent une taille réduite d'environ 30 % par rapport aux femelles et présentent des abrasions au niveau des pattes antérieures (nuptial pads) nécessaires à la préhension de la femelle lors de l'accouplement (amplexus).

1.2. L'ovocyte de Xénope : un modèle de gamète femelle

Un gamète femelle est une cellule haploïde qui possède la capacité d'être fécondé par le spermatozoïde pour former un zygote diploïde. L'ovocyte de Xénope est un modèle de choix dans l'analyse du déclenchement de la phase M. La maturation de l'ovocyte de Xénope est l'étape de l'ovogenèse qui couvre les événements depuis la levée du blocage en prophase I, ou reprise méiotique, jusqu'à un nouvel arrêt en métaphase II.

1.2.1 Classification ovocytaire

Les ovaires contiennent une population hétérogène d'ovocytes. Une classification en six stades a été proposée en fonction de la taille et de la pigmentation des cellules (Dumont,

1972). Les ovocytes de stade I, II, III, IV et V ont des tailles respectives de 50-300, 300-450, 450-600, 600-1000 et 1000-1100 µm **(Figure 6 et Tableau 1)**. Les ovocytes de stades I et II sont dépigmentés. Dès le stade III, des granules pigmentaires contenant de la mélanine se déposent uniformément au niveau du cortex de l'ovocyte. La différence hémisphère animal-hémisphère végétatif apparaît au stade IV. En effet, la densité des pigments est corrélée à la polarité de l'ovocyte : l'hémisphère animal est fortement pigmenté alors que l'hémisphère végétatif est faiblement pigmenté. Les ovocytes de stade VI sont les plus grands (1100-1300 µm) ; ils sont caractérisés par la présence d'un anneau dépigmenté au niveau de la zone équatoriale **(Figure 7)**. Seuls les ovocytes de stades V et VI sont compétents pour répondre à une stimulation hormonale.

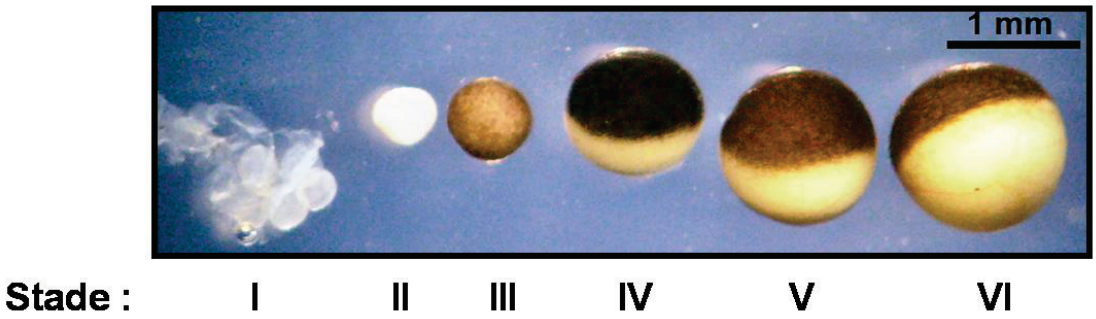


Figure 6 : Classification ovocytaire de Dumont (1972). L'ovogenèse est divisée en 6 stades définis essentiellement par la taille et la pigmentation de l'ovocyte.

Stades	I	II	III	IV	V	VI
Taille (µM)	50-300	300-450	450-600	600-1000	1000-1100	1100-1300
Pigmentation	Clair Transparent	Blanc Opaque	Marron clair homogène	Concentration de pigments noirs au niveau de l'hémisphère animal	Hémisphère animal marron Hémisphère végétatif clair	Anneau équatorial non-pigmenté entre les hémisphère

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des différents stades ovocytaires. D'après la classification de Dumont (1972)

1.2.2 Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI

L'ovocyte de stade VI est bloqué en prophase de première division de méiose, au stade diplotène. Cette cellule géante (1,1 mm de diamètre minimum) et volumineuse (approximativement 1µl) est de type hétérolécithe : elle possède des réserves vitellines abondantes distribuées de manière hétérogène **(Figure 7)**. L'accumulation de plaquettes vitellines assure l'autonomie nutritionnelle du futur embryon pendant une longue période.

Le cytoplasme renferme un grand nombre de ribosomes mais seuls 2% sont impliqués dans la traduction protéique. Les autres ribosomes constituent un stock qui sera fonctionnel ultérieurement. De la même manière, la majorité des ARNm est liée à une série de protéines spécifiques et restent dans un état latent, seuls 20% d'entre eux sont traductibles. Il existe deux gradients opposés qui polarisent la cellule : le gradient vitellin et le gradient de structures cytoplasmiques **(Figure 7)**. Le cortex est également riche en fibres d'actines qui pourraient intervenir dans la contraction de la région corticale se produisant après la fécondation

Le noyau, également appelé vésicule germinative (VG), est situé dans l'hémisphère animal de la cellule. Il est beaucoup plus volumineux que le noyau d'une cellule somatique **(Figure 7)**. Le diamètre de la vésicule germinative est d'environ 400 µm, soit 40 à 50 fois la taille du noyau d'une cellule somatique et 10^5 fois son volume. La vésicule germinative renferme le nucléoplasme avec les chromosomes et le matériel nucléolaire. Elle contient 18 paires de chromosomes (génome allotétraploïde, Schmid et Steinlein, 1991), environ 1500 nucléoles qui renferment des copies des gènes codant les ARNr et de nombreuses protéines stockées qui seront utilisées de manière à assurer le développement de l'embryon.

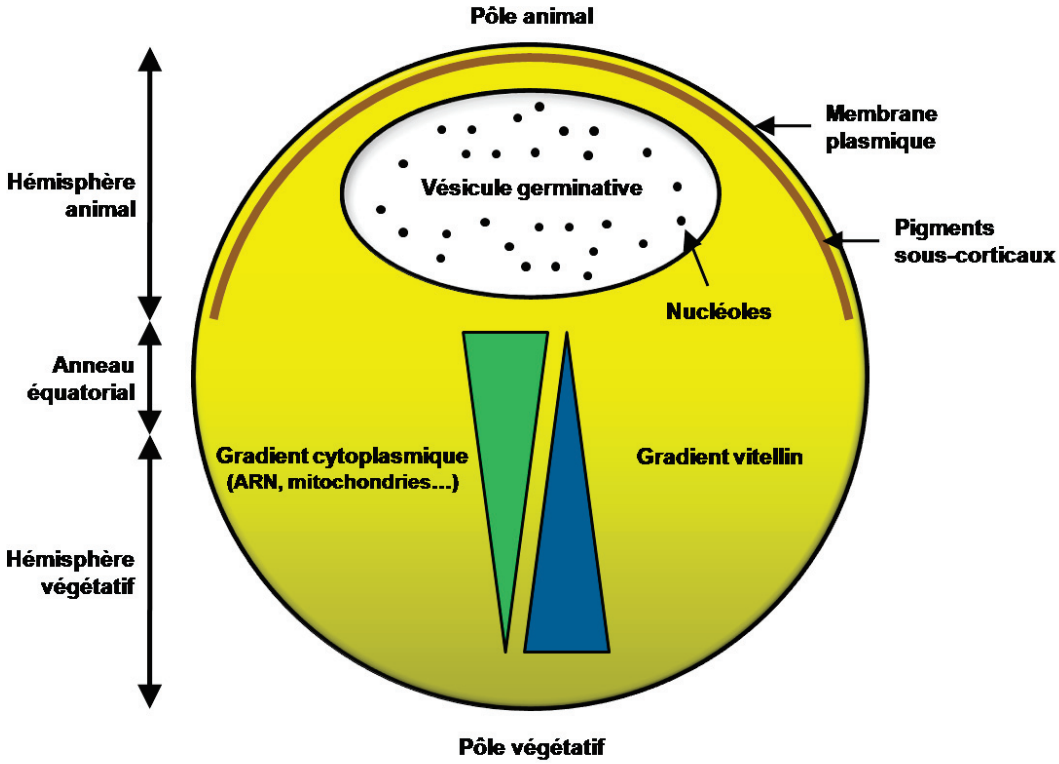


Figure 7 : Représentation d'une coupe méridienne d'un ovocyte de stade VI. Dans un ovocyte immature de stade VI, les plaquettes vitellines sont majoritairement accumulées dans l'hémisphère végétatif. À l'inverse, les différentes structures cytoplasmiques, tels que les ARN et les mitochondries sont préférentiellement localisées dans l'hémisphère animal.

1.2.3. Propriétés physiologiques des ovocytes de Xénope

Parmi les modèles de biologie du développement, l'ovocyte de *Xenopus laevis* présente des propriétés physiologiques et biochimiques particulièrement adaptées à l'étude du cycle cellulaire : synchronisation physiologique (blocage en G2, puis en métaphase II), grande capacité de synthèse protéique et taille cellulaire qui facilite leur manipulation (microinjection, électrophysiologie, biochimie).

Aucune cellule somatique ou système *in vitro* n'offre les capacités physiologiques des ovocytes de Xénope quant à l'étude des mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire et orchestrent la réorganisation cellulaire durant la division (Liu *et al.*, 2006). L'entrée en phase M est aisément obtenue par stimulation des voies Ras-dépendantes (les ovocytes et cellules folliculaires expriment de façon endogène un seul type de récepteur tyrosine kinase à l'insuline et à l'IGF1 : Zhu *et al.*, 1998 ; Sadler *et al.*, 2010) ou par stimulation d'une voie Ras-indépendante (stimulation par la progestérone : Maller, 2001), voire par la surexpression de certains effecteurs de la reprise méiotique telles que les MEK (voie de signalisation MAPK : Huang *et al.*, 1995 ; Bodart *et al.*, 2002b). Ce modèle offre par ailleurs d'impressionnantes possibilités sur le plan biochimique puisque les ovocytes contiennent des taux élevés de protéines. Aussi, l'activité de la protéine kinases MAPK peut être détectée par western blot sur 1/10 du volume d'un ovocyte, permettant la réalisation d'études cellule par cellule (Ferrell et Machleder, 1998).

2. L'ovogenèse chez le Xénope

2.1. Généralités

Chez le Xénope, l'ovogenèse se réalise dans l'ovaire qui s'organise en sacs délimités par du tissu épithélial et conjonctif renfermant des milliers d'ovocytes à différents stades de développement. L'ovogenèse débute lorsqu'une ovogonie sort de la phase S pré-méiotique et entre en prophase de première division de méiose (prophase I). Lorsque l'ovocyte atteint le stade diplotène de la prophase I, la méiose s'arrête et l'ovocyte s'entoure de cellules folliculaires. La première étape de l'ovogenèse correspond à une phase de croissance. La maturation est l'étape de l'ovogenèse qui couvre les événements depuis la levée du blocage en prophase I jusqu'à un nouvel arrêt en métaphase II. Le spermatozoïde lève ce blocage métaphasique et conduit à la formation d'un zygote diploïde **(Figure 8)**.

Pendant la phase de croissance, l'ovocyte accumule des réserves nutritives (le vitellus) et informatives (stock d'ARNm maternels) qui permettent l'acquisition d'une compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. La phase de croissance, ou d'accroissement, se divise en 6 stades (Dumont, 1972). Au terme de sa croissance, l'ovocyte immature est toujours bloqué en prophase I. Il restera dans cet état plusieurs mois, dans l'attente d'un signal hormonal qui lève ce blocage. L'ovocyte termine alors sa première division, puis débute la seconde division de méiose jusqu'à un nouveau blocage qui survient en métaphase II **(Figure 8)**.

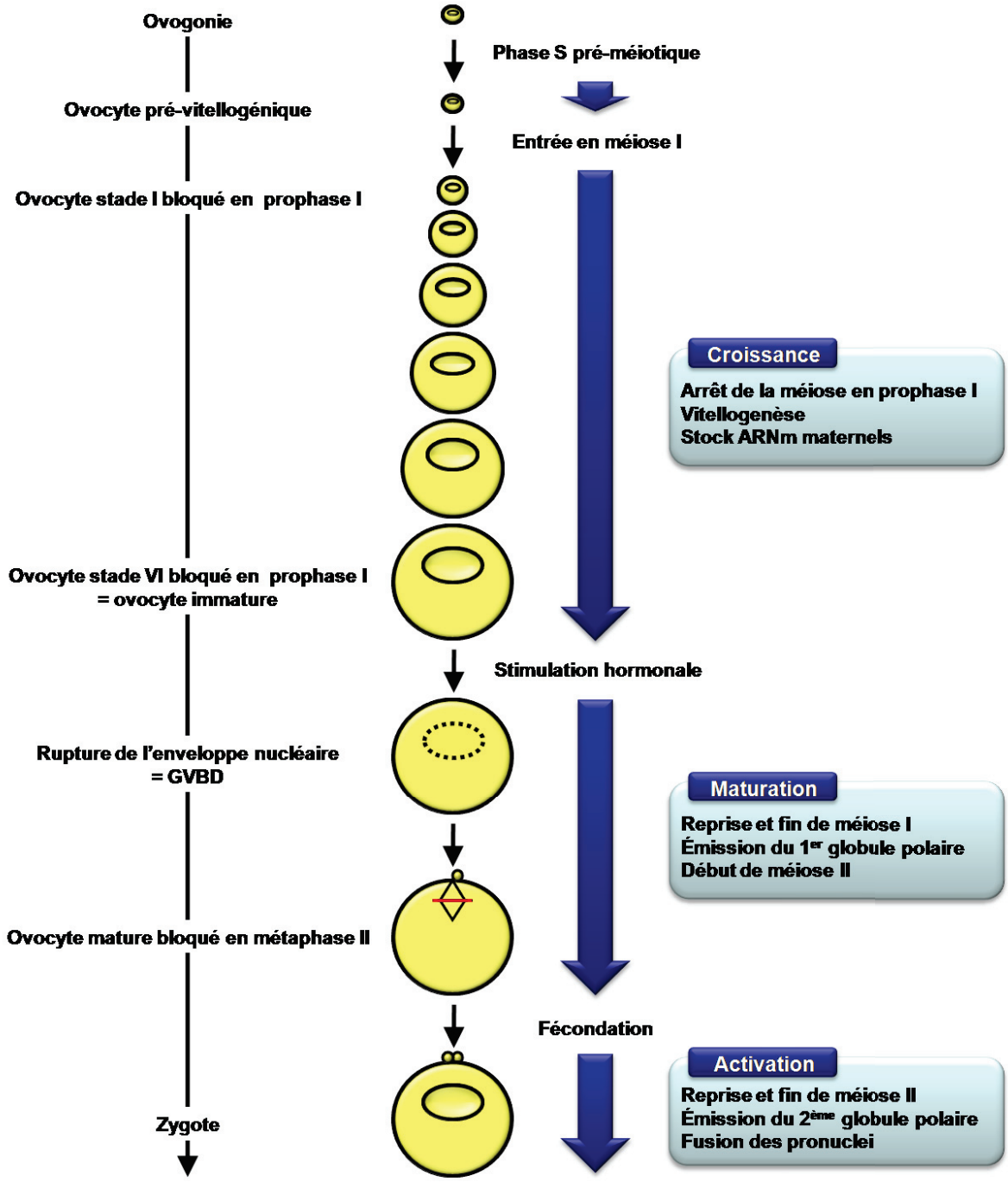


Figure 8 : De l'ovogonie au zygote de *Xenopus laevis*. Au cours de la méiose, l'ovocyte subit deux blocages physiologiques. Le premier survient en prophase I, puis sera levé par stimulation hormonale pour permettre la maturation ovocytaire. Au terme de cette maturation, l'ovocyte sera à nouveau bloqué en métaphase II jusqu'à la fécondation.

2.2. La vitellogenèse

La vitellogenèse débute dès le stade III et s'arrête au stade VI. Le vitellus est synthétisé dans le foie en réponse à l'oestradiol produit par les cellules folliculaires (Wahli *et al.*, 1979). Ce vitellus prend la forme d'un précurseur glycoprotéique : la Vitellogénine ou VTG **(Figure 9)**. Une fois synthétisée, la VTG est acheminée jusqu'aux ovaires *via* la circulation sanguine. Après s'être fixée sur un récepteur spécifique (VTGR) situé à la surface de l'ovocyte, la VTG est internalisée par endocytose. Elle est ensuite clivée par la Cathepsine D en Phosvitine (PV) et Lipovitelline (LV) (Yoshizaki et Yonezawa, 1998). La taille des plaquettes vitellines augmente durant la phase de croissance. Elles se répartissent selon un gradient centripète : les plaquettes vitellines jeunes situées en périphérie ont un volume moins important que les plaquettes plus âgées au centre.Les réserves se concentrent principalement au pôle végétatif.

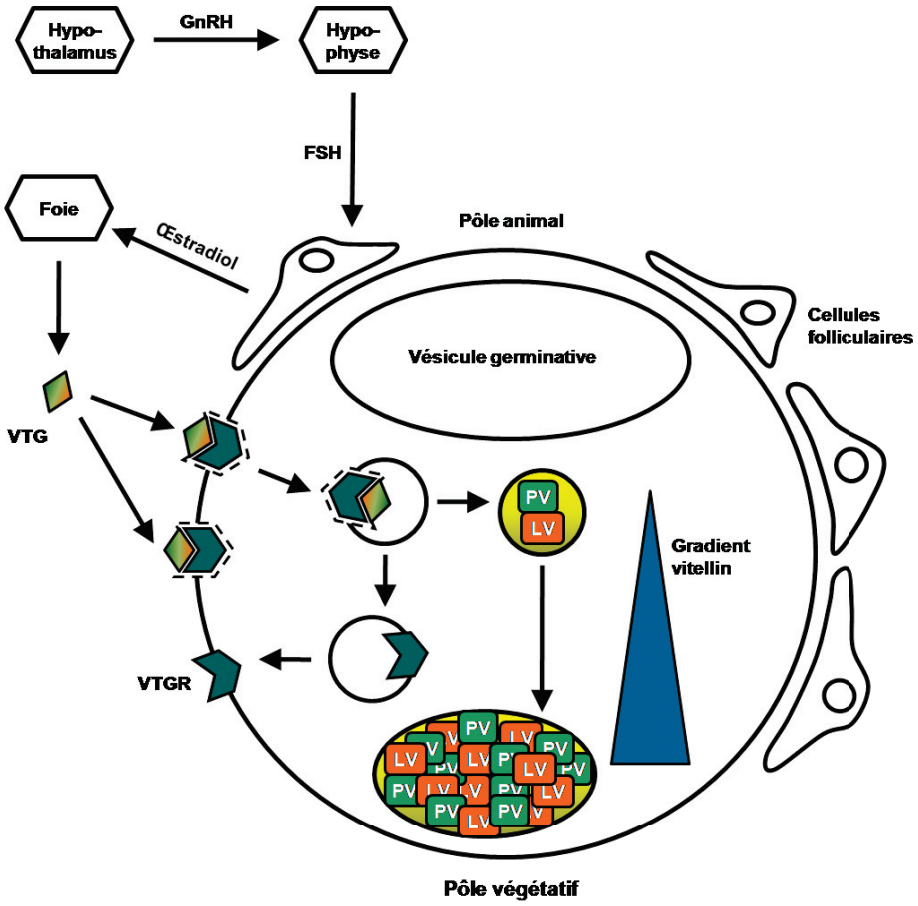


Figure 9 : Vitellogenèse chez le Xénope. L'hypothalamus sécrète la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui stimule l'hypophyse. En réponse, l'hypophyse sécrète la FSH (Follicle Stimulating Hormone) qui induira la libération d'œstradiol par les cellules folliculaires. Sous l'effet de l'œstradiol, les hépatocytes synthétisent la Vitellogénine (VTG) qui sera libérée dans le sang, transportée aux ovaires et qui se fixera sur son récepteur (VTGR) à la surface de l'ovocyte. Les complexes VTG/VTGR subissent une endocytose entrainant le clivage de la VTG en Phosvitine (PV) et Lipovitelline (LV), et la formation d'un gradient de plaquettes vitellines. La fusion des endosomes à la membrane permettra le recyclage des récepteurs à la VTG.

2.3. Activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse

2.3.1 Synthèse des ARN ribosomaux

La synthèse de molécules d'ARNr est environ 30 à 300 fois plus importante dans l'ovocyte que dans une cellule somatique. Dans l'ovocyte, les chromosomes adoptent une conformation particulière dite en écouvillon. Leur extension est maximale entre les stades I et III. Au stade IV, les chromosomes en écouvillon se rétractent pour finalement se condenser au stade V et VI. Lorsqu'elles sont décondensées, ces larges boucles appariées sont le siège d'une haute activité transcriptionnelle (Dumont, 1972) dont 98% de l'activité consiste en la synthèse d'ARN ribosomaux (ARNr).

2.3.2. Synthèse des ARNm maternels

Les 2% d'activité transcriptionnelle restants comprennent la synthèse d'ARNm codant une trentaine de protéines importantes pour la détermination des feuillets embryonnaires et l'établissement de la lignée germinale (King *et al.*, 2005). Ces ARNm se répartissent spécifiquement le long de l'axe animal/végétatif et établissent la polarité antéro-postérieure du futur embryon **(Figure 7)**. Si peu d'informations existent concernant les mécanismes responsables de la localisation des ARNm au pôle animal, il est admis que deux vagues de synthèse successives permettent la localisation d'une vingtaine d'ARNm au pôle végétatif (Forristall *et al.*, 1995 ; Kloc et Etkin, 1995).

2.4. Formation de l'enveloppe vitelline

Les cellules folliculaires, présentes dès le stade I, établissent des contacts avec les ovocytes grâce à des microvillosités. Ces contacts sont ponctuels et forment des canaux cytoplasmiques permettant le passage de certaines molécules. Au stade III, l'enveloppe vitelline, synthétisée par l'ovocyte, se dépose entre les cellules folliculaires et l'ovocyte. L'enveloppe vitelline est une enveloppe acellulaire constituée de glycoprotéines. Le contact entre l'ovocyte et les cellules folliculaires persiste grâce aux microvillosités qui traversent l'enveloppe vitelline. Des jonctions communicantes sont retrouvées au niveau de ces microvillosités (Browne *et al.*, 1979).

2.5. Migration des granules corticaux

Les granules corticaux, petites vésicules remplies de glycoprotéines délimitées par une membrane, sont localisés en périphérie du cytoplasme dans les ovocytes de stade II. Au cours de la croissance de l'ovocyte, les granules corticaux migrent en périphérie de l'ovocyte pour former une couche dense sous la membrane de l'ovocyte. Ils ont un rôle important lors de la fécondation puisque leur exocytose permet de former la membrane de fécondation qui constitue une barrière à la polyspermie.

PARTIE III : LA REPRISE MÉIOTIQUE DES OVOCYTES DE XÉNOPE

1. Stimulation de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

Plusieurs types de stimuli induisent la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. *In vivo*, ce processus, caractérisé par l'entrée de la cellule en première division de méiose, est déclenché par stimulation hormonale.

1.1. Les hormones stéroïdes

1.1.1. La progestérone

Chez les Batraciens, les gonadotropines synthétisées par l'hypothalamus stimulent la production d'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse. Cette production stimule la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdes (dont la progestérone) par les cellules folliculaires (Fortune *et al.*, 1975 ; Thibier-Fouchet *et al.*, 1976 ; Jessus et Ozon, 2004) **(Figure 10)**. *In vitro*, l'incubation des ovocytes de Batraciens Anoures (Masui, 1967 ; Schuetz, 1967a, b ; Vilain, 1977) et Urodèles (Vilain, 1977) en présence de progestérone stimule la reprise méiotique.

1.1.2. Les autres hormones stéroïdes

La testostérone et la doxycorticostérone seraient de bons inducteurs d'entrée en phase M *in vitro* (Blondeau et Baulieu, 1984 ; Lutz *et al.*, 2001). La quantité de testostérone produite par les cellules folliculaires est plus importante que celle de progestérone (Fortune *et al.*, 1975). Les androstérones, comme l'androstènedione, stimulent la reprise méiotique à des concentrations identiques à celles utilisées pour la progestérone, voire plus faibles que pour la testostérone (Lutz *et al.*, 2001). Lorsque les femelles sont injectées de gonadotropine, les concentrations sériques et ovariennes en testostérone et en androstènedione sont dix fois supérieures à celles en progestérone. Cette dernière observation s'explique par l'existence dans l'ovocyte de CYP17, une enzyme qui métabolise rapidement la progestérone en androstènedione (Yang *et al.*, 2003) **(Figure 10)**.

1.2. Les récepteurs aux stéroïdes

1.2.1. Un récepteur membranaire à la progestérone

Dans les cellules somatiques, l'action de la progestérone est génomique. Liée à un récepteur nucléaire, elle active des voies de signalisation qui régulent, positivement ou négativement, la transcription des gènes contenant des éléments de réponse à la progestérone. Dans les ovocytes de Xénope, bien que l'identification des récepteurs aux stéroïdes soit longtemps restée énigmatique, plusieurs observations ont montré que ces récepteurs sont membranaires. En effet, l'injection de stéroïdes dans les ovocytes de *Rana pipiens* (Smith et Ecker, 1969 ; Masui et Markert, 1971 ; Smith et Ecker, 1971) ou de *Xenopus laevis* (Jacobelli *et al.*, 1974 ;

Drury et Schorderet-Slatkine, 1975) ne déclenche pas la reprise méiotique tandis que des stéroïdes fixés sur des polymères de haut poids moléculaire, incapables de pénétrer dans l'ovocyte, provoquent la maturation (Baulieu *et al.*, 1978 ; Godeau *et al.*, 1978 ; Bandyopadhyay *et al.*, 1998). Par ailleurs, des sites de fixation aux stéroïdes de haute affinité ont été détectés dans des préparations membranaires (Liu et Patino, 1993 ; Lutz *et al.*, 2000). Enfin, l'ovocyte est capable de reprendre la méiose en présence d'Actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, ce qui démontre que la progestérone agit par des mécanismes non génomiques *via* l'activation des voies de signalisation (Masui et Markert, 1971 ; Lutz *et al.*, 2003).

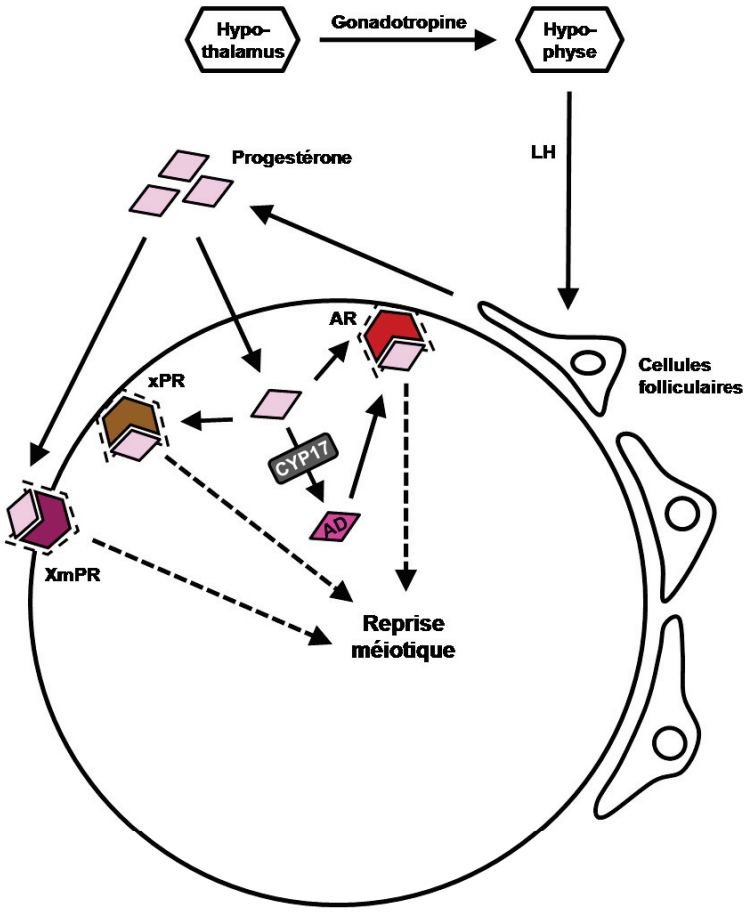


Figure 10 : Stimulation de la reprise méiotique par les stéroïdes. Les gonadotropines synthétisées par l'hypothalamus stimulent l'hypophyse. La sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) par cette dernière provoque la synthèse de progestérone par les cellules folliculaires. Dans l'ovocyte, la progestérone peut se fixer soit sur son récepteur « classique » xPR relocalisé à la membrane, soit sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires XmPR. En pénétrant dans l'ovocyte, la progestérone ou son dérivé, l'androstènedione (AD) métabolisé par la CYP17, peuvent se fixer aux récepteurs aux androgènes (AR).

1.2.2. Identification du récepteur à la progestérone

Seuls les ovocytes de stades V et VI sont compétents pour subir la reprise méiotique après une stimulation hormonale (Dumont, 1972). Une des explications possibles serait la faible concentration en récepteurs à la progestérone présents au niveau de la membrane des ovocytes de stades antérieurs. La densité de récepteurs augmente fortement aux stades V et VI, jusqu'à devenir six fois plus importante que dans les ovocytes de stade IV (Liu et Patino, 1993). Deux familles de récepteurs à la progestérone (PR) contribueraient à la reprise méiotique chez les Batraciens, les xPR et les xAR.

Les xPR : Deux membres de la famille des PR « classiques » intracellulaires, xPR-1 et xPR-2, ont été clonés chez le Xénope (Bayaa *et al.*, 2000 ; Tian *et al.*, 2000). La microinjection des ARNm *xPR-2* augmente la sensibilité des ovocytes envers l'hormone et accélère la reprise méiotique induite par la progestérone (Bayaa *et al.*, 2000 ; Tian *et al.*, 2000). De plus, la microinjection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN endogène du récepteur inhibe la reprise méiotique. Cette inhibition peut être supprimée par la microinjection du récepteur purifié (Tian *et al.*, 2000). Cependant, ce récepteur est principalement cytoplasmique : seuls 5 à 10% des xPR s'associent à la membrane ovocytaire et peuvent être co-purifiés avec les MAPK et la PI3-K (Bagowski *et al.*, 2001b) **(Figure 10)**. Cette association membranaire se fait par l'intermédiaire du domaine de fixation au ligand alors que la partie N-terminale du récepteur est cytosolique (Martinez *et al.*, 2007). La présence des deux types de récepteurs dans l'ovocyte, membranaires et intracellulaires, suggère que des voies différentes pourraient être simultanément activées en présence de stéroïdes (Maller, 2003).

Les xAR : La progestérone pourrait se lier à d'autres récepteurs membranaires pour stimuler la reprise méiotique. Par ailleurs, des métabolites dérivés de la progestérone pourraient également participer au déclenchement de la reprise méiotique. Aussi, certains travaux ont montré que les récepteurs aux androgènes (AR) participeraient à la reprise méiotique **(Figure 10)**. Un récepteur nucléaire aux androgènes (xAR) a été cloné dans les ovocytes. Il lie la progestérone avec une forte affinité et conduit à la diminution de l'activité de la protéine Gβγ (Evaul *et al.,* 2007). Cependant, l'inhibition de ce récepteur n'empêche pas la reprise méiotique bien qu'il diminue le pourcentage de maturation stimulée par les androgènes *in vitro*. De même, l'inhibition de l'enzyme qui permet la conversion de la progestérone en androstènedione suggèrent qu'à de faibles concentrations, les androgènes lient le récepteur aux androgènes, alors qu'à des concentrations élevées, les androgènes lient également les récepteurs a la progestérone (Lutz *et al.*, 2001 ; Evaul *et al.*, 2007).

Les autres récepteurs : Chez certains poissons téléostéens, la reprise méiotique peut être déclenchée par des hormones stéroïdes regroupées sous le nom de MIH (Maturation Inducing Hormone). Ces hormones agissent également *via* un récepteur membranaire (Nagahama, 1997). Chez la truite, un récepteur composé de sept hélices transmembranaires a été cloné. La protéine recombinante produite chez *Escherichia coli* présente un site unique, de haute affinité, saturable pour les progestines. Lorsque ce récepteur est exprimé dans des cellules de

Mammifères, il provoque l'activation de la voie MAPK et l'inhibition de l'Adénylate cyclase en réponse aux progestines (Zhu *et al.,* 2003). Chez plusieurs vertébrés, comme le Xénope, la Souris et l'Homme, des orthologues de ce récepteur ont été clonés. Les membres de cette nouvelle famille de récepteurs membranaires aux stéroïdes présentent de faibles homologies avec la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Zhu *et al.*, 2003). L'injection d'anticorps dirigés contre ces PR membranaires (XmPR) inhibe la maturation stimulée par la progestérone alors que l'injection d'ARNm *myc-xmPR* accélère la reprise méiotique (Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007).

1.3. Les facteurs de croissance

1.3.1. L'insuline et l'IGF1

En plus des stéroïdes, certains facteurs de croissance, comme l'insuline ou l'IGF1 (Insulin Growth Factor), stimulent la reprise méiotique des ovocytes *in vitro*, bien que leurs effets s'exercent selon une cinétique plus lente comparée à celle de la progestérone (El-Etr *et al.*, 1979 ; Maller et Koontz, 1981). Ils agissent par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire (IGFR, Insulin Growth Factor Receptor) qui reconnait l'IGF1 et l'insuline. Ce récepteur a été cloné puis étudié dans l'ovocyte de Xénope (Hainaut *et al.*, 1991a ; Janicot *et al.*, 1991 ; Scavo *et al.*, 1991 ; Groigno *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 1998). Le recepteur IGFR a également été retrouvé dans les cellules folliculaires. La defolliculation des ovocytes diminuerait le pourcentage de maturation des ovocytes stimulée par l'IGF (Sadler *et al.*, 2010).

1.3.2. Les autres facteurs de croissance

La stimulation de la méiose par d'autres facteurs de croissance nécessite l'expression préalable des ARNm de leurs récepteurs spécifiques puique les ovocytes n'expriment que les récepteurs à l'insuline. Ainsi, la maturation peut être stimulée par le Fibroblast Growth Factor (FGF) (Browaeys-Poly *et al.*, 2000), l'Epidermal Growth Factor humain (hEGF) (Opresko et Wiley, 1990) ou encore par le Nerve Growth Factor humain (hNGF) (Nebreda *et al.*, 1991). La reprise méiotique peut également être déclenchée par l'expression de Tpr-met, récepteur constitutivement actif de l'Hepatocyte Growth Factor/Scattor Factor (HGF/SF) (Daar *et al.*, 1991). Bien que ces récepteurs ne soient pas endogènes, leurs voies de signalisation sont fonctionnelles dans l'ovocyte de Xénope. Ce dernier constitue donc un bon modèle d'étude des mécanismes de transduction des signaux (Browaeys-Poly *et al.*, 2001 ; Cailliau et Browaeys-Poly, 2009).

2. Événements cytologiques et bases moléculaires de la reprise méiotique

2.1. Rupture de l'enveloppe nucléaire : GVBD

Les événements cytologiques de la reprise méiotique sont visibles sous loupe binoculaire. Dans les premières heures qui suivent la stimulation hormonale, la vésicule germinative migre

au pôle animal de l'ovocyte et l'enveloppe nucléaire se rompt en un processus appelé GVBD ou Germinale Vesicle Break-Down **(Figure 11)** :

- La rupture de l'enveloppe nucléaire commence à la base de la vésicule germinative (Brachet *et al.*, 1970 ; Huchon *et al.*, 1981c). Le nucléoplasme se dissipe dans le cytoplasme environnant et le volume nucléaire devient de plus en plus réduit. Des analyses immunohistologiques révèlent que les protéines nucléaires se dispersent dans le cytoplasme tout en demeurant majoritairement au pôle animal.
- L'ascension de la vésicule germinative provoque une dispersion des pigments au pôle animal de l'ovocyte appelée tache de maturation (White Spot ou WS). Elle est le signe morphologique externe le plus évident de la reprise méiotique.

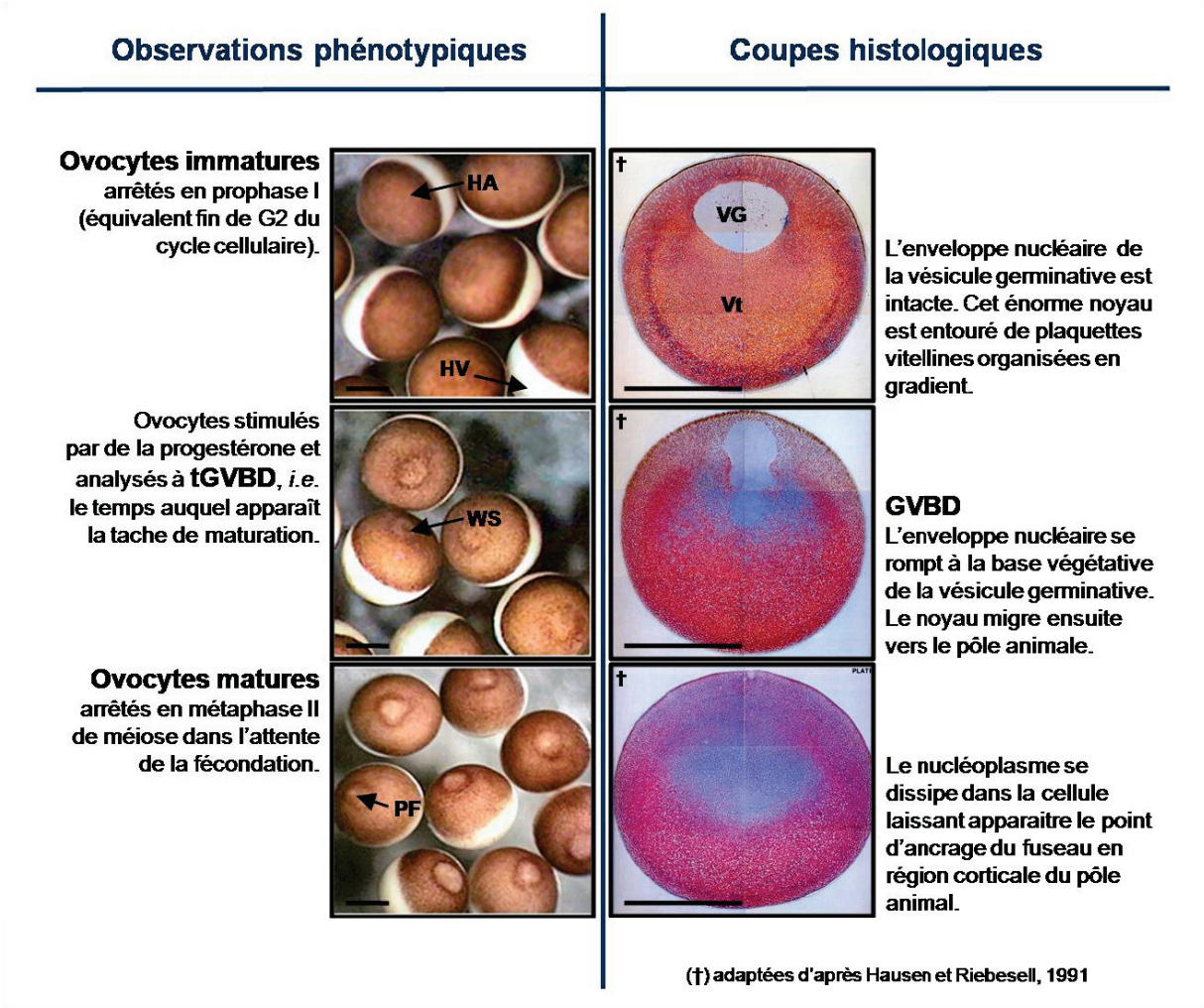


Figure 11 : Événements cytologiques associés à la reprise méiotique. L'analyse phénotypique peut être aisément réalisée sous loupe binoculaire. Une analyse histologique permet d'affiner l'observation au niveau intracellulaire. **HA**, hémisphère animale ; **HV**, hémisphère végétatif ; **WS**, white spot ou tache de maturation ; **PF**, point d'ancrage du fuseau ; **VG**, vésicule germinale ; **Vt**, vitellus.

2.2. Morphogénèse du fuseau méiotique

2.2.1. Structure du fuseau

La structure moléculaire et l'assemblage correct du fuseau de division sont essentiels à la distribution du matériel génétique au cours de la division des gamètes et cellules somatiques. L'organisation du fuseau est complexe. Il est constitué d'un réseau microtubulaire accompagné d'un ensemble de protéines qui régulent l'assemblage des microtubules. La nucléation des microtubules se produit au niveau de centres organisateurs de microtubules (MTOC : Microtubule Organizing Center) dont les mieux caractérisés sont les centrosomes (Andersen, 1999). Dupliqués durant la phase S, les centrosomes conditionnent l'architecture cellulaire et sont impliqués dans de nombreuses fonctions de la vie d'une cellule tels que le trafic intracellulaire, la motilité, l'adhérence ou encore la polarité. Au cours de la phase de division, les centrosomes jouent un rôle primordial dans la distribution et la stabilité du matériel génétique ainsi que dans la ségrégation de facteurs de spécificité. Dans les ovocytes de Batraciens, le MTOC n'est pas constitué de centrosomes. Dans ce contexte cellulaire, la formation du fuseau de division est dite acentriolaire. La nucléation des microtubules se produit à partir d'une structure nommée γ-TuRC (γ-Tubulin Ring Complex), formée d'un déploiement circulaire de sous-unités γ-tubulines et stabilisées par les protéines XGrip découvertes chez la Drosophile (Moritz *et al.*, 2000).

2.2.3. Morphogenèse acentriolaire du fuseau de division méiotique

L'ovocyte de Xénope constitue un modèle acentriolaire de morphogenèse du fuseau dans lequel les centrosomes ne sont pas impliqués (Gard *et al.*, 1995). Un fuseau bipolaire peut s'organiser *in vitro* autour de billes de chromatine substituant les chromosomes dans des extraits d'œufs de Xénope (Heald *et al.*, 1996 ; Walczak *et al.*, 1998). En absence de centrioles, les protéines régulatrices jouent un rôle essentiel dans l'organisation autonome du fuseau.

1ère division de méiose : Chez le Xénope, simultanément à la GVBD, un réseau microtubulaire transitoire (TMA : Transient Microtubule Array) s'assemble à la base végétative du noyau à partir du centre organisateur des microtubules **(Figure 12A)**. Le TMA migre ensuite vers le pôle animal en association avec les chromosomes alors qu'apparaît la tache de maturation (Huchon *et al.*, 1981b ; Gard, 1992). Le complexe MTOC-TMA se condense pour former un agrégat microtubulaire compact en forme de disque (compaction et polarisation), puis s'allonge et prend une forme cylindrique pour former un court fuseau bipolaire de métaphase (élongation). En raison de l'absence de centriole et de centrosome (Huchon *et al.*, 1981c), le fuseau méiotique a un aspect différent du fuseau mitotique. Durant la prométaphase, le fuseau méiotique, d'abord orienté transversalement, pivote et s'oriente perpendiculairement à l'axe pôle animal/pôle végétatif (rotation) pour enfin s'ancrer à la membrane plasmique de l'ovocyte par un de ses pôles (Gard, 1992).

Parallèlement à la morphogenèse du fuseau, les chromosomes se condensent et restent individualisés (Gard, 1992). La congression des chromosomes définit le processus permettant l'alignement des chromosomes au centre de la plaque métaphasique. D'abord observés dans les régions basales du complexe TMA-MTOC, les chromosomes sont alignés en métaphase I lorsque le fuseau est perpendiculaire à la membrane plasmique (Gard, 1992). La première division de méiose s'achève par l'expulsion du premier globule polaire lors de la télophase I.

2ème division de méiose : La seconde division de méiose débute sans qu'une structure nucléaire ne soit reformée au préalable. Un deuxième fuseau se forme de la même manière que lors de la première division de méiose, puis la division s'arrête en métaphase II, et reste bloquée jusqu'à la fécondation **(Figure 12A)**. À ce stade, il est possible d'observer le premier globule polaire ainsi que l'extrémité du fuseau ancré à la membrane au centre de la tache de maturation **(Figure 12B)**. *In vivo*, les ovocytes matures sont libérés des cellules folliculaires dans la cavité péritonéale à partir de laquelle ils sont transportés dans l'oviducte pour être pondus. La fécondation permettra à l'ovocyte d'achever la seconde division de méiose et déclenchera le développement embryonnaire.

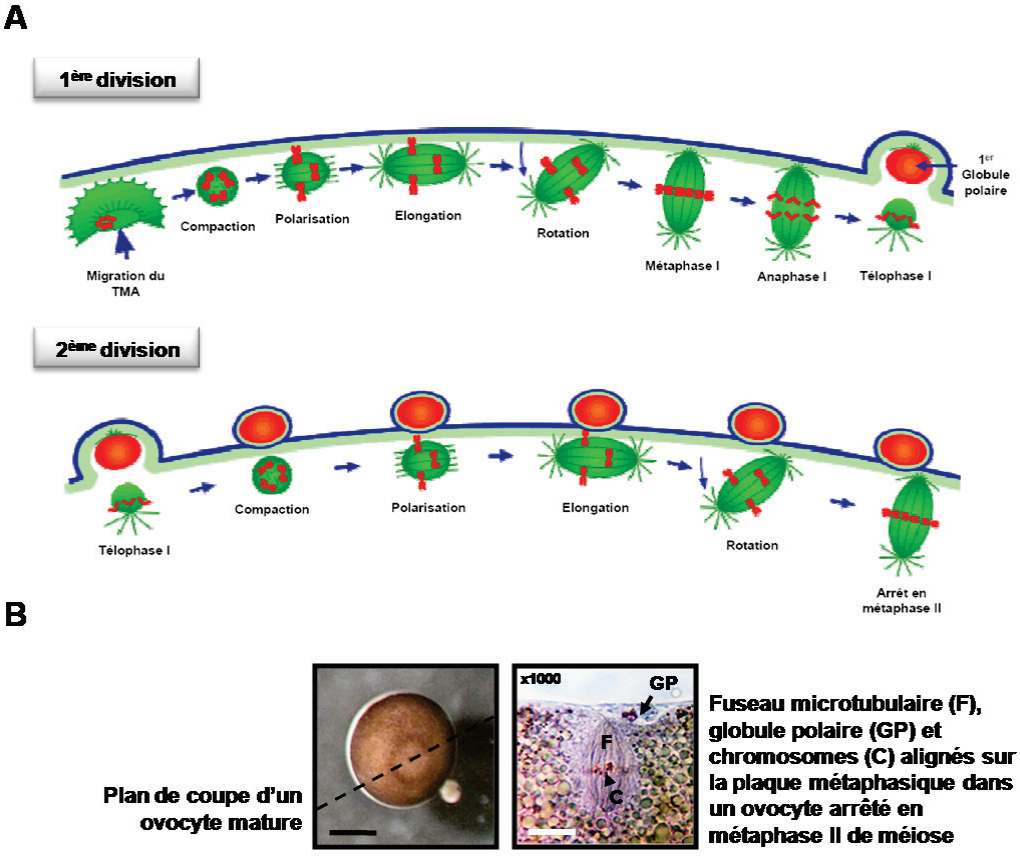


Figure 12 : Morphogenèse du fuseau de division lors de la reprise méiotique ovocytaire. (A) Adapté de http://www.biology.utah.edu/gard/HTML/Oogenesis/Maturation_body.html et **(B)** Ovocyte mature (barre d'échelle noire = 0,5 mm) et coupe histologique de fuseau de métaphase II (barre d'échelle blanche = 10 µm).

3. Évènements précoces de la reprise méiotique

D'un point de vue moléculaire, la stimulation de l'ovocyte déclenche toute une série d'événements, dit précoces, suivis d'une importante synthèse protéique. La transduction du signal mitogène qui suit la synthèse protéique nécessite l'activité des protéines kinases. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre, tel que le 6-DMAP (6-Diméthylaminopurine) inhibe la maturation ovocytaire (Maller et Krebs, 1977 ; Flament *et al.*, 2000). La nature des événements précoces responsable de la stimulation de la synthèse protéique est présentée ci-après. Nous distinguerons les événements précoces spécifiques d'une stimulation de l'ovocyte par la progestérone, de ceux spécifiques d'une stimulation par l'insuline.

3.1. Diminution de l'AMPc et inhibition de la PKA

L'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) est produit grâce à une protéine membranaire : l'Adénylate cyclase (AC). Le taux d'AMPc dans la cellule est régulé à la fois par sa synthèse *via* l'Adénylate cyclase mais aussi par sa dégradation *via* l'AMPc phosphodiesterase. Dans la cellule, l'AMPc agit sur les PKA (Protéines Kinases dépendantes de l'AMPc). Les PKA sont des tétramères formés de deux chaines régulatrices (R) et de deux chaines catalytiques (C). Sous sa forme tétramérique, la PKA est dénuée d'activité enzymatique. La fixation de l'AMPc sur les chaines régulatrices entraîne la libération des chaînes catalytiques permettant ainsi la phosphorylation des protéines cibles de PKA **(Figure 13)**. Dans les minutes qui suivent l'application de la progestérone sur les ovocytes de Xénope, l'activité de l'Adénylate cyclase est inhibée de 50% environ (Finidori-Lepicard *et al.*, 1981 ; Sadler et Maller, 1981) et le taux d'AMPc diminue de 20 à 80 % selon les études publiées (Speaker et Butcher, 1977 ; Bravo *et al.*, 1978 ; Schorderet-Slatkine *et al.*, 1978 ; Maller *et al.*, 1979 ; Cicirelli et Smith, 1985) **(Figure 13 et 14)**. Cette diminution d'AMPc engendre une inactivation de la PKA environ 30 à 60 minutes après la stimulation hormonale (Wang et Liu, 2004 ; Wang *et al.*, 2006b).

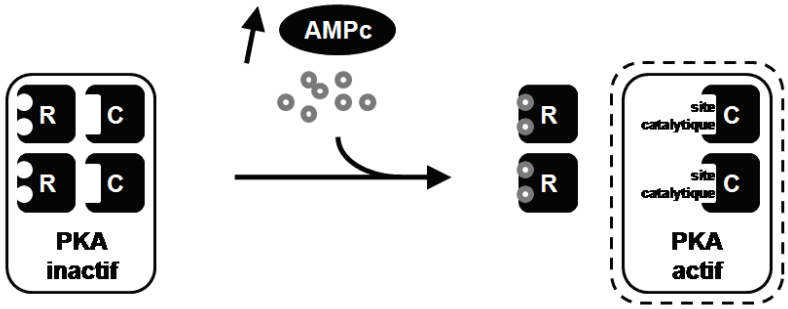


Figure 13 : Mécanismes d'activation de la PKA. La fixation de 4 molécules d'AMPc sur les 2 sous-unités régulatrices (R) de la PKA, libère et active les 2 sous-unités catalytiques (C).

3.1.1. Régulation du taux d'AMPc par les protéines G hétérotrimériques

Dans la cellule, l'activation de l'Adénylate cyclase est sous le contrôle de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (formées de trois sous-unités : Gα,Gβ,Gγ) **(Figure 14)**. L'activité de l'Adénylate cyclase est régulée par deux types de ces protéines G : elle est activée si elle fixe la protéine Gs-GTP (G stimulatrice) et inhibée si elle fixe la protéine Gi-GTP (G inhibitrice). Les sous-unités Gsα et Gβγ joueraient un rôle crucial dans le maintien de l'arrêt en prophase des ovocytes **(Figure 14)**. Plusieurs études suggèrent que les voies de signalisation déclenchées par l'injection d'anticorps ou d'oligonucléotides antisens dirigés contre la sous-unité α de Gs provoque la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale (Gallo *et al.*, 1995 ; Romo *et al.*, 2002). Inversement, la surexpression de la sous-unité Gα sauvage, ou d'une forme constitutivement active, empêche la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Romo *et al.*, 2002). De manière comparable, la surexpression de Gβ1, seule ou associée à Gγ2, bloque la maturation induite par la progestérone (Lutz *et al.*, 2000 ; Sheng *et al.*, 2001) alors que l'injection d'une forme mutante de Gβ1 incapable d'activer l'Adénylate cyclase n'empêche pas la reprise méiotique (Sheng *et al.*, 2005). De plus, la séquestration des sous-unités Gβγ endogènes déclenche la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale, ou accélère la maturation stimulée par la progestérone (Lutz *et al.*, 2000 ; Sheng *et al.*, 2001). Cependant, certains travaux sont en désaccord avec ces résultats. Cicirelli et collaborateurs (1985) n'ont pas observé de diminution de l'AMPc durant la reprise méiotique. Le traitement des ovocytes par l'Acétylcholine, qui diminue le taux d'AMPc, n'a aucun effet sur l'arrêt en prophase I tandis qu'un traitement par l'Adénosine, qui augmente l'AMPc, stimule la reprise méiotique (Gelerstein *et al.*, 1988). De plus, la microinjection de la toxine pertussique, qui inhibe Gi, n'a aucun effet sur la GVBD (Goodhardt *et al.*, 1984 ; Olate *et al.*, 1984) tandis que l'injection du protomère A de la toxine pertussique avant que le MPF ne soit actif inhibe la maturation (Pellaz et Schorderet-Slatkine, 1989).

Les protéines G ne sont actives que sous une forme liée au GTP. L'injection de l'ARNm *xRic-8*, une protéine de la famille GEF (Guanine Exchange Factor) qui stimule l'addition de GTP sur la sous-unité Gα, inhibe la maturation stimulée par la progestérone tandis que l'utilisation d'ARNi visant à bloquer l'expression de cette enzyme induit des maturations spontanées. Ce résultat suggère que xRic-8 participerait au maintien de l'activité de l'Adénylate cyclase en prophase I (Romo *et al.*, 2008). Récemment, deux membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, GPRx et XGPR3, ont été clonés chez le Xénope par deux équipes indépendantes (Deng *et al.*, 2008 ; Rios-Cardona *et al.*, 2008). Ces récepteurs seraient constitutivement activés et contribueraient au maintien de l'arrêt en prophase I **(Figure 14)**. La modulation des niveaux de GPRx perturbe la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Rios-Cardona *et al.*, 2008). La surexpression de XGPR3 augmente les quantités d'AMPc *via* un mécanisme dépendant des protéines Gβγ, et inhibe la maturation *in vitro* et *in vivo* (Deng *et al.*, 2008). De manière surprenante, les auteurs ont également montré que des métalloprotéinases clivaient XGPR3 *in vivo* stimulation par des gonadotropines et que l'induction de ce clivage par un traitement des ovocytes à la collagénase potentialisait la reprise méiotique stimulée par la progestérone.

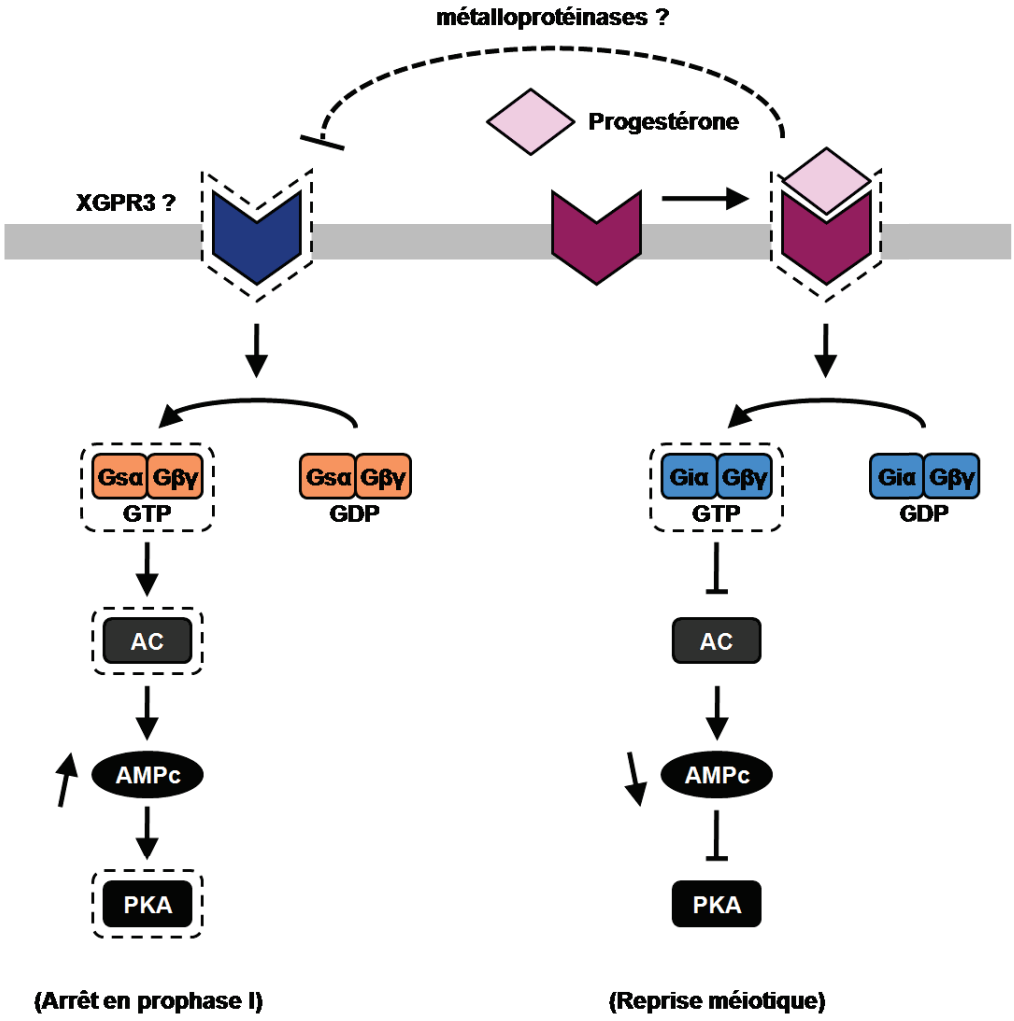


Figure 14 : Régulation de l'AC et de la PKA par les protéines G hétérotrimériques. Dans l'ovocyte immature, l'activité de l'AC est maintenue grâce à un récepteur constitutivement actif couplé à une protéine Gs, alors que le récepteur couplé à Gi est inactif. La PKA est active et maintient l'arrêt en prophase I. Sous l'effet de la progestérone, le récepteur couplé à Gs serait clivé alors que le récepteur couplé à Gi serait activé permettant l'inhibition de l'AC et de la PKA dans l'ovocyte.

3.*1.2. Rôle de l'AMPc et de la PKA dans la reprise méiotique*

De nombreux travaux prouvent que l'inhibition précoce de l'Adénylate cyclase et l'inactivation de la PKA sont nécessaires et suffisantes pour déclencher la reprise méiotique :

Adénylate cyclase : Une Adénylate cyclase (AC) proche de l'AC7 humaine a été clonée dans les ovocytes de stade VI. Elle a été nommée xAC7 par deux équipes indépendantes (Guzman *et al.*, 2004 ; Sheng *et al.*, 2004). Les sous-unités Gsα et Gβγ des petites protéines G coopéreraient pour activer cette Adénylate cyclase **(Figure 14)**. Des agents activateurs de l'Adénylate cyclase comme les Méthylxanthines inhibent la reprise méiotique (O'Connor et Smith, 1976) alors que l'injection d'une forme dominante négative de l'Adénylate cyclase xAC7 provoque des maturations spontanées et accélère la maturation stimulée par la progestérone (Sheng *et al.*, 2004).

PKA : L'injection d'une sous-unité catalytique constitutivement active de la PKA inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone, alors que l'injection d'un inhibiteur de PKA (PKI) ou de la sous-unité régulatrice induit la maturation indépendamment de toute stimulation hormonale (Maller et Krebs, 1977). En 2006, les travaux de Wang et collaborateurs montrent que la réactivation artificielle de la PKA avant la GVBD inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Wang *et al.*, 2006a). Au moment de la GVBD et même après, la réactivation de PKA n'empêche pas la progression méiotique et l'arrêt en métaphase II. Ces observations suggèrent finalement que l'activité de la PKA joue un rôle déterminant dans les étapes précoces de transduction qui précédent l'activation du MPF dans les ovocytes de Xénope **(Figure 14)**. En effet, l'injection d'une sous-unité catalytique de la PKA n'a pas d'effet sur la reprise méiotique induite par la microinjection d'extraits de cytoplasme contenant du MPF actif, bien qu'elle empêche la traduction de la protéine p39Mos stimulée par la progestérone (Matten *et al.*, 1994) et inhibe la reprise méiotique stimulée par l'injection de la protéine p39Mos (Daar *et al.*, 1993).

D'autres travaux montrent que la microinjection d'une sous-unité catalytique inactive de la PKA inhibe également la reprise méiotique. La PKA n'exercerait donc pas son activité inhibitrice *via* la phosphorylation de ses protéines cibles, mais *via* une activité de séquestration lors de la reprise méiotique (Schmitt et Nebreda, 2002b, a). Ces travaux sont controversés par ceux d'Eyers et collaborateurs (2005) qui montrent que le mutant utilisé par Schmitt et Nebreda (K72R PKAc) présente une faible activité résiduelle et qu'il pourrait se lier aux sous-unités régulatrices endogènes de la PKA et ainsi provoquer une libération des sous-unités catalytiques.

3.2. Hydrolyse des lipides membranaires

Dans les cellules somatiques, les récepteurs couplés à certaines protéines G, Gq et Go, agissent sur le métabolisme des phosphoinositides. Les protéines G activent la Phospholipase C (PLC) qui clive le Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en 1,2-Diacylglycerol (DAG). L'IP3 diffuse et conduit à la libération de calcium en se liant à son récepteur spécifique au niveau du réticulum endoplasmique. Le DAG a pour rôle d'activer une famille de protéines kinases : les PKC (Protéines Kinases C) **(Figure 15)**.

3.2.1. La Phospholipase C (PLC)

La sous-unité α des protéines Gq ne semble pas nécessaire à la reprise méiotique induite par la progestérone, cependant sa microinjection peut provoquer la GVBD dans des proportions variables suivant les lots d'ovocytes (Guttridge *et al.*, 1995). La microinjection des Phospholipases A2, C et D stimule la reprise méiotique des ovocytes de Xénope (Carnero et Lacal, 1993). L'effet est relayé par les seconds messagers générés par ces enzymes : l'Acide Arachidonique, le DAG et les Acides Phosphatidiques. L'injection d'un analogue du DAG, le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), induit la méiose (Stith et Maller, 1987 ; Pan et Cooper, 1990)

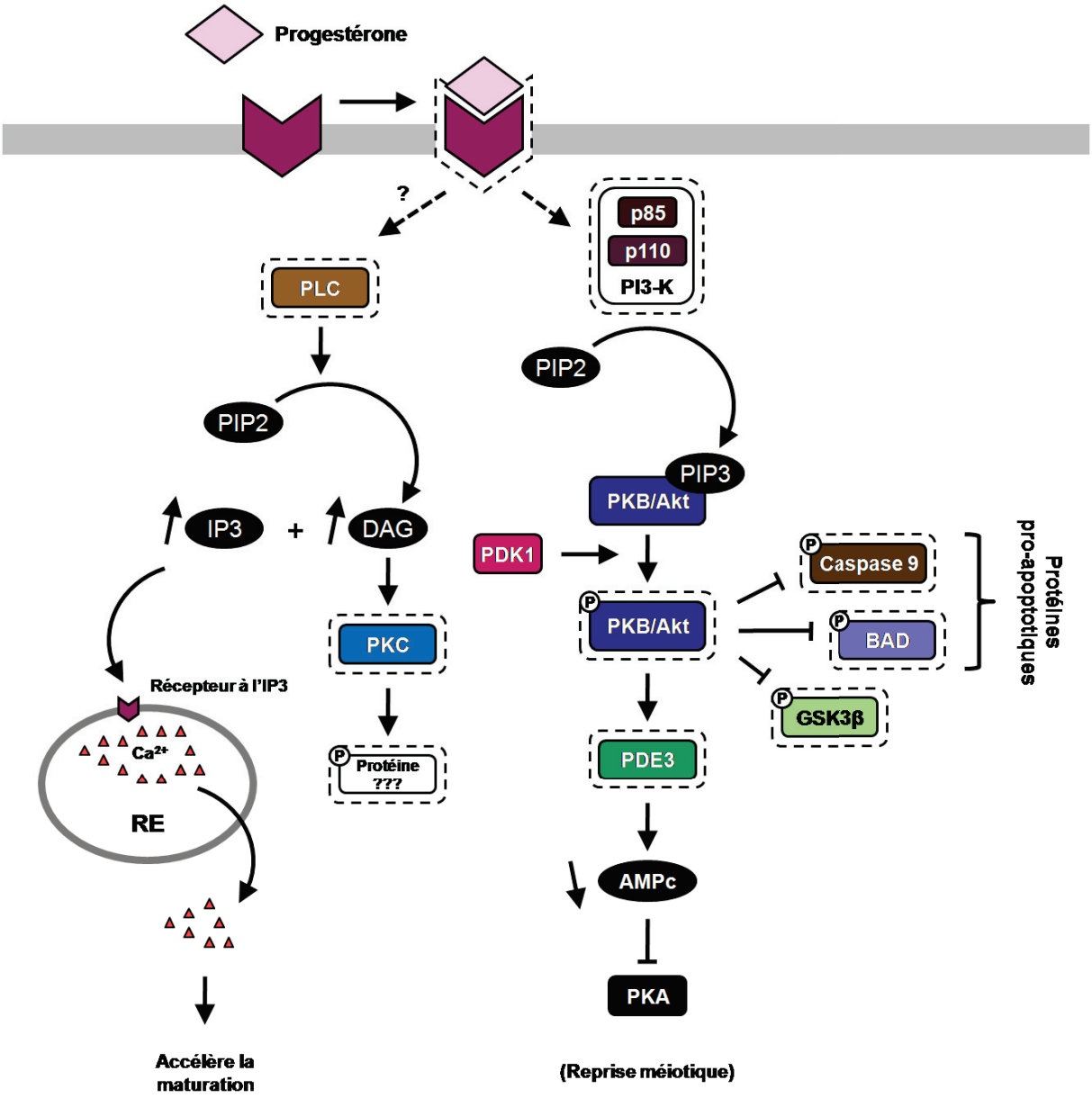


Figure 15 : Métabolisme des phosphoinositides et activation de la voie PI3-K lors de la reprise méiotique. La stimulation des protéines G provoque l'activation de la Phospholipase C (PLC). Cette dernière scinde le Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en 1,2-Diacylglycérol (DAG). L'IP3 diffuse à travers le cytoplasme et se fixe aux récepteurs présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, provoquant ainsi la libération de calcium (Ca^{2+}). La Protéine Kinase C (PKC) est activée par le DAG. La PI3-K est une enzyme qui phosphoryle les phosphoinositides en position D3 de l'inositol pour former le Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). L'accumulation de PIP3 permet l'activation de PKB/Akt, activatrice de la Phosphodiestérase-3 (PDE3). PKB/Akt phosphoryle de nombreuses cibles telles que les protéines pro-apoptotiques Caspase 9, Bad ou encore une protéine régulatrice de la traduction, GSK-3β.

La stimulation de la GVBD, par microinjection de la PLC, est dépendante de l'activité de la PKC (Carnero et Lacal, 1993). Cependant, le métabolisme des phospoinositides au cours de la reprise méiotique est un sujet d'étude controversé. Certains auteurs ont montré que la quantité de DAG ovocytaire diminue de 30% dans les 15 secondes qui suivent l'application de la progestérone, et de 60% après cinq minutes. Le taux d'AMPc revient à sa valeur initiale après 15 minutes (Varnold et Smith, 1990). En opposition avec ces résultats, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation des niveaux d'IP3 et de DAG pendant la reprise méiotique (Wasserman *et al.*, 1990 ; Han *et al.*, 1992 ; Stith *et al.*, 1992). Selon Wasserman (1992) la diminution du niveau de DAG serait dûe à un artefact en réponse à l'éthanol dans lequel est solubilisée la progestérone.

3.2.2. Les Protéines Kinases C (PKC)

La famille des PKC regroupe différentes isoformes, classées en trois catégories selon la structure de leur domaine régulateur N-terminal (Sampson et Cooper, 2006). Dès les années 1980, la présence d'une PKC activable par un analogue du DAG, le TPA, a été décrite dans les ovocytes de Xénope (Laurent *et al.*, 1988). Les ovocytes immatures contiennent les isoformes PKCα, β, γet ζ mais pas les formes δ et ε (Dominguez *et al.,* 1992). Le rôle exact de la PKC lors de la reprise méiotique n'a pas été clarifié **(Figure 15)**. PKCζ semble requise lorsque la GVBD est stimulée, soit par l'insuline, soit par les injections de p21Ras ou de PLC (Dominguez *et al.*, 1992). L'injection de PKCζ déclenche la reprise méiotique des ovocytes et l'activation des voies MPF et MAPK de manière dépendante de la synthèse protéique (Berra *et al.*, 1993 ; Carnero *et al.*, 1995). L'incubation des ovocytes dans un milieu contenant des esters de phorbols, qui activent la PKC, entraine la reprise méiotique selon certains auteurs (Stith et Maller, 1987 ; Pan et Cooper, 1990) alors que pour d'autres, le traitement n'induit pas la maturation (Bement et Capco, 1990). La sphingosine ou la staurosporine, inhibiteurs de la PKC, retardent voire inhibent la GVBD stimulée par la progestérone (Varnold et Smith, 1990). D'autres auteurs observent l'effet inverse et montrent que la staurosporine potentialise l'effet maturant de la progestérone (Stith *et al.*, 1992). Le rôle de PKC reste donc controversé.

3.2.3. La Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)

La Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase ou PI3-K) est une enzyme impliquée dans le métabolisme des phosphatidylinositols. Il existe quatre types de PI3-K (α, β, γ, δ) qui possèdent, en plus de leur activité lipide kinase, une activité protéine kinase au moins *in vitro* (Bondeva *et al.*, 1998 ; Roche *et al.*, 1998 ; Vanhaesebroeck *et al.*, 1999 ; Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999). Constituée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110), cette protéine hétérodimèrique est capable de catalyser la phosphorylation du PIP2 en PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) et d'activer la Protéine Kinase B (PKB/Akt) **(Figure 15)**. La liaison de PKB/Akt au PIP3 provoque sa translocation à la membrane plasmique. PKB/Akt y est alors phosphorylée par PDK2 de manière à modifier sa conformation et à faciliter une nouvelle phosphorylation catalysée par PDK1 (Phosphatidylinositol Dependent protein Kinase1 et 2) (Woodgett, 2005). La voie de signalisation nommée PI3-K/Akt régule de nombreux processus cellulaires, en particulier la

prolifération et l'apoptose. Cette voie est dérégulée dans de nombreux cancers (Martelli *et al.*, 2007). Les substrats de la PKB/Akt renferment différentes protéines pro-apoptotiques et une protéine sérine kinase désignée sous le nom de Glycogène Synthase Kinase-3β (GSK-3β) (White *et al.*, 1988 ; Saltiel et Kahn, 2001) **(Figure 15)**. Ces dernières phosphorylent des facteurs de transcription, des protéines structurales et des enzymes du métabolisme (Cross *et al.*, 1995). Lors de la reprise méiotique, GSK-3β régulerait négativement la polyadénylation et la traduction protéique en phosphorylant Aurora-A/Eg2.

En réponse à la progestérone, la PI3-K est activée (Muslin *et al.*, 1993a). La forme active de la PI3-K s'associe au récepteur classique à la progestérone (xPR) suggérant l'implication de l'enzyme dans la maturation ovocytaire (Bagowski *et al.*, 2001b). Expérimentalement, l'injection de formes constitutivement actives de la PI3-K provoque la GVBD en absence de stimulation hormonale (Deuter-Reinhard *et al.*, 1997 ; Hehl *et al.*, 2001 ; Mood *et al.*, 2004). L'expression de la PI3Kγ provoque la phosphorylation de PKB/Akt et des MAPK. Son action sur la GVBD semble être dépendante de son activité lipide kinase (Hehl *et al.*, 2001). L'injection d'ARNm codant PKB/Akt suffit également à diminuer le taux d'AMPc et à provoquer la reprise méiotique en stimulant l'activité de la Phosphodiestérase-3 (PDE3) (Andersen *et al.*, 1998). Ces résultats soulignent donc que, lors de la reprise méiotique, l'activation de la voie PI3-K/Akt contribue à l'inhibition précoce de la PKA.

Les travaux soulignant l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la reprise méiotique aboutissent à des résultats contradictoires et tendent à démontrer que la PI3-K ne joue qu'un rôle modeste dans la maturation stimulée par la progestérone. En effet, l'injection d'un mutant de la PI3-K adressé à la membrane plasmique ou d'un mutant de la protéine H-Ras capable d'activer de manière constitutive la PI3-K sont tous deux incapables de déclencher la GVBD en absence de stimulation hormonale (Gaffre *et al.*, 2006). Pour certains auteurs, l'injection d'une forme dominante négative de la PI3-K mutée sur son domaine SH2 inhibe la maturation stimulée par la progestérone (Muslin *et al.*, 1993a). Un tel effet n'est jamais observé pour d'autres auteurs (Mood *et al.*, 2004). De plus, des inhibiteurs de la PI3-K comme la Wortmannine ou le LY294002 ne bloquent la reprise méiotique que lorsqu'elle est stimulée par l'insuline (Liu *et al.*, 1995 ; Lopez-Hernandez et Santos, 1999). Dans le cas d'une stimulation par la progestérone, l'inhibition de PI3-K n'engendrent qu'un retard de maturation (Bagowski *et al.*, 2001b ; Hehl *et al.*, 2001 ; Mood *et al.*, 2004 ; Gaffre *et al.*, 2006). De la même façon, l'inositol phosphatase SIP/SHIP (Signaling Inositol Phosphatase/SH2 containing Inositol Phosphatase) inhibe la reprise méiotique stimulée par l'insuline ou la PI3-K, mais pas celle stimulée par la progestérone (Deuter-Reinhard *et al.*, 1997). Enfin, l'inhibition de PKB/Akt ne provoque que 30% d'inhibition de la maturation stimulée par la progestérone alors que l'inhibition est totale si les ovocytes sont traités par l'insuline (Andersen *et al.*, 2003).

3.3. Cas spécifique d'une stimulation par l'insuline ou l'IGF1

Le récepteur à l'IGF1 a été cloné. Il est à 76% identique au récepteur humain à l'IGF1 et à 57% identique au récepteur humain à l'insuline. Cette identité est maximale au niveau du

domaine tyrosine kinase (Zhu *et al.*, 1998). La microinjection d'anticorps anti-phosphotyrosine ou de tyrosine phosphatases dans l'ovocyte de Xénope bloque la reprise méiotique stimulée par l'insuline ou l'IGF1 (Cicirelli *et al.*, 1990 ; Hainaut *et al.*, 1991a ; Hainaut *et al.*, 1991b). Dans l'ovocyte de Xénope, XIRS1 relaie les effets de l'insuline et de l'IGF1 (Chuang *et al.*, 1993b ; Chuang *et al.*, 1993a).

Lorsque les ovocytes sont stimulés par l'insuline/IGF1, deux voies de signalisation sont principalement activées : une impliquant PI3-K et une autre impliquant p21Ras **(Figure 16)**.

- La phosphorylation de XIRS1 entraîne la liaison et l'activation de la PI3-K (Chuang *et al.*, 1993b ; Chuang *et al.*, 1993a ; Liu *et al.*, 1995) nécessaire pour la GVBD (Muslin *et al.*, 1993a ; Liu *et al.*, 1995 ; Deuter-Reinhard *et al.*, 1997 ; Lopez-Hernandez et Santos, 1999). L'insuline/IGF1 ou la microinjection de PI3-K dans les ovocytes entraîne l'activation de la protéine kinase PKB/Akt (Lopez-Hernandez et Santos, 1999 ; Hehl *et al.*, 2001). En présence de progestérone, cette activation est plus lente et plus modeste. L'action de PKB/Akt serait relayée par l'activation de la PDE3 qui conduit à une diminution du taux intracellulaire d'AMP cyclique et donc à une inhibition de la PKA (Andersen *et al.*, 2003). L'insuline et l'IGF1 diminuent la production d'AMPc en stimulant également l'activité des phosphodiésterases et en inhibant l'activité de l'Adénylate cyclase (Sadler et Maller, 1987). Nous noterons que si l'activation de PKB/Akt est indispensable à la GVBD induite par l'insuline, elle n'est pas requise pour celle stimulée par la progestérone. Un dominant négatif de PKB/Akt ou l'injection d'un anticorps anti-Akt bloque complètement la reprise méiotique par l'insuline mais partiellement, à environ 30%, la GVBD stimulée par la progestérone (Andersen *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'IBMX, la Théophylline ou la Papavérine, des inhibiteurs de phosphodiésterases (PDE), bloquent la reprise méiotique stimulée par l'insuline ou l'IGF1 à des concentrations 17 à 60 fois inférieures à celles nécessaires pour obtenir le même résultat en présence de progestérone (Sadler et Maller, 1989).

- Outre PI3-K, l'activation du récepteur à l'IGF1 conduit à l'activation de p21Ras. Dans les ovocytes de Xénope, l'insuline/IGF1 stimule l'association de p21Ras endogène au niveau la membrane plasmique (Davis et Sadler, 1992) et requiert PKCζ pour déclencher la reprise méiotique (Dominguez *et al.*, 1992). L'activation de la voie MAPK et la GVBD stimulée par l'injection d'une forme oncogénique de p21Ras dépendraient de la MAP3K/Raf puisqu'elles sont bloquées après l'injection d'un dominant négatif de Raf (Fabian *et al.*, 1993a). Néanmoins, dans ces cellules et en comparaison avec les cellules somatiques, il a par la suite été montré que l'activation de la voie MAPK stimulée par l'insuline est pleinement dépendante de l'activation de la MAP3K/p39Mos au travers une boucle de rétroaction amorcée par le MPF (Baert *et al.*, 2003). Enfin, il est intéressant de noter que la microinjection d'une forme oncogénique de p21Ras déclenche la GVBD en absence d'activation des MAPK (Dupre *et al.*, 2002b). Ces dernières observations suggèrent que l'insuline déclenche la reprise méiotique principalement *via* l'activation de PI3-K et de PKB/Akt, et la stimulation de PDE3 bien que cette dernière ne soit pas requise pour la maturation stimulée par la progestérone (Andersen *et al.*, 2003).

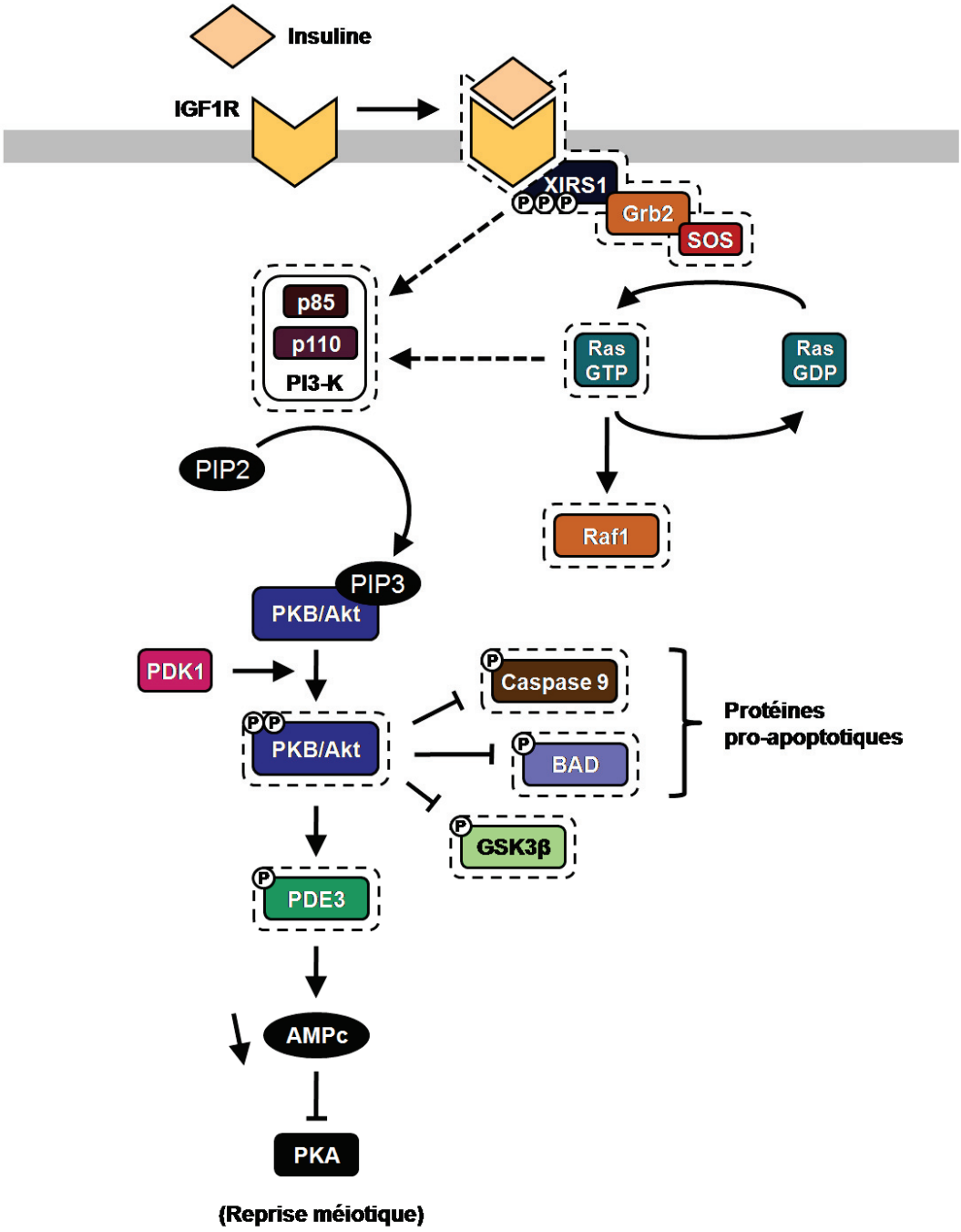


Figure 16 : Événements précoces lors d'une reprise méiotique stimulée par l'insuline. En réponse à une stimulation, le domaine SH2 de Grb2 se lie à l'XIRS phosphorylé et recrute SOS, une protéine du cytoplasme pourvue d'une activité d'échange de nucléotides guanyliques. Après libération du GDP, p21Ras fixe le GTP et conduit à la phosphorylation de Raf1 **(Page 76)**. En parallèle, la protéine PI3-K, dont la sous-unité p85 contient deux domaines SH2 capables de fixer l'XIRS et d'entraîner l'activation de la sous-unité catalytique p110, stimule l'activation de PKB/Akt et inhibe les PKA.

.

4. Contrôle de la traduction par la polyadénylation cytoplasmique

4.1. La synthèse protéique est nécessaire à la reprise méiotique

Dans les heures qui suivent l'application de la progestérone sur les ovocytes de Xénope, le taux de synthèse protéique double, augmentant de 17 à 35 ng/heure/ovocyte. Cette augmentation se produit également lorsque la maturation est déclenchée par microinjection de cytoplasme d'ovocytes matures. Dans cette dernière condition, l'augmentation de la synthèse protéique est quasiment instantanée (Wasserman et Smith, 1981). Par ailleurs, la transcription de nouveaux ARNm n'est pas nécessaire à la maturation. En effet, la reprise méiotique déclenchée par la progestérone n'est pas inhibée dans les ovocytes énucléés ou dans les ovocytes traités par un inhibiteur de la transcription : l'Actinomycine D (Schorderet-Slatkine et Drury, 1973 ; Reynhout et Smith, 1974). Les voies stimulées par la progestérone et l'insuline requièrent néanmoins la traduction d'ARNm maternels. La Cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, bloque la maturation qu'elle soit stimulée par la progestérone (Wasserman et Masui, 1975a) ou par l'insuline/IGF1 (El-Etr *et al.*, 1979). Les protéines RINGO/Speedy, p39Mos, certaines Cyclines, XErp1/Emi2, XCdh1, Wee1, Cdk2 sont les principales protéines synthétisées impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

L'augmentation, de six à huit fois, de la phosphorylation de la protéine ribosomal S6 coïncide avec l'augmentation de la synthèse protéique (Hanocq-Quertier et Baltus, 1981 ; Wasserman et Houle, 1984). Dans les ovocytes de stade VI, la quantité de ribosomes est largement supérieure à la quantité nécessaire pour la traduction (Taylor *et al.*, 1985 ; Smith, 1986) et permet le doublement de la quantité d'ARNm au niveau des polysomes durant la reprise méiotique (Woodland, 1974). L'activité ribosomale détectée dans les ovocytes de Xénope fait de cette cellule un excellent modèle d'expression hétérologue puisque les ARNm exogènes injectés dans des ovocytes de stade VI sont traduits au même niveau que les ARNm endogènes (Richter et Smith, 1981). Cependant, tous les ARNm d'origine maternelle ne sont pas traduits simultanément. La régulation de leur traduction est finement contrôlée d'un point de vue spatio-temporel. En effet, il est apparu que d'autres facteurs que la protéine ribosomale S6 régulent la synthèse protéique et que certains d'entre eux empêchent le recrutement des ARNm au niveau des ribosomes (Richter *et al.*, 1982). La disponibilité du facteur d'initiation eIF-4 (elongation Initiation Factor), situé au niveau de la coiffe de l'ARNm, est à ce titre un facteur limitant de la synthèse protéique dans l'ovocyte de Xénope (Audet *et al.*, 1987). Enfin, des études plus récentes démontrent que la polyadénylation des ARNm apparaît comme un processus essentiel aux mécanismes de régulation traductionnelle au cours de la maturation (Sheets *et al.*, 1995 ; de Moor et Richter, 2001 ; Mendez et Richter, 2001).

Dans l'ovocyte immature, les ARNm stockés présentent une queue poly(A) courte de 20 à 40 nucléotides, ce qui réprime leur traduction. Ces derniers ARNm sont dit « masqués » ou dormants. Lors de la reprise méiotique, la queue poly(A) de certains ARNm dormants, dont *mos*, *cycline A1, B1 et B2*, *wee1* ou encore *ringo/speedy*, s'allonge de 80 à 250 nucléotides rendant ces ARNm maternels traductibles (Sheets *et al.*, 1995 ; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996 ; Charlesworth *et al.*, 2000 ; Padmanabhan et Richter, 2006). Les ARNm polyadénylés sont

traduits tandis que les ARNm dormants se dissocient des ribosomes et ne sont pas traduits (Paris et Philippe, 1990). Des oligonucléotides antisens dirigés contre les séquences de polyadénylation inhibent la maturation induite par la progestérone, ce qui souligne l'importance de la polyadénylation dans ce processus (Sheets *et al.*, 1995). L'addition d'une queue poly-A prosthétique est quant à elle suffisante pour déclencher la traduction d'un ARNm (Barkoff *et al.*, 1998).

4.2. Formation et régulation du complexe de polyadénylation

La polyadénylation cytoplasmique des ARNm d'origine maternelle apparaît comme un processus essentiel qui permet de réguler finement l'expression des protéines dans le temps et l'espace au cours de la maturation ovocytaire. Le contrôle traductionnel des ARNm est corrélé avec un changement de la polyadénylation des ARNm (Richter, 1991). La reconnaissance de ces ARNm par la machinerie de polyadénylation est permise par le complexe de polyadénylation **(Figure 17)**.

Ce complexe se fixe en région 3'UTR de l'ARNm dormant *via* deux séquences particulières :

- Le signal de polyadénylation A2UA3 (Fox *et al.*, 1989) ;
- Le CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element), un élément de polyadénylation cytoplasmique riche en uridine dont la séquence consensus U5AU est localisée une cinquantaine de base en amont du signal de polyadénylation (McGrew *et al.*, 1989 ; Mendez et Richter, 2001)

Le complexe de polyadénylation est constitué de 4 protéines :

- La protéine CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) qui se fixe sur le CPE (Hake et Richter, 1994 ; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996) ;
- Le facteur CPSF (Cleavage and Poly(A) Specificity Factor) qui s'associe avec la CPEB (Dickson *et al.*, 1999 ; Mendez *et al.*, 2000a) ;
- La protéine d'échafaudage Symplekine (Hofmann *et al.*, 2002) ;
- La poly(A) polymérase XGld2 (Xenopus Germ-line development factor 2) (Barnard *et al.,* 2004).

Le complexe CPEB-CPSF-Symplekine-XGld2 est déjà fixé sur les ARNm dormants dans l'ovocyte immature (Barnard *et al.*, 2004), mais il serait maintenu inactif par différentes autres protéines (Radford *et al.*, 2008) :

- La fixation sur le complexe de la poly(A) ribonucléase PARN, une enzyme de déadénylation, le rend inactif (Kim et Richter, 2006). Au cours de la reprise méiotique, la phosphorylation de CPEB sur la sérine 174 renforcerait son association au complexe de polyadénylation et permettrait surtout l'éjection de la PARN, autorisant alors l'élongation de la queue poly(A) (Mendez *et al.*, 2000b ; Mendez *et al.*, 2000a ; Kim et Richter, 2006). L'identité de la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 174 de CPEB est un sujet de controverse. Pour certains auteurs, il s'agirait de la kinase Aurora A/Eg2 (Mendez *et al.*, 2000b ; Mendez *et al.*, 2000a). La surexpression d'Eg2 accélère l'accumulation de p39Mos, l'activation des MAPK et la GVBD. De plus, elle diminue la concentration de

progestérone requise pour déclencher la reprise de la méiose (Andresson et Ruderman, 1998). L'injection d'une protéine Eg2 constitutivement active est également capable d'induire la GVBD, la synthèse de p39Mos, l'activation du MPF et des MAPK, indépendamment de toute stimulation hormonale. Cependant, l'inhibition ou la déplétion d'Eg2 n'empêche pas la phosphorylation de CPEB (Keady *et al.*, 2007).

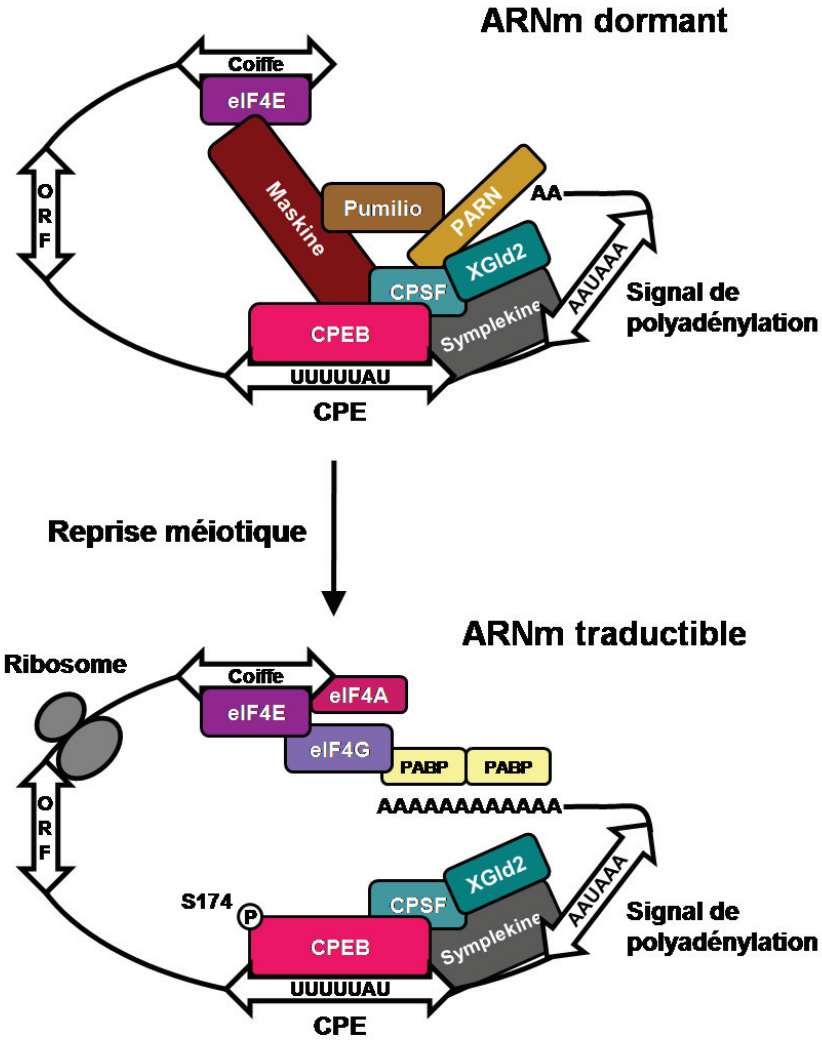


Figure 17 : Activation de la polyadénylation cytoplasmique lors de la reprise méiotique. Dans l'ovocyte immature, le complexe CPEB-CPSF-Symplekine-XGld2 est déjà fixé sur la séquence CPE située en 3'UTR des ARNm. La déadénylase PARN empêche l'élongation de la queue polyA. La Maskine interagit avec CPEB et eIF-4E bloquant toute traduction. Lors de la reprise méiotique, la phosphorylation de CPEB entraine un réarrangement du complexe qui aboutit à l'éjection de PARN et de la Maskine, et active la poly(A)-polymérase de XGld2. Les ribonucléases PAPB se fixent alors sur la queue poly(A) ce qui permet le recrutement des eIF-4G et eIF-4A afin d'amorcer la traduction. La coiffe (7mGpppN) est trouvée à l'extrémité 5' des ARNm. L'ORF (Open Reading Frame) permet l'amorçage de la traduction par le ribosome.

La voie GSK-3-Aurora A/Eg2 relierait les étapes précoces de la maturation à la synthèse protéique. *In vitro*, GSK-3 phosphoryle Eg2 sur le résidu sérine 290 et sérine 291, ce qui conduit à l'autophosphorylation d'Eg2 sur le résidu sérine 349. Ces phosphorylations diminuent la capacité d'Eg2 à phosphoryler la CPEB (Sarkissian *et al.*, 2004). GSK-3 exercerait donc un rôle négatif sur la traduction des ARNm. Ces données confirment des résultats qui montrent que GSK-3 est active dans les ovocytes de Xénope arrêtés en prophase I et qu'elle est inactivée dès la reprise méiotique déclenchée par la progestérone (Fisher *et al.,* 1999a). L'expression d'une forme dominante négative de GSK-3,ou l'injection d'un anticorps la neutralisant, accélère la maturation (Fisher *et al.*, 1999a). Dans le cas particulier de l'insuline, l'activation d'Eg2 est contrôlée par la PKC et la PI3-K (Sarkissian *et al.*, 2004).

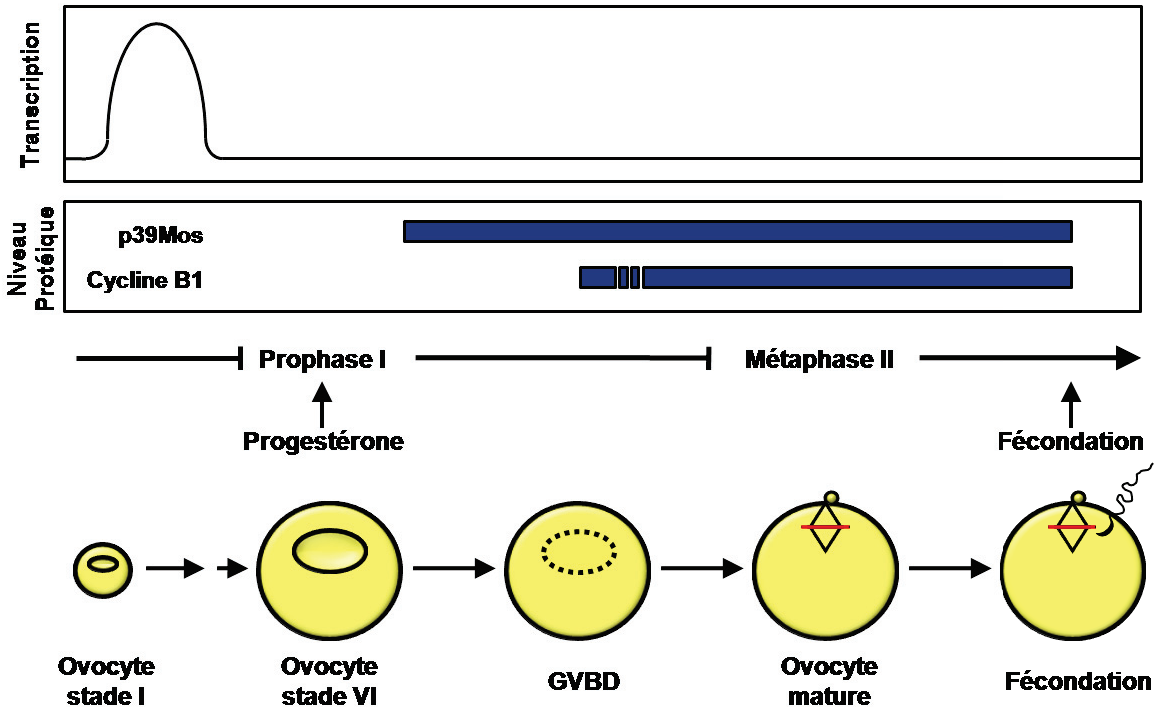
- La Maskine, une protéine associée à la fois avec CPEB et avec le facteur d'initiation de la traduction eIF-4E en region 5'UTR des ARNm (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999), contrôle également la traduction. L'interaction Maskine-eIF-4E prévient l'association du facteur eIF-4G avec eIF-4E, inhibant ainsi la traduction. La phosphorylation de CPEB et l'élongation de la queue poly(A) permettent alors la fixation de la ribonucléase PABP (Poly(A) Binding Protein) sur celle-ci (Cao et Richter, 2002). Ce phénomène libère la Maskine de sa fixation à eIF-4E, autorise le recrutement d'eIF-4G, et coïncide avec la polyadénylation cytoplasmique (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999 ; Richter et Sonenberg, 2005).
- Outre la Maskine, Pumilio est également impliquée dans la répression de la traduction des ARNm. Pumilio appartient à un groupe de protéines qui lient les ARN. Conservé au cours de l'évolution, ce groupe de protéines a un rôle dans le contrôle transcriptionnel chez différents organismes (Crittenden *et al.*, 2003 ; Kuersten et Goodwin, 2003 ; Gu *et al.*, 2004). Le mode d'action de Pumilio est encore mal connu, néanmoins la protéine interviendrait dans la régulation de la traduction de Ringo (Wickens *et al.*, 2002).

4.3. Régulation temporelle de la polyadénylation

Au cours de la maturation, tous les ARNm dormants ne sont pas activés en même temps. Si certains ARNm comme l'*actine* sont déadénylés lors d'une stimulation par la progestérone, d'autres sont polyadénylés selon plusieurs vagues séquentielles de polyadénylation définissant un circuit défini de traduction protéique qui contrôle le bon déroulement de la maturation (Belloc et Mendez, 2008). Il existe deux types d'ARNm : des ARNm de classe I (*e.g. mos, aurora A/Eg2, ringo, cdk2, histone-like B4*) et des ARNm de classe II (*e.g. cycline B1 et B4, wee1, emi2, cdc6*) dont la polyadénylation est respectivement précoce et tardive (de Moor et Richter, 1997 ; Charlesworth *et al.*, 2002 ; Charlesworth *et al.*, 2004) **(Figure 18)**.

4.3.1. *Polyadénylation précoce des ARNm de classe I*

Les ARNm de classe I présentent une séquence PRE (Polyadenylation Response Element) dans leur région 3'UTR. Celle-ci est retrouvée dans 2-3% des ARNm de Xénope. Une séquence PRE consensus est proposée dans les travaux de Charlesworth et collaborateurs (2004). Elle serait essentielle dans la régulation de la polyadénylation et de la synthèse précoce de p39mos. Ces points seront plus amplement détaillés à la **Page 79**.



Transcrits	État de la queue poly(A)				
Déadénylés	-AAAAAA	-A	-A	-A	-A
Classe I	-A	-AAAAAA	-AAAAAA	-AAAAAA	-AAAAAA
Classe II	-A	-A	-AAAAAA	-AAAAAA	-A

Figure 18 : Cinétique de polyadénylation et de synthèse protéique lors de la reprise méiotique. Dans les ovocytes de stade VI, les ARNm dormants ont une queue poly(A) courte. Lors de la reprise méiotique, la synthèse de p39Mos débute avant celle de la Cycline B1. La queue poly(A) s'allonge (-AAAAAA) stimulant la traduction des protéines. L'état de polyadénylation des différents ARNm varie au cours de la maturation. Les ARNm de Classe I sont polyadénylés précocement et indépendamment de CPEB. Adapté d'après Mendez et Richter (2001).

Si la régulation de la polyadénylation stimulée par le PRE est totalement indépendante de CPEB, cette dernière serait sensible à l'activité des MAPK (Charlesworth *et al.*, 2002 ; Charlesworth *et al.*, 2004). Par ailleurs, la protéine Musashi, qui se lie sur la séquence PRE des ARNm, jouerait un rôle primordial dans la régulation temporelle de la polyadénylation des ARNm de classe I et donc dans la synthèse protéique précoce lors de la reprise méiotique. En effet, l'expression d'une forme dominante négative de cette protéine inhibe la synthèse de p39Mos ainsi que la reprise méiotique (Charlesworth *et al.*, 2006). L'action de Musashi reste cependant à préciser mais ne semble pas réguler la synthèse des RINGO/Speedy (Arumugam *et al.*, 2010). Curieusement, la régulation positive de la synthèse protéique exercée par Musashi dans l'ovocyte de Xénope contraste avec le rôle répresseur de la traduction exercé par la même protéine dans les cellules souches neurales (Okano *et al.*, 2002 ; Okano *et al.*,

2005). *In fine*, la polyadénylation stimulée par le PRE serait relayée par une polyadénylation dépendante de CPEB (Charlesworth *et al.*, 2002) **(Figure 19)**.

Présente dans tous les ovocytes immatures, CPEB fixe le CPE présent dans 7-11% des ARNm de Xénope. CPEB jouerait un rôle crucial dans la régulation de la polyadénylation précoce puisque l'injection d'anticorps anti-CPEB ou d'une forme dominante négative de la protéine bloque la polyadénylation de p39Mos ainsi que la GVBD (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996 ; Mendez *et al.*, 2000a). Peu après la reprise méiotique, CPEB est phosphorylée par Aurora A/Eg2 sur son résidu sérine 174 (Mendez *et al.*, 2000a). Synthétisée très précocement *via* son PRE, Aurora A/Eg2 régule positivement l'interaction entre la CPEB et le CPSF de manière à stimuler une première vague de polyadénylation précoce **(Figure 19)**. Les protéines MAPK stimulent également l'activité de CPEB *in vitro* en la phosphorylant sur les thréonines 22 et 164, puis sérines 184 et 248. Les MAPK seraient néanmoins incapables de phosphoryler la sérine 174, le résidu clef régulateur de CPEB (Keady *et al.*, 2007).

4.3.2. *Polyadénylation tardive des ARNm de classe II*

La polyadénylation cytoplasmique tardive se produit après l'activation du MPF. Elle est essentielle à la transition entre les deux divisions de méiose et requiert la dégradation de CPEB (Mendez *et al.*, 2002). À la différence des ARNm de classe I, les ARNm de classe II possèdent souvent plusieurs séquences CPE, voire une séquence CPE qui chevauche le signal de polyadénylation. Identifié dans la région 3'UTR des ARNm *cycline A1* et *B1*, et initialement appelé « Mos Response Element » pour sa sensibilité à p39Mos, ce chevauchement possède la séquence consensus (U4[A2U)A3] (de Moor et Richter, 1997) **(Figure 19)**. Avant la GVBD et l'activation du MPF, il existerait un stock de CPEB libres, capables de se fixer sur cette double séquence 'CPE/signal de polyadénylation'. Au moment de la GVBD, les CPEB seraient hyperphosphorylées par Cdc2 provoquant ainsi son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome dans l'heure qui suit la rupture de l'enveloppe nucléaire (Reverte *et al.*, 2001 ; Mendez *et al.*, 2002 ; Thom *et al.*, 2003). Une fois la séquence 'CPE/signal de polyadénylation' libérée, le complexe de polyadénylation s'y fixe et amorce la traduction des protéines concernées (Mendez *et al.*, 2002 ; Setoyama *et al.*, 2007).

En 2010, les travaux de Igea et Mendez ont démontré qu'une autre CPEB est synthétisée précocement lors de la maturation et s'accumulerait jusqu'à l'arrêt de la cellule en métaphase II (Igea et Mendez, 2010). CPEB4 substituerait CPEB1 dégradée et recruterait XGld2 pour permettre la synthèse protéique tardive (Cycline B1 et B4, *etc.*) et très tardive (Cycline E, XErp1/Emi2, *etc.*). CPEB4 ne contient pas de site de phosphorylation connu pour Aurora A/Eg2. Son mode de régulation pourrait faire intervenir des kinases spécifiques de la transition entre les deux divisions de méiose. Enfin, la déplétion de CPEB4 altérerait la progression méiotique entre la métaphase I et II, suggérant un rôle essentiel dans la régulation de la cinétique de polyadénylation des ARNm peu avant l'arrêt en métaphase II des ovocytes.

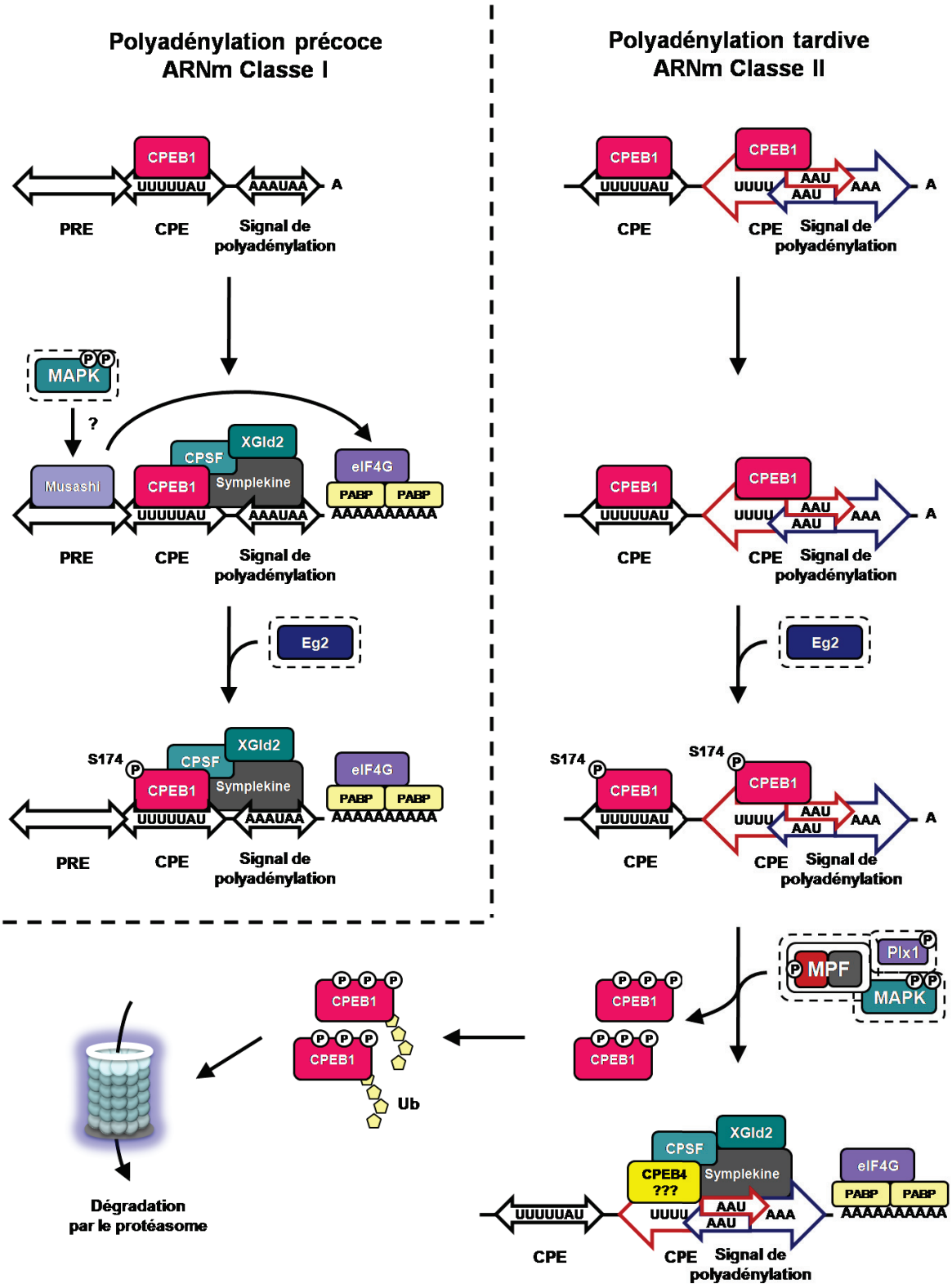


Figure 19 : Régulation de la polyadénylation des ARNm de type I et II. Au cours de la maturation ovocytaire, la cinétique de polyadénylation varie d'un ARNm à un autre. Les ARNm de type I sont polyadénylés précocement *via* le PRE, puis *via* la phosphorylation de CPEB1 par Eg2. Les ARNm de type II présentent des séquences CPE qui chevauchent le signal de polyadénylation. La phosphorylation de CPEB1 et sa dégradation amorcera la polyadénylation dite tardive.

5. Le MPF : M-phase Promoting Factor

Les expériences de Masui et Markert (1971) ont montré que le cytoplasme issu d'un ovocyte mature de *Rana pipiens* contient un facteur capable de déclencher la maturation lorsqu'il est injecté dans un ovocyte immature receveur **(Figure 20)**.

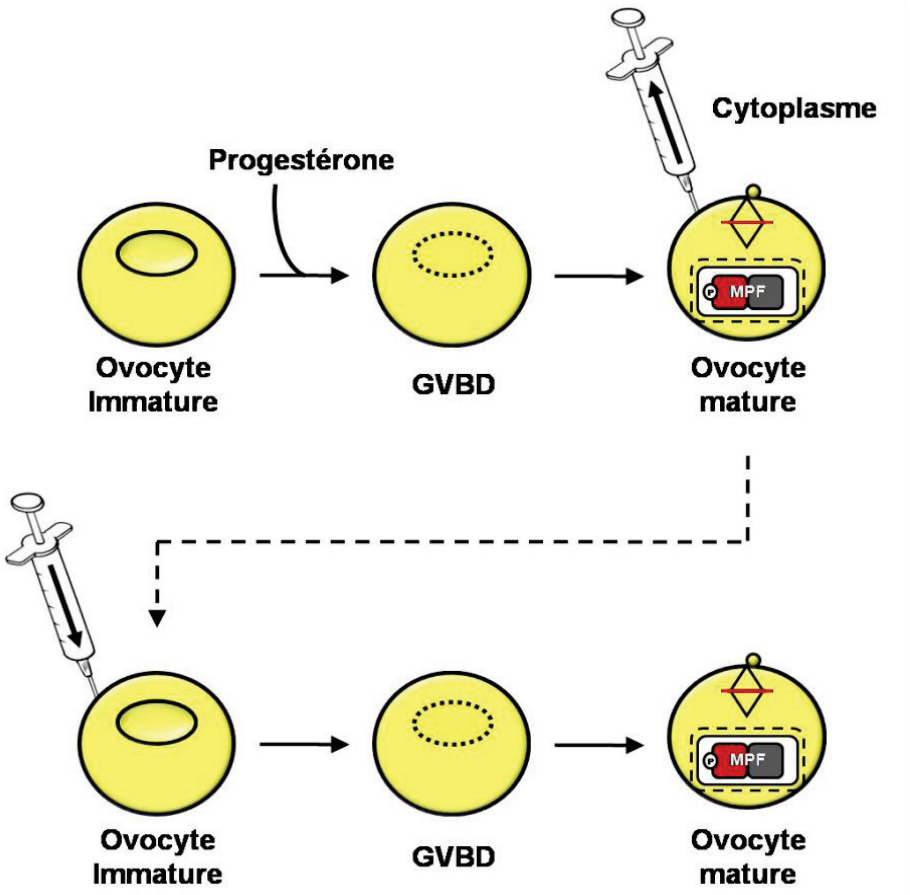


Figure 20 : Mise en évidence du MPF par injection de cytoplasme. La microinjection, dans un ovocyte immature bloqué en prophase I, de cytoplasme prélevé dans un ovocyte mature bloqué en métaphase II induit l'entrée en méiose de l'ovocyte microinjecté. Cette expérience montre que le cytoplasme de l'ovocyte mature contient un facteur diffusible, le MPF, suffisant pour stimuler l'entrée en méiose.

Ce facteur a alors été nommé MPF pour « Maturation Promoting Factor ». Par la suite, des expériences de microinjections croisées entre ovocytes d'espèces différentes (Étoile de mer, Batraciens, Souris…) ont montré que ce facteur n'est pas spécifique de l'espèce ni du *phylum* (Reynhout et Smith, 1974 ; Wasserman et Smith, 1978). De plus, il est apparu très rapidement que le MPF régule également l'entrée en mitose des cellules somatiques (Sunkara *et al.*, 1979 ; Nelkin *et al.*, 1980). Aujourd'hui, Le MPF est considéré comme le facteur universel d'entrée en phase M de toutes les cellules eucaryotes. Il a été rebaptisé « M-phase Promoting Factor ».

5.1. Nature moléculaire du MPF

En 1988, le MPF fut purifié par chromatographies successives de fractions positives pour l'entrée en phase M des ovocytes injectés (Lohka *et al.*, 1988). Par analyse sur gel et par la détection de son activité kinasique, la nature moléculaire du MPF a été étudiée : il est composé de deux sous-unités protéiques de 34 et 45 kDa. Plus précisément, le MPF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique, la sérine/thréonine kinase p34Cdc2/Cdc2/Cdk1 (Cell division cycle 2/Cyclin dependent kinase 1) et d'une sous-unité régulatrice, la Cycline B (Gautier *et al.*, 1988 ; Gautier *et al.*, 1990).

5.1.1. p34Cdc2/Cdc2/Cdk1 (34 kDa)

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'étude de mutants présentant un défaut thermosensible de progression dans le cycle cellulaire (mutation des gènes *cdc*) a permis d'identifier la sous-unité catalytique du MPF. Des anticorps dirigés contre le produit du gène *cdc2* reconnaissent par immunoempreinte la sous-unité de 34 kDa du MPF (Gautier *et al.*, 1988). Des orthologues de ce gène ont été retrouvés chez de nombreuses espèces. Cdc2 a été clonée chez le Xénope (Milarski *et al.*, 1991). Elle constitue le premier membre d'une famille de kinases très conservées présentant des caractéristiques communes en termes de taille (30 à 60 kDa), de séquence (plus de 40% d'identité) et de structure tridimensionnelle. Toutes les Cdc/Cdk contiennent une séquence de 16 acides aminés renfermant un motif PSTAIR. Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases nécessitant une liaison avec des sous-unités régulatrices : les Cyclines (Doree et Hunt, 2002). Cette liaison génère un changement de conformation qui démasque le site catalytique et favorise l'activité kinasique de Cdc2 (De Bondt *et al.*, 1993) Les Cdk actives phosphorylent des substrats spécifiques sur des séquences consensus (S/T-P-X-K/R). Ces substrats sont considérés comme des effecteurs du cycle cellulaire.

5.1.2. Cycline B (45 kDa)

Dans les ovocytes de Xénope, le deuxième composant du MPF est reconnu par des anticorps dirigés contre la Cycline B (Gautier *et al.*, 1990). Cette sous-unité du MPF a été identifiée chez d'autres espèces (Minshull *et al.*, 1989). Les travaux réalisés sur les blastomères d'invertébrés marins ont montré que la Cycline B appartient à une famille de protéines dont le niveau d'expression varie en fonction de la progression du cycle cellulaire : la plupart des Cyclines sont synthétisées au cours de l'interphase et sont brusquement dégradées en fin de mitose (Evans *et al.*, 1983).

Dans les extraits d'œufs de Xénope, les niveaux de Cycline B évoluent de manière cyclique (Murray et Kirschner, 1989). Si la synthèse protéique est inhibée, l'apparition cyclique des Cyclines est supprimée. Par ailleurs, après un traitement à la RNAse, l'activité du MPF réapparait de manière cyclique lorsque l'ARNm *cycline B* d'Oursin est injecté.

Les Cyclines possèdent trois domaines essentiels **(Figure 21)** :

- La « Cyclin Box » est une région consensus, d'une centaine d'acides aminés, localisée dans la moitié C-terminale de la protéine. Cette région intervient dans la liaison de la Cycline B avec Cdc2. L'injection de ce domaine de liaison est insuffisante pour induire la reprise méiotique (Lees et Harlow, 1993). La partie N-terminale de la « Cyclin Box » stabilise le complexe Cdk/Cycline (Endicott *et al.*, 1999).
- Un signal de rétention cytoplasmique, d'environ 40 résidus, est localisé entre la « Cyclin Box » et la « Destruction Box ». Il serait responsable du maintien de la Cycline B dans le cytoplasme lors de la phase G2 (Hunt, 1991 ; Pines et Hunter, 1994).
- La « Destruction Box », située dans la région N-terminale de la protéine, consiste en une séquence de neuf résidus. Elle est requise pour la degradation de la protéine lors de la transition métaphase-anaphase.

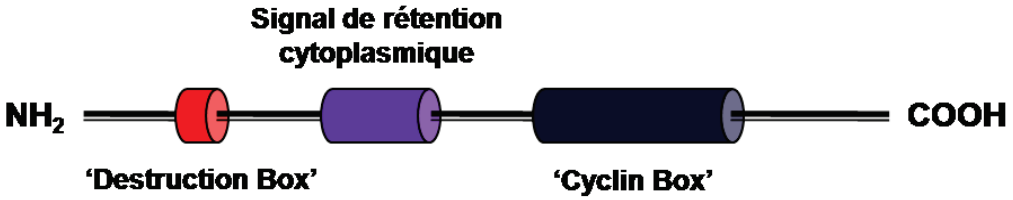


Figure 21 : Représentation schématique de la structure des Cyclines. Les Cyclines possèdent trois domaines essentiels : une « Cyclin Box », un signal de rétention cytoplasmique, et une « Destruction Box ».

Les Cyclines B contiennent une séquence d'export nucléaire dans leur extrémité N-terminale. La phosphorylation de cette séquence est nécessaire pour l'accumulation de la Cycline B dans la vésicule germinative et l'activité des complexes Cdc2/Cycline B1 (Pines et Hunter, 1994 ; Yang *et al.*, 1998 ; Hagting *et al.*, 1999) et Cdc2/Cycline B2 (Yoshitome *et al.*, 1998).

Chez l'étoile de mer, la Cycline B est phosphorylée par le MPF lui-même (Borgne *et al.*, 1999). Dans l'ovocyte de Xénope, Cdc2 phosphoryle la Cycline B2 sur son résidu sérine 90 (Gautier *et al.*, 1990 ; Izumi et Maller, 1991). En outre, la kinase Cyk, ciblant la Cycline B2, a été identifiée dans les ovocytes. Il s'agit d'une forme particulière de la CaMKII (Calcium/calmoduline-dépendant protéin kinase II) qui est activée avant le MPF. Elle phosphoryle la Cycline B2 *in vitro* sur les résidus thréonine 41 et sérine 53. En revanche, une mutation inhibitrice ou activatrice de ces sites de phosphorylation ne révèle aucune implication dans la reprise méiotique ou la dégradation de la Cycline (Derua *et al.*, 1997 ; Stevens *et al.*, 1999).

Le MPF est donc constitué par l'association de la Cycline B et de Cdc2. De multiples complexes Cdk/Cycline sont impliqués dans les différentes phases du cycle cellulaire. Cdc2 porte l'activité kinasique alors que la Cycline B a un rôle essentiellement régulateur. La Cycline est également impliquée dans la spécificité de reconnaissance du substrat et dans la localisation du complexe (Booher *et al.*, 1989). Actuellement, 14 types de Cycline (de A à L et T) ainsi que 11 Cdk sont connues.

5.2. Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique

L'activité du MPF est généralement mesurée par sa capacité à phosphoryler l'une de ses cibles : l'histone H1 **(Figure 22)**. Cette activité est dépendante de la liaison entre la Cycline B et Cdc2 puisque la forme libre de Cdc2 présente une activité kinasique faible (Lorca *et al.*, 1992). Or la Cycline B2 et Cdc2 sont détectées dans les ovocytes dès le stade I (Furuno *et al.*, 2003), cependant un stock de pré-MPF (Cdc2/Cycline B2) est maintenu sous sa forme inactive dans le cytoplasme des ovocytes immatures de stade VI (Gautier et Maller, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 1991b ; Krek et Nigg, 1991b, a ; Norbury *et al.*, 1991 ; Solomon *et al.*, 1992).

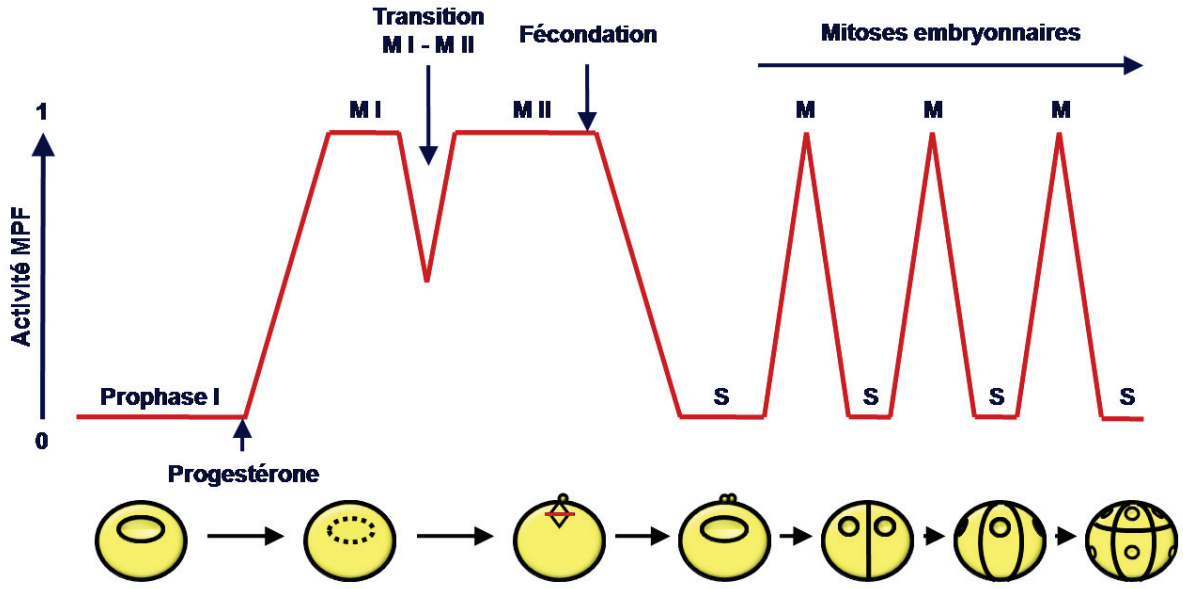


Figure 22 : Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. Suite à la stimulation hormonale, le MPF est activé. Cette activité (courbe rouge) décline transitoirement entre les deux divisions de méiose (MI-MII), stimulant la transition métaphase I-anaphase I. Cette diminution est néanmoins insuffisante pour faire entrer la cellule en interphase. Une activité forte et constante du MPF bloquera l'ovocyte en métaphase II dans l'attente de la fécondation. Cette dernière fécondation provoquera une chute brutale de l'activité du MPF conduisant à une sortie de méiose. Au cours des mitoses embryonnaires, des phases d'inactivité (en phase S) et d'activité (en phase M) du MPF alterneront successivement.

Si l'activation du MPF déclenche l'entrée en phase M du cycle cellulaire, la sortie de phase M nécessite son inactivation. L'activité du MPF n'est pas constante au cours de la méiose : lors de la transition métaphase I-anaphase I, une diminution transitoire de l'activité H1-kinase est concomitante avec la sortie de la première division de méiose (Kobayashi *et al.*, 1991b ; Ohsumi *et al.*, 1994). L'activité kinasique résiduelle du MPF est cependant essentielle à l'absence d'interphase et de réplication de l'ADN entre les deux divisions méiotiques (Furuno *et al.*, 1994 ; Picard *et al.*, 1996 ; Iwabuchi *et al.*, 2000). Lors du blocage en métaphase II, l'activité MPF reste élevée et ne disparaît qu'au moment de la fécondation permettant la sortie de seconde division de méiose et la reformation de l'enveloppe nucléaire (Lorca *et al.*, 1992).

5.3. Mécanismes de régulation du MPF lors de la reprise méiotique

Au cours de la reprise méiotique, l'activité du MPF est principalement régulée par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation, par l'alternance entre la synthèse et la dégradation des Cyclines, et par l'association de Cdc2 avec ses activateurs.

5.3.1. Régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation

Dès sa synthèse, la Cycline B interagit avec Cdc2 pour former un complexe MPF inactif : le pré-MPF **(Figure 23)**. L'activité de ce complexe dépend majoritairement de l'état de phosphorylation du résidu activateur thréonine 161, et des résidus inhibiteurs thréonine 14 et tyrosine 15 situés au cœur du domaine de fixation de l'ATP de Cdc2. Dans l'ovocyte immature, il se constitue un stock de pré-MPF inactif phosphorylé sur ces trois résidus. Lors de la reprise méiotique, la déphosphorylation de la thréonine 14 et de la tyrosine 15 libère le site de fixation de l'ATP et conduit à l'activation du MPF (Gould et Nurse, 1989 ; Solomon *et al.*, 1990 ; Meijer *et al.*, 1991 ; Solomon *et al.*, 1992).

5.3.1.1. CAK

La CAK (Cdk Activating Kinase) est constituée d'un complexe hétérotrimérique Cycline H/Cdk7Mat1. Cdk7, également appelée MO15, représente la sous-unité catalytique (Solomon, 1993) tandis que la Cycline H représente la sous-unité régulatrice (Fisher et Morgan, 1994 ; Makela *et al.*, 1994). À la différence des autres Cyclines, le taux de Cycline H reste constant au cours du cycle cellulaire. Mat1 (Ménage à trois 1), une protéine de la famille « RING finger » régule l'association entre Cdk7 et la Cycline H (Devault *et al.*, 1995). La CAK est responsable de la phosphorylation du MPF sur la thréonine 161 (Fesquet *et al.*, 1993 ; Poon *et al.*, 1993 ; Solomon, 1993). En phase G2, cette phosphorylation facilite sa liaison à la Cycline B (Jeffrey *et al.*, 1995 ; Paulovich et Hartwell, 1995) mais n'est pas suffisante pour activer le MPF **(Figure 23)**. La déphosphorylation du résidu thréonine 161 par la phosphatase KAP (*cyclin-dependent Kinase-Associated Phosphatase*) se produit après la dégradation de la Cycline B. Cette déphosphorylation serait nécessaire à l'inactivation de Cdc2 selon certains auteurs (Lorca *et al.*, 1992 ; Hannon *et al.*, 1994 ; Poon et Hunter, 1995 ; Hanlon et Barford, 1998) mais ne représenterait pas une étape cruciale selon d'autres (Chesnel *et al.*, 2006, 2007).

5.3.1.2. Myt1

Myt1 est une kinase membranaire à double spécificité responsable de la phosphorylation inhibitrice des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdc2 (Mueller *et al.*, 1995b ; Liu *et al.*, 1997 ; Palmer *et al.*, 1998). Présente dès le stade I ovocytaire, Myt1 s'accumule jusqu'au stade IV (Furuno *et al.*, 2003). En phase G2, Myt1 interagirait avec le complexe Cdc2/Cycline B *via* son domaine C-terminal de manière à le séquestrer dans le cytoplasme (Wells *et al.*, 1999) **(Figure 23)**. L'injection d'anticorps anti-Myt1 dans l'ovocyte de Xénope suffit à déclencher la reprise méiotique, ce qui suggère que l'inactivation de Myt1 est essentielle pour l'entrée en phase M des ovocytes (Nakajo *et al.*, 2000). L'inactivation de Myt1 est sous le contrôle de la phosphorylation (Mueller *et al.*, 1995b). Chez le Xénope, Myt1 est phosphorylée par la kinase p90Rsk dans son domaine régulateur en région C-terminal (Palmer *et al.*, 1998), ainsi que par p39Mos (Peter *et al.*, 2002). Dans les ovocytes d'étoile de mer *Asterina pectinifera*, Myt1 est phosphorylée par PKB/Akt (Okumura *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que l'autophosphorylation de Myt1 sur les sérines 66 et 76 participe à l'inhibition de la kinase lors de la transition G2/M (Kristjansdottir *et al.*, 2006).

5.3.1.3. Wee1

Wee1 est une kinase nucléaire qui présente de fortes homologies avec Myt1, mais qui n'est capable de phosphoryler que le résidu de tyrosine15 de Cdc2 (Featherstone et Russell, 1991 ; Parker *et al.*, 1992 ; Booher *et al.*, 1993 ; Lee *et al.*, 1994 ; Watanabe *et al.*, 1995) **(Figure 23)**. La quantité de Wee1 varie au cours de la croissance ovocytaire. Présente dans les ovocytes de stade I, cette kinase disparaît dans les ovocytes de stade VI (Furuno *et al.*, 2003). Au cours de la maturation, la cinétique de traduction de Wee1 est finement contrôlée par polyadénylation tardive de son ARNm (Charlesworth *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2008b). La protéine ne réapparait que 90 minutes après la GVBD, puis durant la seconde division de méiose et les mitoses embryonnaires (Murakami et Vande Woude, 1998 ; Nakajo *et al.*, 2000). La surexpression précoce de XeWee1 réduit fortement la GVBD lors d'une stimulation par la progestérone. Dans ces ovocytes, la phosphorylation de la tyrosine 15 de Cdc2 est maintenue. Par ailleurs, l'absence de XeWee1 est requise pour la suppression de la phase S après la première division de méiose (Nakajo *et al.*, 2000).

5.3.1.4. Cdc25C

Très conservée au cours de l'évolution, de la levure aux mammifères (Sadhu *et al.*, 1990), cette protéine est une phosphatase à double spécificité responsable de l'activation du MPF par déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 inhibiteurs de Cdc2 (Strausfeld *et al.*, 1991) **(Figure 23)**. Trois types de protéines phosphatases Cdc25 ont été identifiées, Cdc25A, B et C (Nilsson et Hoffmann, 2000). Les premiers travaux réalisés sur les phosphatases ont montré que chacune d'elles est impliquée dans une étape précise du cycle cellulaire. Des travaux récents ont souligné que les trois phosphatases jouent un rôle clef lors des transitions G1/S et G2/M (Boutros *et al.*, 2006). Cdc25C agit *in vivo* comme un régulateur de la transition G2/M (Millar *et al.*, 1991) en activant le complexe Cdc2/Cycline B

(Hoffmann *et al.*, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994). Cdc25B est également fortement exprimée dans les cellules au moment de la transition G2/M (Kakizuka *et al.*, 1992). Quant à Cdc25A, elle est phosphorylée et activée en phase S, et sa phosphorylation dépend de l'activité du complexe Cdk2/Cycline E (Hoffmann *et al.*, 1994).

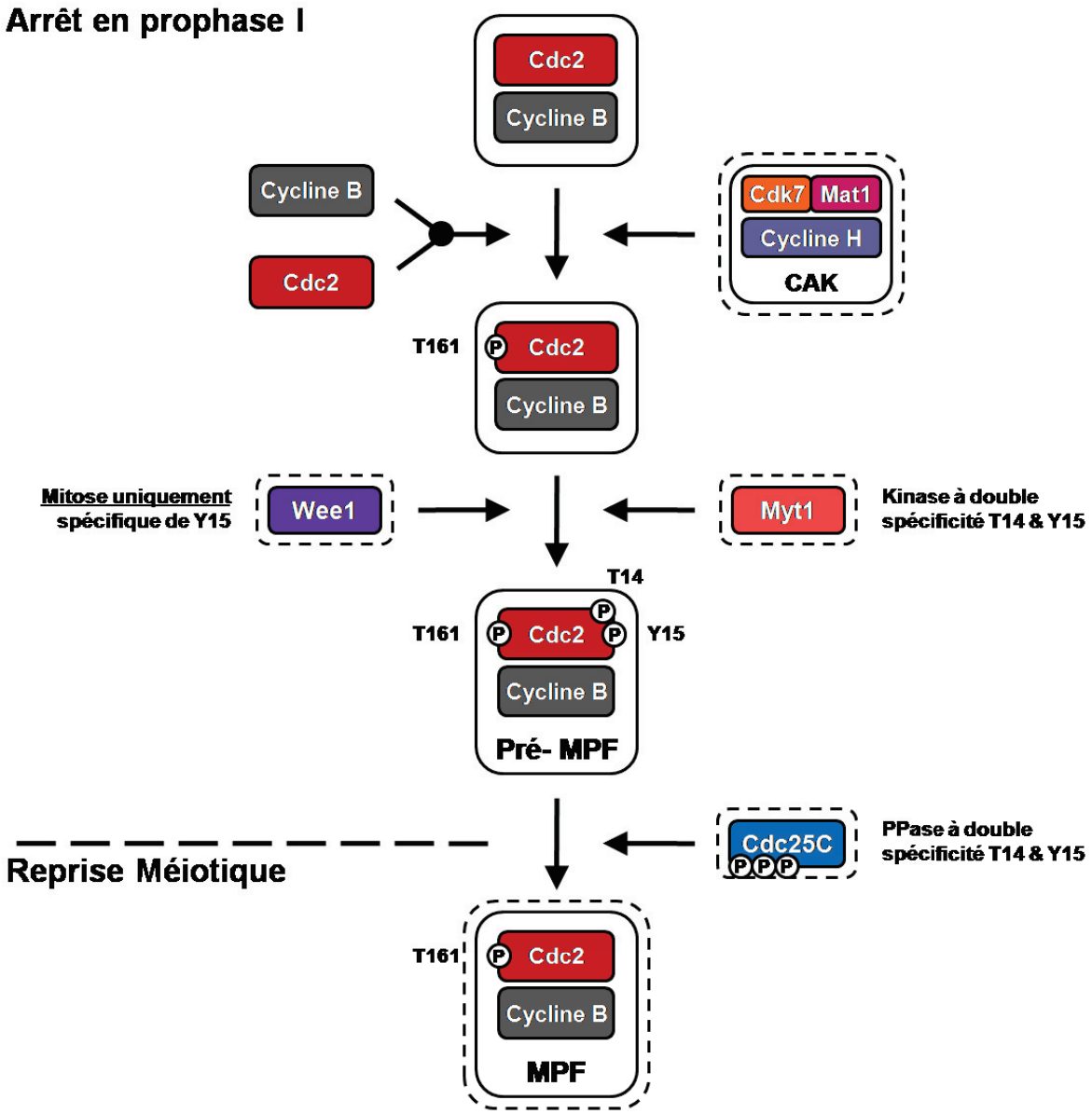


Figure 23 : Mécanismes de régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation. La phosphorylation du résidu thréonine 161 par la CAK permet la dimérisation de Cdc2 avec la Cycline B. En absence de signaux mitogènes, la kinase Myt1 phosphoryle les résidus inhibiteurs de Cdc2 : thréonine 14 et tyrosine 15. Le complexe Cdc2/Cycline B triphosphorylé forme le pré-MPF. La kinase Wee1, absente dans le modèle ovocytaire, est spécifique de la division mitotique. Lors de la reprise méiotique, la stimulation des ovocytes par la progestérone provoque, par phosphorylation, l'inactivation de Myt1 et l'activation de la phosphatase (PPase) Cdc25C. *In fine*, en déphosphorylant les résidus inhibiteurs du pré-MPF, Cdc25C activera le complexe.

Trois isoformes de Cdc25 fortement homologues ont été clonées chez le Xénope (Kumagai et Dunphy, 1991a ; Izumi *et al.*, 1992). La microinjection d'une protéine recombinante Cdc25 (A, B ou C) provoque la reprise méiotique jusqu'en métaphase I (Izumi *et al.*, 1992 ; Hoffmann *et al.*, 1993 ; Rime *et al.*, 1994). Impliquée dans la boucle d'autoamplification du MPF, Cdc25C est régulée par son état de phosphorylation **(Figure 24)** :

- *Phosphorylation inhibitrice :* Dans les ovocytes bloqués en phase G2, Cdc25C est maintenue inactive par phosphorylation du résidu sérine 287 (Dunphy et Kumagai, 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1991b ; Strausfeld *et al.*, 1991). Cette phosphorylation permettrait la séquestration cytoplasmique de Cdc25C par fixation de son régulateur négatif, la protéine 14-3-3 (Kumagai *et al.*, 1998a). La Calmoduline kinase II (CaMKII) ainsi que les kinases Chk1 et Chk2 (Checkpoint Kinase1 et 2) des points de contrôle sont capables de phosphoryler ce résidu (Kumagai *et al.*, 1998b ; Nakajo *et al.*, 1999 ; Guo et Dunphy, 2000 ; Oe *et al.*, 2001 ; Hutchins *et al.*, 2003). Cependant, l'immunodéplétion de Chk1 et Chk2 n'inhibe qu'à 30% la phosphorylation de la sérine 287, ce qui suggére qu'une autre kinase est majoritairement responsable de cette phosphorylation (Nakajo *et al.*, 1999 ; Guo et Dunphy, 2000). Dans ce sens, les travaux de Duckworth et collaborateurs (2002) ont suggéré que Cdc25C soit une cible majeure de la PKA.

- *Déphosphorylation inhibitrice :* Dans les ovocytes immatures bloqués en prophase I, Cdc25C est maintenue déphosphorylée et inactive par une phosphatase sensible à l'Acide Okadaïque : PP2A (Izumi *et al.*, 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1992 ; Mueller *et al.*, 1995a). Chez le Xénope, l'inhibition de la PP2A par l'Acide Okadaïque, ou sa déplétion, déclenche l'activation du MPF (Rime *et al.*, 1995 ; Maton *et al.*, 2005). Dans des extraits acellulaires de Xénope, PP2A déphosphoryle Cdc25C de manière antagoniste à Plx1 (Karaiskou *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la PP2A serait inactivée lors de la reprise méiotique, probablement par la kinase Greatwall (Zhao *et al.*, 2008).

- *Phosphorylation activatrice :* L'activation de Cdc25C lors de la reprise méiotique implique sa libération de la protéine 14-3-3. La phosphorylation de Cdc25C sur la thréonine 138 par Cdk2 permettrait cette dissociation (Margolis *et al.*, 2003). Par ailleurs, lors de la transition G2/M, Cdc25C devient intensivement phosphorylée dans sa partie N-terminale (Izumi *et al.*, 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1992). Plusieurs kinases sont responsables de l'activation de Cdc25C.

  La polo-like kinase Plx1 (Polo-like kinase Xenopus 1) phosphoryle Cdc25C sur de multiples sites et active la phosphatase *in vitro* (Izumi *et al.*, 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1996 ; Qian *et al.*, 1998b). Plx1 est positivement régulée par phosphorylation et est activée au cours de la reprise méiotique. La microinjection d'anticorps anti-Plx1 ou d'une forme dominante négative de Plx1 retarde la phosphorylation et l'activation de Cdc25C lors d'une stimulation des ovocytes par la progestérone. Cependant, la microinjection de Cdc25 restaure les effets délétères de la microinjection d'anticorps anti-Plx1 (Qian *et al.*, 1998b). Par ailleurs, dans des extraits acellulaires de Xénope, son immunodéplétion empêche l'activation de Cdc25C et du MPF en réponse à l'inhibition de la PKA (Qian *et al.*, 2001).

La Cycline B1 et Myt1 sont également des cibles de Plx1 (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002 ; Nakajima *et al.*, 2003). La kinase responsable de la phosphorylation activatrice de Plx1 est xPlkk1 (Xenopus Polo-like kinase kinase 1) (Qian *et al.*, 1998a) qui est elle-même activée par phosphorylation catalysée par une kinase qui reste à ce jour inconnue.

Xp38γ/SAPK3, une protéine de la famille des MAPK, participe également à l'activation de Cdc25C par phosphorylation du résidu sérine 205 (Perdiguero *et al.*, 2003).

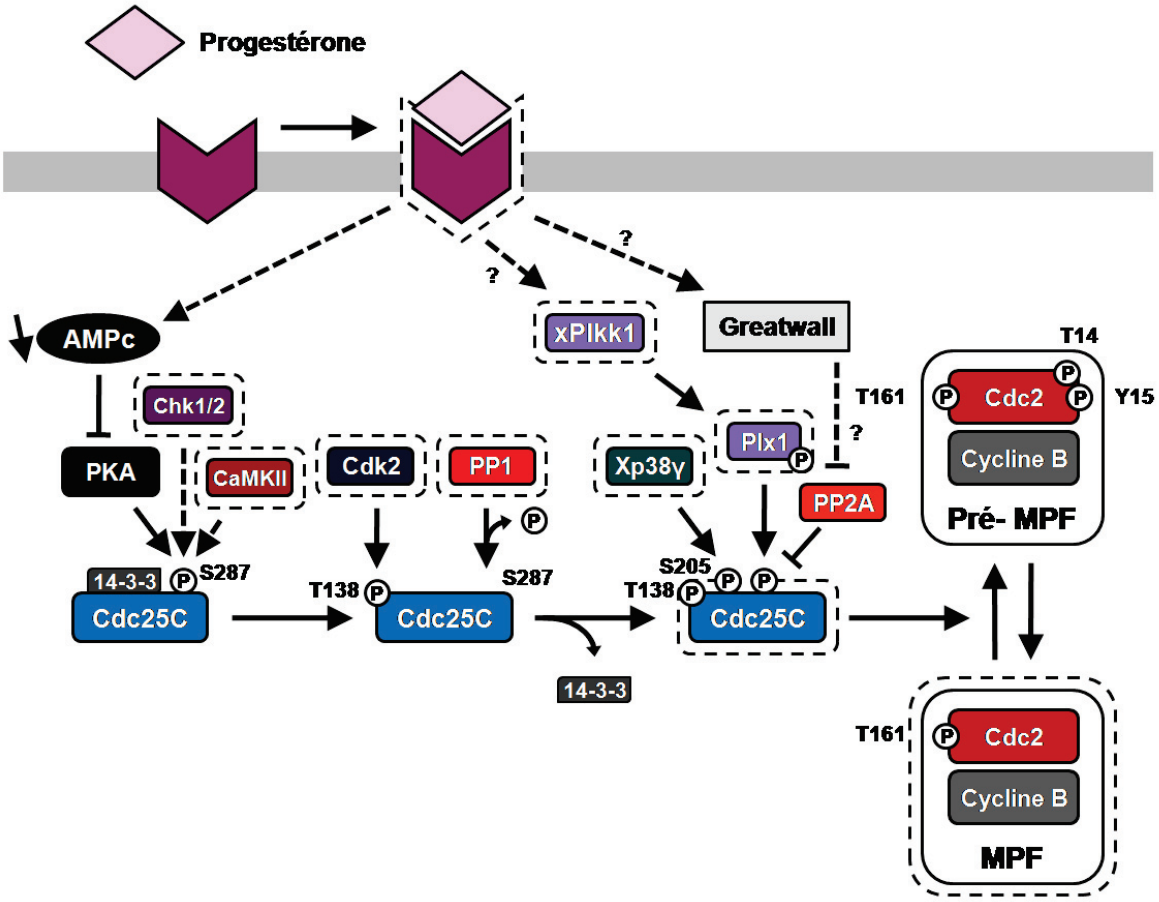


Figure 24 : Mécanismes de régulation de la phosphatase Cdc25C lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. Dans l'ovocyte immature, Cdc25C est maintenue inactive. La phosphorylation de la S287 de Cdc25C est principalement catalysée par la PKA, mais aussi par la CaMKII et les protéines Chk. Cette phosphorylation provoquerait la séquestration cytoplasmique de Cdc25C par la 14-3-3. L'inhibition de la PKA pousse PP1 à déphosphoryler le résidu. La phosphorylation de la T138 par Cdk2 semble également requise pour la libération du résidu S287 par la 14-3-3. La phosphorylation de Cdc25C par Xp38γ (S205) et Plx1 (*via* xPlkk1) active la protéine. Dans le même temps, la phosphatase PP2A serait inactivée, probablement par la kinase Greatwall.

- *Déphosphorylation activatrice :* Les phosphatases PP1 et PP2A seraient responsables de la déphosphorylation de la sérine 287 de Cdc25C (Hutchins *et al.*, 2002 ; Margolis *et al.*, 2003). Une fois déphosphorylée, Cdc25C serait capable de s'associer à la Cycline B *via* son domaine de liaison à 14-3-3 (Morris *et al.*, 2000).

- *Autre mécanisme de régulation de Cdc25 :* Récemment, Sun et collaborateurs (2007) ont montré que Cdc25C est capable de lier le zinc en solution et qu'un chélateur de type TPEN empêche la reprise méiotique des ovocytes de Xénope en inhibant l'activité de cette protéine. Le zinc est donc nécessaire pour l'activité de la phosphatase et pour activer le MPF *in vivo* et *in vitro*.

5.3.2. Régulation du MPF par la PKA

Les liens qui existent entre l'inhibition de la PKA et l'activation du MPF, et plus particulièrement les cibles directes de la PKA lors de la reprise méiotique, sont peu connus. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'inhibition de la PKA conduit dans un premier temps à la synthèse d'une ou plusieurs protéines essentielles à l'activation de Cdc2 (Huchon *et al.*, 1981a ; Daar *et al.*, 1993 ; Matten *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 2006a) et permet dans un second temps le maintien de l'activité du MPF indépendamment de la synthèse protéique (Rime *et al.*, 1992 ; Rime *et al.*, 1994 ; Duckworth *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2006a).

Cdc2 : La PKA régulerait la phosphorylation inhibitrice de la tyrosine 15 de Cdc2. Un traitement par des agents provoquant une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire entraine une re-phosphorylation de la tyrosine 15 de Cdc2 dans des ovocytes stimulés par l'injection de Cycline B ou de Cdc25 (Rime *et al.*, 1992 ; Rime *et al.*, 1994).

Cdc25C : Duckworth et collaborateurs (2002) ont montré que la phosphatase Cdc25 est une cible directe de la PKA **(Figure 24)**. La sérine 287, résidu le plus décrit dans la littérature, peut être phosphorylé par la PKA et provoque la séquestration cytosolique de Cdc25C par la protéine 14-3-3. Lorsque la progestérone est ajoutée, ou que la PKA est inhibée par la PKI, la sérine 287 de Cdc25C est déphosphorylée juste avant l'activation du MPF et l'entrée en phase M. Cette phosphorylation semble être primordiale pour l'arrêt en prophase I puisque un mutant Cdc25 non phosphorylable sur la sérine 287 inhibe la capacité de PKA à maintenir le blocage de l'ovocyte en prophase I (Duckworth *et al.*, 2002).

5.3.3. Régulation du MPF par la synthèse et la dégradation des Cyclines

5.3.3.1. Synthèse de la Cycline B

Dans des extraits cytoplasmiques d'œufs de Xénope, les taux de Cycline B varient de manière cyclique. Cette variation disparaît lorsque la synthèse protéique est inhibée ou lorsque les ARNm subissent un traitement par la RNAse. Dans ce cas, la réactivation du MPF peut être obtenue par l'injection d'ARNm *cycline B* d'oursin (Murray et Kirschner, 1989). Cinq sous-types de Cycline B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Minshull *et al.*, 1989 ; Hochegger *et al.*, 2001) **(Tableau 2)**. Les sous-types B1 et B2 sont majoritairement présents dans les ovocytes et les embryons de Xénope (Kobayashi *et al.*, 1991a).

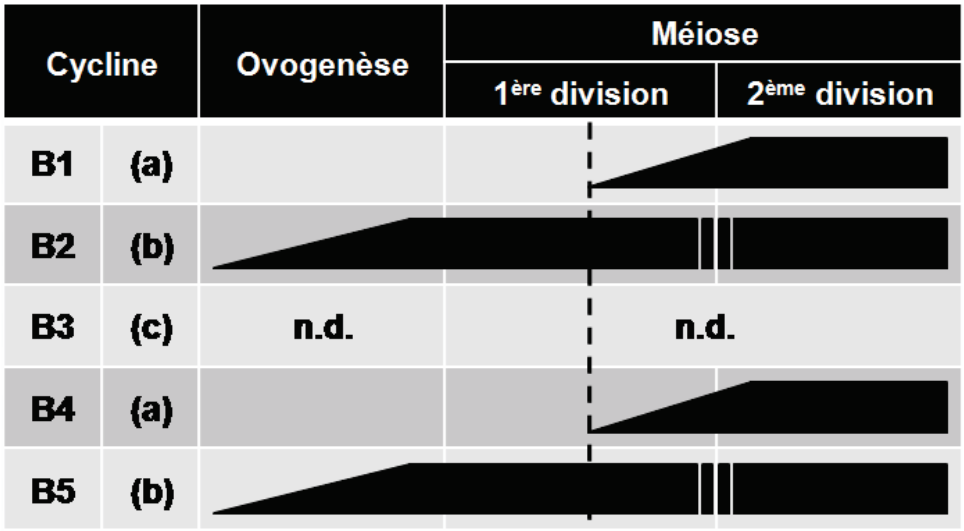


Tableau 2 : Accumulation des différentes Cyclines B dans l'ovocyte de Xénope. Cinq types de Cyclines B sont identifiables lors de l'ovogenèse ou de la maturation ovocytaire. Certaines d'entre elles présentent de fortes similarités de séquence (voir parenthèses). L'accumulation des Cyclines n'est pas simultanée. Les Cyclines B2 et B5 sont synthétisées au cours de l'ovogenèse de manière à former le pré-MPF ; les Cyclines B1 et B5 s'accumulent après l'activation du MPF (ligne hachurée). Les travaux de Hochegger et collaborateurs (2001) n'ont pas permis de détecter la Cycline B3. Tableau inspiré de Futcher et Leatherwood (2008) et adapté au modèle Xénope d'après Hochegger et collaborateurs (2001).

Cyclines B2 et B5 : La Cycline B2 est présente dès le stade I ovocytaire et sa quantité augmente fortement à partir du stade IV (Furuno *et al.*, 2003). Dans l'ovocyte immature, les Cyclines B2 et B5 sont stockées sous forme de pré-MPF inactif. Environ 10% du stock de Cdc2 s'associent à ces Cyclines, les 90% restant sont libres et possèdent une activité kinasique faible (Lorca *et al.*, 1992).

Cyclines B1 et B4 : Dans les ovocytes immatures, la synthèse de la Cycline B1 est contrôlée négativement par la PKA. Elle est indépendante de l'activité du MPF (Frank-Vaillant *et al.*, 1999). Les ARNm *cycline B1* contiendraient un à plusieurs éléments répresseurs de la polyadénylation dans leur 3'UTR (Barkoff *et al.*, 2000). Lors de la reprise méiotique, les Cyclines B1 et B4 sont néo-synthétisées en deux phases : la première juste avant la GVBD et la seconde, plus importante, lors de la seconde division de méiose (Kobayashi *et al.*, 1991a ; Hochegger *et al.*, 2001).

Cycline B3 : Bien que les ovocytes de Xénope contiennent les ARNm codant la Cycline B3, ceux-ci ne semblent pas être traduits et la Cycline B3 ne jouerait aucun rôle au cours de la maturation (Hochegger *et al.,* 2001).

La quantité de Cyclines stockées dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF est suffisante pour permettre la GVBD indépendamment de la synthèse de nouvelles Cyclines. En effet, l'inhibition de la synthèse des Cyclines B1, B2, B4 et B5 par une stratégie anti-sens n'inhibe pas l'activation du MPF stimulée par la progestérone (Minshull *et al.*, 1991 ; Hochegger *et al.*, 2001). Cependant, la microinjection des ARNm *cycline A* ou *B* est suffisante pour déclencher la GVBD en absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique (Swenson *et al.*, 1986 ; Roy *et al.*, 1991 ; Huchon *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent qu'en réponse à la progestérone, la formation de nouveaux complexes MPF actifs, par association de Cdc2 monomérique avec la Cycline B néo-synthétisée, joue un rôle important dans le recrutement du stock de pré-MPF et la mise en place de la boucle d'autoamplification du MPF.

5.3.3.2. Dégradation de la Cycline B

Dès la sortie de première division de méiose, les Cyclines B2 et B5 sont dégradées (Hochegger *et al.*, 2001) et l'activité du MPF diminue de 50 à 70% (Kobayashi *et al.*, 1991b ; Ohsumi *et al.*, 1994 ; Gross *et al.*, 2000). Cependant, entre les deux divisions de méiose, la dégradation des Cyclines B est partiellement masquée par la synthèse de nouvelles Cyclines. L'ubiquitinylation suivie de la dégradation des Cyclines paraît néanmoins essentielle pour la sortie de phase M. Dans ce sens, la microinjection dans les ovocytes de Xénope d'une forme non dégradable de la Cycline B (délétion des 90 acides aminés N-terminaux ou mutation de la « destruction box ») déclenche la reprise méiotique. Dans cette condition, les ovocytes restent bloqués en métaphase I (Huchon *et al.*, 1993). Plus récemment, les travaux de Chesnel et collaborateurs (2006 ; 2007) ont montré que l'inhibition de l'activité protéasomale par le MG132 lors de la sortie de mitose embryonnaire prévient la dégradation des Cyclines mais pas l'inactivation du MPF. Ce résultat suggère que la dissociation du complexe Cdc2/Cycline B, puis la séquestration des Cyclines par le protéasome suffisent à inhiber le MPF.

L'Ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitinylation de la Cycline B lors de la transition métaphase-anaphase est l'APC/c (Anaphase Promoting Complex/cyclosome). Son activation nécessite sa liaison soit avec Cdc20/Fizzy, soit avec Cdh1/Hct1/Fizzy-related-protein (Lorca *et al.*, 1998). L'activité de ces deux protéines est régulée par leur état de phosphorylation. Dans les ovocytes de Xénope, l'activité de l'APC/c-Cdc20 ne serait pas nécessaire à la transition métaphase I-anaphase I alors qu'elle est requise pour la sortie de seconde division de méiose (Peter *et al.*, 2001 ; Taieb *et al.*, 2001). L'inhibition de la protéine Emi1 (Early mitotic inhibitor1), un inhibiteur de l'APC/c, après la GVBD provoque une chute de l'activité du MPF et une décondensation des chromosomes, ce qui suggère que l'activité d'Emi1 est requise pour empêcher l'apparition de la phase S entre les deux divisions de méiose (Tung et Jackson, 2005). Le blocage des ovocytes en métaphase II est assuré par un facteur cytostatique, le CSF (Cytostatic Factor, Masui et Markert, 1971). L'activité du CSF conduit à l'inhibition de l'APC/c-Cdc20 et prévient la dégradation de la Cycline B. Le CSF permet également de maintenir une activité MPF élevée. La nature moléculaire de ce CSF sera discutée à la **Page 93**.

5.3.4. Les protéines associées à Cdc2

5.3.4.1. Xe-p9

Chez la levure fissipare, la protéine p13Suc1 est la première molécule associée au MPF qui a été identifiée. Elle porte le nom de Cks1 dans la levure bourgeonnante. Chez le Xénope, Xe-p9 est un membre de la famille Suc1/Cks, des protéines capables de s'associer *in vitro* à Cdc2 pour en réguler l'activité (Brizuela *et al.*, 1987 ; Hadwiger *et al.*, 1989). Dans les extraits interphasiques, son immunodéplétion empêche l'entrée en phase M. Ce résultat suggère que Xe-p9 régule l'activation du MPF lors de la transition G2/M des ovocytes de Xénope (Patra et Dunphy, 1996). Xe-p9 facilite la phosphorylation de Cdc25, Myt1 et Wee1 par le MPF (Patra *et al.*, 1999) et régule positivement la phosphorylation de la sous-unité Cdc27 de l'APC/c par le MPF (Patra et Dunphy, 1998). Ce dernier résultat suggère une implication de Xe-p9 dans la dégradation de la Cycline B par l'APC/c.

5.3.4.2. Ringo/Speedy

La microinjection d'une forme inactive de Cdc2, ou d'anticorps anti-Cdc2, empêche la reprise méiotique des ovocytes de Xénope stimulés par la progestérone (Nebreda *et al.*, 1995), ce qui implique que l'activation du pool de Cdc2 libre est essentielle à l'entrée en phase M des ovocytes et requiert la synthèse d'activateur(s) de la kinase. La protéine Ringo (Rapid inducer of G2-M in oocyte), encore appelée Speedy, serait l'un de ces activateurs **(Figure 25)**. Ringo/Speedy appartient à une nouvelle famille de protéines ne présentant aucune homologie avec les Cyclines bien qu'elles soient capables de recruter les Cdc2 libres et de les activer (Ferby *et al.*, 1999 ; Lenormand *et al.*, 1999). En revanche, Ringo n'est pas capable de s'associer au complexe Cdc2/Cycline B (Ferby *et al.*, 1999) et l'activation de Cdc2 par Ringo ne nécessite pas la phosphorylation de la thréonine 161 (Karaiskou *et al.*, 2001). La microinjection de Ringo dans l'ovocyte suffit à déclencher l'activation du MPF, de la voie MAPK et la GVBD en absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique. L'inhibition de son expression par des oligonucléotides antisens bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Ferby *et al.*, 1999 ; Lenormand *et al.*, 1999). Chez la souris, Ringo induit également l'activation du MPF et la GVBD (Terret *et al.*, 2001). Les complexes Cdc2/Ringo permettraient donc d'acquérir rapidement une activité kinasique en réponse à la progestérone et conduirait à l'amplification du MPF. Ils permettraient également la stabilisation et la traduction de certains ARNm (Kim et Richter, 2007).

Dans l'ovocyte immature, l'expression de Ringo semble être réprimée par deux mécanismes : d'une part, par répression de la traduction (Padmanabhan et Richter, 2006) et d'autre part, par le système Ubiquitine-protéasome (Gutierrez *et al.,* 2006). La répression traductionnelle implique la fixation de Pumilio2 (Pum2) sur une séquence PBE (Pumilio Binding Element) située dans la région 3'UTR de l'ARNm. Son ubiquitinylation implique quant à elle une ubiquitine-ligase, la βTRCP/SCF, et nécessite la phosphorylation préalable de trois de ses acides aminés par la PKA et la GSK-3β. Lors de la reprise méiotique, Pum2 se dissocie de l'ARNm, ce qui permet la polyadénylation et la traduction de Ringo. La protéine s'accumule

au cours de la première division méiotique puis elle est dégradée par le protéasome (Gutierrez *et al.*, 2006). Après la première division de méiose, son ubiquitinylation par l'Ubiquitine-ligase Siah-2, nécessiterait la phosphorylation du résidu sérine 243. Cette dégradation serait importante pour inhiber la réplication de l'ADN entre les deux divisions de méiose.

5.3.5. La boucle d'autoamplification du MPF

Des expériences de transfert de cytoplasme issu d'ovocytes matures contenant du MPF actif ont démontré que celui-ci provoque la reprise méiotique de l'ovocyte receveur, même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique (Reynhout et Smith, 1974 ; Wasserman et Masui, 1975b). La réalisation d'une série de transferts de cytoplasme, au cours de laquelle l'ovocyte receveur devient l'ovocyte donneur, a permis de mettre en évidence le caractère autocatalytique et indépendant de la synthèse protéique du processus d'autoamplification du MPF (Masui et Markert, 1971). Les mécanismes moléculaires de l'amplification du MPF sont illustrés sur la **Figure 25**.

Cdc25C : Hyposphorylée en prophase I, Cdc25C devient hyperphosphorylée juste avant l'entrée en phase M. Cette phosphorylation est contrôlée par au moins deux kinases : Cdc2 et Plx1 (Izumi et Maller, 1993 ; Kumagai et Dunphy, 1996 ; Karaiskou *et al.*, 1999). *In vitro*, le MPF phosphoryle et active Cdc25C sur au moins cinq résidus d'acides aminés situés dans la région N-terminale régulatrice de la protéine : les thréonines 48, 67 et 138 et les sérines 205 et 285. La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'autoamplification du MPF (Izumi et Maller, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994).

Plx1 : Le MPF est également capable de phosphoryler Plx1 *in vitro*. Cette phosphorylation n'est pourtant pas capable d'activer Plx1. L'activation directe du MPF par microinjection de Cdc25 dans l'ovocyte entraine néanmoins l'activation de Plx1 démontrant qu'il existe un rétrocontrôle positif excercé par le MPF sur la Polo-kinase (Qian *et al.*, 1998b). Par ailleurs, l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures dans des ovocytes de stade IV ne permet pas l'activation du MPF (Rime *et al.,* 1994). Le MPF n'est pas non plus activé dans des ovocytes de stade IV stimulés par la progestérone bien que les taux intracellulaires d'AMPc diminuent (Mulner *et al.*, 1983 ; Sadler et Maller, 1983). Si ces ovocytes contiennent du pré-MPF et Cdc25 (Rime *et al.*, 1994 ; Furuno *et al.*, 2003), Plx1 n'y est pas exprimée. La surexpression de Plx1 dans ces cellules permet cependant d'activer l'autoamplification du MPF (Karaiskou *et al.*, 2004). L'activité de Plx1 est donc nécessaire à la mise en place de la boucle d'autoamplification et serait sous le contrôle direct de Cdc2 (Abrieu *et al.*, 1998).

Myt1 : Cdc2 participerait également à l'inhibition de Myt1 en l'hyperphosphorylant (Booher *et al.*, 1997 ; Patra *et al.*, 1999). Par rétrocontrôle, le MPF stimule également la synthèse de p39Mos, une MAP3K activatrice de la voie MAPK (Nebreda et Hunt, 1993 ; Posada *et al.*, 1993). Cette dernière voie, lorsqu'elle est activée indépendamment, peut déclencher l'activation du MPF (Sagata *et al.*, 1988 ; Sagata *et al.*, 1989b ; Haccard *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995). Elle soutient l'activation du MPF en inhibant Myt1 *via* la phosphorylation de cette protéine par p90Rsk (Palmer *et al.*, 1998).

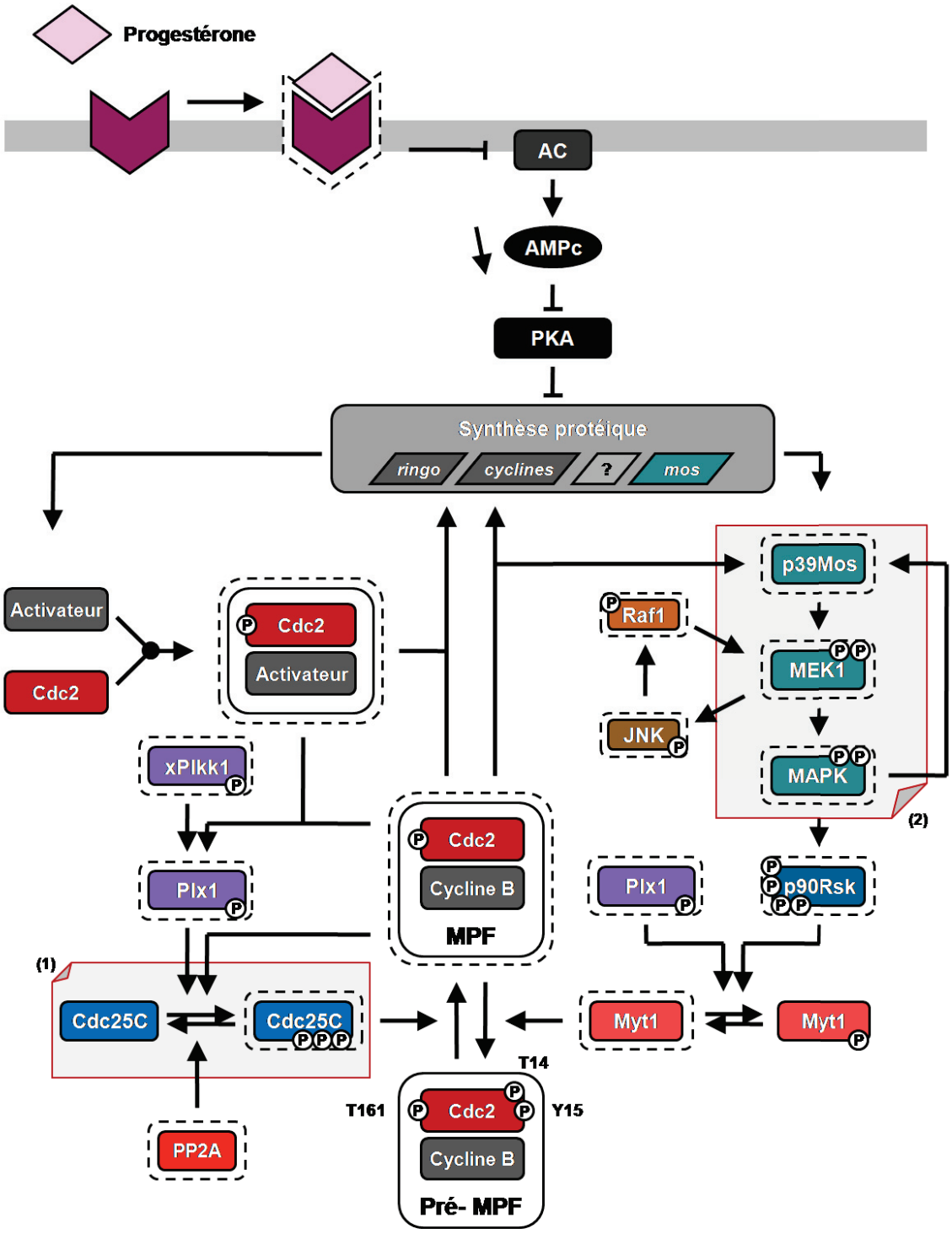


Figure 25 : Mécanismes moléculaires de régulation de la transition G2/M des ovocytes de Xénope. La stimulation des ovocytes par la progestérone inhibe la PKA et lève l'inhibition de la synthèse protéique. Des protéines telles que Ringo et p39Mos s'accumulent très rapidement et activent deux voies parallèles : Plx1-Cdc25C-MPF et p39Mos-MEK1-MAPK, toutes deux convergeant vers l'activation du MPF. Les mécanismes de régulation de Cdc25C (1) et des MAPK (2) sont respectivement résumés dans les Figures 24 et 27. Les mécanismes de pro/rétroactions seront décrits en dans la Figure 31.

In fine, lors de la reprise méiotique, l'activation du MPF se réalise en deux étapes. La première étape, précoce, nécessite la traduction de certaines protéines dont les Cyclines (Rime *et al.*, 1992) et Ringo/Speedy (Ferby *et al.*, 1999 ; Lenormand *et al.*, 1999). Elle serait sous le contrôle de l'inhibition de la PKA. La seconde étape nécessite qu'une petite quantité de MPF actif déclenche les mécanismes d'auto-amplification *via* l'activation de Plx1 et de Cdc25C, et l'inhibition de Myt1, indépendamment de la synthèse protéique.

5.4. Les principales cibles du MPF lors de la reprise méiotique

Plus de 70 substrats du MPF ont été identifiés dans les cellules HeLa (Blethrow *et al.*, 2008). Celles-ci sont impliquées dans de nombreux processus de la vie d'une cellule, tels que la signalisation, le métabolisme, la réplication de l'ADN, la transcrption, etc. Dans les ovocytes de Xénope, le MPF phosphoryle de nombreuses cibles requises pour les événements cytologiques de l'entrée en phase M. Ses principales cibles sont résumées dans le **Tableau 3**.

Protéines cibles	Références
Synthèse protéique	
CPEB	Mendez et al., 2002
EF1	Belle et al., 1995
Condensation des chromosomes	
Histone H1	Arion et al., 1988
Condensines	Kimura et al., 1998
Désorganisation de l'enveloppe nucléaire	
Lamines A et C	Miake-Lye et Kirschner, 1985
Formation du fuseau de division	
MAP2	Faruki et al., 1992
MAP4	Ookata et al., 1995
XMAP215	Vasqueez et al., 1999
Réarrangement du cytosquelette (cytokinèse)	
Myosine II	Satterwhite et al., 1992
Fragmentation de l'appareil de golgi	
GM130 (golgine)	Lowe et al., 1998
GRASP65	Lin et al., 2000

Tableau 3 : Principales cibles du MPF. L'Histone H1 est empiriquement utilisée *in vitro* pour évaluer l'activité kinasique du MPF. Par techniques de chromatographie puis d'autoradiographie, la phosphorylation de l'Histone H1 a permis d'identifier les sous-unités du MPF dont la Cycline B, elle-même phosphorylée (Lohka *et al.*, 1988). Les autres cibles du MPF peuvent être classées selon leur fonction lors de la phase M.

5.4.1. La CPEB

Le MPF contrôle la synthèse protéique par l'intermédiaire de la CPEB. Suite à la phosphorylation précoce de la CPEB par Aurora A/Eg2, la CPEB subit une deuxième vague

de phosphorylation par Cdc2 (Paris *et al.*, 1991 ; Hake et Richter, 1994 ; de Moor et Richter, 1997). Cette dernière phosphorylation se produit sur le résidu sérine 210 et conduit à la dégradation de la CPEB (Hake et Richter, 1994) ou régule son association avec d'autres protéines comme la Maskine (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). La destruction de la CPEB est nécessaire pour la polyadenylation et la traduction des ARNm tardifs comme la *cycline B1* (Mendez *et al.*, 2002 ; Thom *et al.*, 2003) **(Figure 19)**.

5.4.2. Le facteur d'élongation EF1

Le MPF pourrait également intervenir dans la régulation de la synthèse protéique en phosphorylant les sous-unités δ et γ du facteur d'élongation EF1 lors de la reprise méiotique (Mulner-Lorillon *et al.*, 1989 ; Belle *et al.*, 1995).

5.4.3. Les Lamines

Les Lamines, protéines constitutives de la lamina de l'enveloppe nucléaire, sont hyperphosphorylées lors de l'entrée en mitose, puis déphosphorylées en sortie de phase M (Burke et Gerace, 1986 ; Heald et McKeon, 1990). Cette phosphorylation contribuerait à la GVBD. Les sites de phosphorylation *in vivo* de la Lamine B2 sont phosphorylés *in vitro* par Cdc2 (Peter *et al.*, 1990), ainsi que par les MAPK (Peter *et al.*, 1992). Cependant, la phosphorylation des Lamines par Cdc2 n'est pas suffisante. Dans des extraits acellulaires, des noyaux interphasiques ne subissent pas la GVBD, même si les Lamines sont phosphorylées par du MPF purifié (Peter *et al.*, 1990).

5.4.4. Les Histones

L'activité Histone H1-kinase, associée à l'activité du MPF, augmente fortement avant l'entrée en phase M. Le MPF phosphoryle l'Histone H1 *in vitro* et *in vivo* (Guo *et al.*, 1995). Cette phosphorylation serait impliquée dans la condensation des chromosomes par le biais du recrutement des facteurs de compaction telle que la Topoisomerase II (Adachi *et al.*, 1991).

5.4.5. Les MAP

Le MPF est associé aux microtubules par l'intermédiaire de MAP4 (Microtuble-Associated Proteins 4) (Fellous *et al.*, 1994 ; Ookata *et al.*, 1995). *In vitro*, Cdc2 régule la vitesse d'élongation des microtubules (Verde *et al.*, 1990 ; Verde *et al.*, 1992). Cdc2 phosphoryle MAP4 et inhibe son activité stabilisatrice des microtubules. Néanmoins, MAP4 ne perd pas sa capacité de fixation aux microtubules, ce qui maintient la localisation du MPF au niveau du fuseau de division (Ookata *et al.*, 1995). L'association de Cdc2 à d'autres MAP n'est pas exclue puisque le MPF phosphoryle également MAP2 (Faruki *et al.*, 1992 ; Itoh *et al.*, 1997) ce qui entraine, d'une part, une diminution de la capacité de fixation de MAP2 sur la tubuline et, d'autre part, une diminution de la polymérisation des microtubules (Burns *et al.*, 1984). XMap215 est aussi phosphorylée *in vitro* par Cdc2 (Vasquez *et al.*, 1999). Toutes ces MAP peuvent également être phosphorylées par les MAPK.

6. Les voies MAPK

6.1. Généralités

6.1.1. Les différentes voies MAPK

La première MAPK, initialement appelée Microtubule Associated Protein Kinase, a été identifiée grâce à sa capacité de phosphorylation de MAP2 dans les cellules NIH3T3 stimulées par l'insuline. Elle fut baptisée Erk1 (Extracellular regulated kinase 1) en raison de son activation en réponse aux signaux extracellulaires tels que les signaux mitogènes (Boulton *et al.*, 1990). Aujourd'hui connues sous le nom de Mitogen Activated Protein Kinases, les MAPK présentent des fonctions pléiotropes non restreintes aux microtubules. Elles sont notamment reconnues pour leur rôle pivot dans la transduction des signaux extracellulaires.

Chez les eucaryotes, les MAPK ont été fortement conservées au cours de l'évolution. Ces enzymes appartiennent à la grande famille des sérine/thréonine-kinases et fonctionnent en cascades composées de plusieurs niveaux où chaque kinase activée phosphoryle une kinase en aval (Raman *et al.*, 2007). Les membres de ces cascades sont organisés en modules indépendants : une MAPKKK/MAP3K (MAP-Kinase Kinase Kinase), une MAPKK/MAP2K (MAP-Kinase Kinase) et une MAPK (MAP-Kinase). Les MAPK phosphorylent finalement des MAPKAPK (MAPK-Activated Protein Kinase) situées en aval de la cascade **(Figure 26)**. La dynamique spatio-temporelle de ces voies est régulée positivement ou négativement par d'autres protéines, *i.e.* les protéines phosphatases et les protéines chaperonnes (O'Neill et Kolch, 2004 ; Ebisuya *et al.*, 2005).

Les membres de la famille des MAPK sont répartis en différentes voies ayant leurs propres mécanismes de régulation **(Figure 26 et Tableau 4)**. Ces différentes voies MAPK orchestrent des processus biologiques distincts et sont déregulées dans de nombreux types de cancers (Cobb et Goldsmith, 1995 ; Seger et Krebs, 1995 ; Chang et Karin, 2001 ; Downward, 2003 ; Bradham et McClay, 2006 ; Dhillon *et al.*, 2007 ; Roberts et Der, 2007). Sept voies de signalisation MAPK sont dénombrées à ce jour :

- La voie MAPK/Erk1 et 2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) répond aux signaux extracellulaires stimulant la croissance ou la différenciation ;
- La voie MAPK/JNK ou SAP-Kinases (c-Jun N-terminal Kinases ou Stress-Activated Protein Kinases) sont activées par des signaux de stress ;
- La voie p38MAPK répond également à des signaux de stress ;
- La voie MAPK/Erk5 (encore appelée Big MAPK) est impliquée dans la réponse aux signaux de stress nutritionnel ;
- Enfin, les MAPK/Erk3 et 4 ; NLK et MAPK/Erk7 sont considérées comme atypiques et leur régulation demeure encore mal connue (Coulombe et Meloche, 2007).

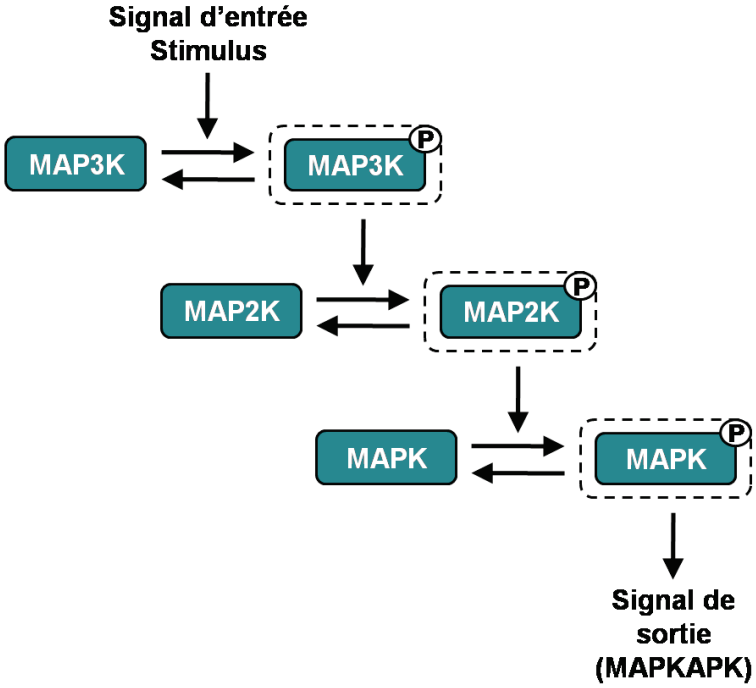


Figure 26 : Organisation en cascade des voies MAPK. En réponse à un stimulus, une MAP3K phosphoryle une MAP2K qui phosphoryle une MAPK. Le signal de sortie correspond à la phosphorylation d'une MAPKAPK.

Stimuli	Facteurs de croissance (FC)	Stress cellulaire Inflammation Cytokines FC		Stress cellulaire FC	N.D.	N.D.	N.D.
MAP3K	p39Mos, Raf	MEKK1/4 MLK3	MLK 3 TAK	MEKK2/3 Tpl2	N.D.	TAK1	N.D.
MAP2K	MEK1/2	MKK4/7	MKK3/6	MEK5	N.D.	N.D.	N.D.
MAPK	Erk1/2	JNK1/2/3 (SAPK)	p38MAPK	Erk5 (BMK)	Erk3/4	NLK (Nemo, LIT-1)	Erk7
Réponse	Prolifération Différenciation Développement	Inflammation Apoptose Prolifération Différenciation		Prolifération Différenciation Développement	N.D.	N.D.	N.D.

Tableau 4 : Les différentes voies MAPK. Chaque voie MAPK est constituée de trois modules qui sont séquentiellement activés par phosphorylation. Lorsque la MAPK est activée, elle phosphoryle différentes cibles comme des facteurs de transcription ou des kinases. En réponse à un stimulus défini, les MAPK stimulent une réponse cellulaire bien précise telles que la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation.

6.1.2. La voie MAPK/Erk dans l'ovocyte de Xénope

Parmi les nombreux facteurs de transduction mobilisés par les signaux mitogènes, le réseau de protéines MAPK/Erk (Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular signal-Regulated Kinase) joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire. Cette voie de signalisation relaye des signaux externes depuis la membrane cellulaire jusqu'aux effecteurs nucléaires ou cytoplasmiques, et exerce des rôles cruciaux dans de nombreux aspects de la vie d'une cellule. L'activation de ce réseau, composé des membres MAPKKK/MAP3K/MEKK (Raf, p39Mos), MAPKK/MAP2K/MEK (MEK1 et 2), et MAPK/Erk (Erk1 et 2), conduit les cellules à se multiplier, à migrer, à se différencier ou à mourir **(Tableau 4)**. La voie MAPK/Erk a été identifiée comme une cible thérapeutique dans les stratégies anti-cancéreuses (Bodart *et al.*, 2002b ; Kohno et Pouyssegur, 2006).

6.2. Les membres de la voie MAPK identifiés dans l'ovocyte de Xénope

6.2.1. Les MAPKKK/MAP3K/MEKK

6.2.1.1. Raf1 (70-74 kDa)

Principales MEK-Kinase (MEKK) dans les cellules somatiques (Morrison et Cutler, 1997 ; Schaeffer et Weber, 1999), la protéine Raf a été initialement identifiée comme une oncoprotéine rétrovirale à activité sérine/thréonine-kinase (Rapp *et al.*, 1983 ; Moelling *et al.*, 1984). Son activation nécessite son recrutement à la membrane par l'intermédiaire de la protéine p21Ras (Kikuchi et Williams, 1994 ; Leevers *et al.*, 1994 ; Mineo *et al.*, 1997). Chez l'humain, trois isoformes de Raf ont été identifiées, A-Raf, B-Raf et C-Raf. Elles présentent trois régions conservées. La région CR1, localisée en position N-terminale, contient le domaine de liaison à la GTPase p21Ras permettant le recrutement de Raf à la membrane et son activation (Vojtek *et al.*, 1993 ; Nassar *et al.*, 1995 ; Morrison et Cutler, 1997). Également localisée en N-terminale, la région CR2 a un domaine riche en sérines et thréonines phosphorylables, responsables d'interactions protéiques et affectant la localisation et l'activation de Raf (Morrison *et al.*, 1993 ; Yao *et al.*, 1995 ; Morrison et Cutler, 1997 ; Zimmermann et Moelling, 1999 ; Guan *et al.*, 2000 ; Zhang et Guan, 2000). La région CR3, localisée en C-terminale, contient le domaine d'activité kinasique (Heidecker *et al.*, 1990).

Au cours de la reprise méiotique, Raf1 est phosphorylée et activée dans les ovocytes de Xénope (Fabian *et al.*, 1993a ; Muslin *et al.*, 1993b) et non dans les ovocytes de souris (Verlhac *et al.*, 1996). Dans les ovocytes de Batraciens, la microinjection d'une protéine Raf oncogénique entraîne la GVBD et la phosphorylation des MAPK (Muslin *et al.*, 1993b) alors que l'injection de dominants négatifs de Raf empêchent l'activation des MAPK lors d'une stimulation par la progestérone ou par la microinjection d'une forme oncogénique de p21Ras (Fabian *et al.*, 1993b ; Muslin *et al.*, 1993a). La microinjection d'une forme constitutivement active de Raf stimule l'activation de la voie MAPK malgré l'inhibition de la synthèse de p39Mos par des oligonucléotides phosphodiesters antisens (Fabian *et al.*, 1993b).

Ces observations ont alors suggéré que Raf soit nécessaire à l'activation de la voie MAPK et qu'elle agit en aval de p39Mos. Cependant, d'autres travaux sont en contradiction avec ces résultats. En effet, dans des extraits acellulaires, l'activation de la voie MAPK par une protéine p39Mos purifiée n'est pas bloquée par l'ajout d'un dominant négatif de Raf (Shibuya *et al.*, 1996). De plus, la phosphorylation complète de Raf requerrait l'activation de MEK et des MAPK (Baert *et al.*, 2003 ; Adler *et al.*, 2005) **(Figure 25)**. Enfin, des travaux ont souligné le rôle crucial de la voie PI3-Kinase dans les mécanismes par lesquels les voies p21Ras déclenchent la GVBD, ce qui minimise tout rôle physiologique de Raf lors de la reprise méiotique (Gaffre *et al.*, 2006), même lorsque cette dernière est activée de manière Ras-dépendante *via* l'insuline (Baert *et al.*, 2003).

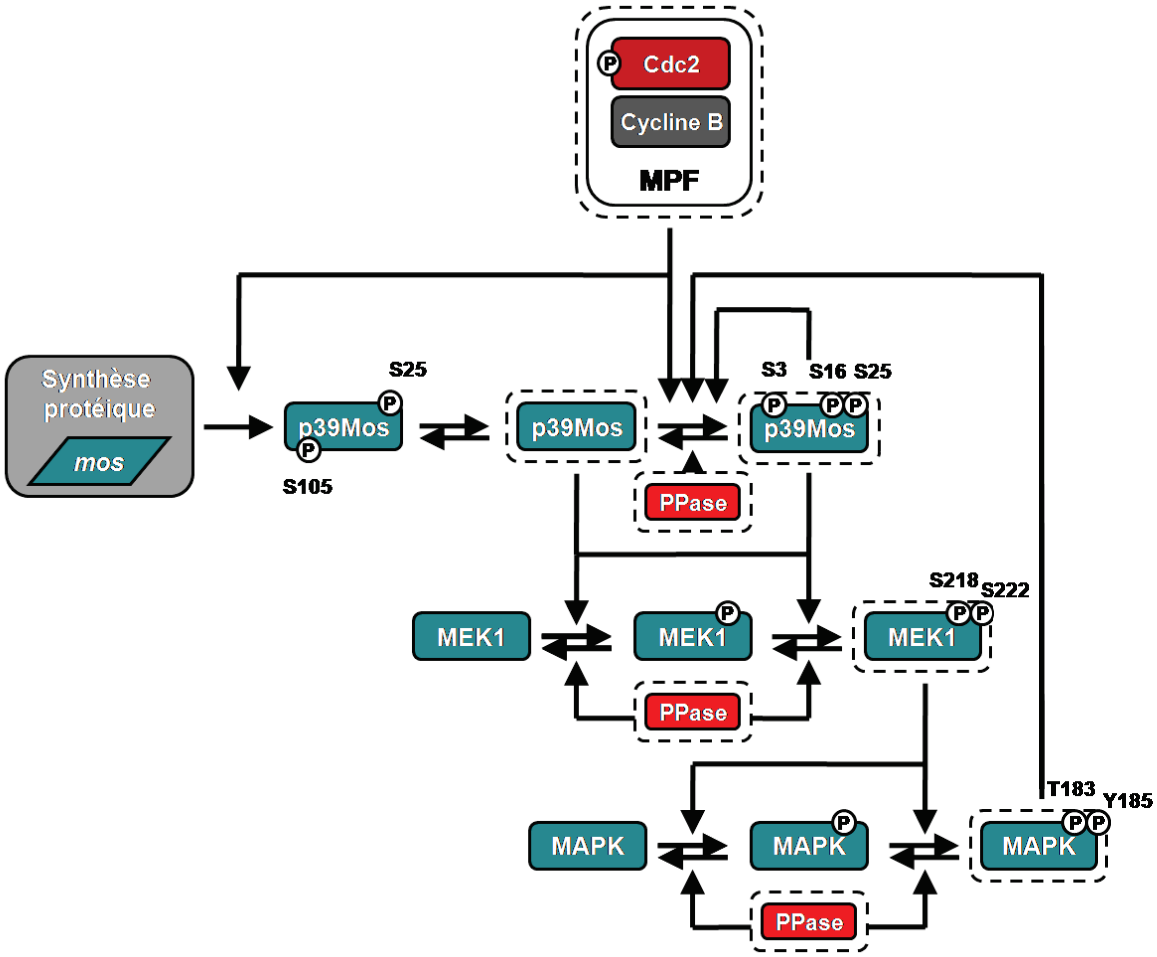


Figure 27 : Mécanismes de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK lors de la reprise méiotique. Lors de la reprise méiotique, p39Mos est synthétisée mais instable. Une fois active, p39Mos phosphoryle MEK1 qui en retour phosphoryle MAPK. Si les phosphatases (PPases) régulent négativement la cascade, des mécanismes de rétrocontrôles positifs maintiennent l'expression de p39Mos lors de la maturation : les MAPK et le MPF stimulent la polyadénylation de l'ARNm *mos* et phosphorylent le résidu sérine 3, stabilisateur de la MAP3K (voir Figure 28).

6.2.1.2. p39Mos (39 kDa)

α. *Généralités*

Le proto-oncogène *c-mos* est l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-mos* du virus responsable du sarcome murin de Moloney (Oskarsson *et al.*, 1980). Généralement absente dans les cellules somatiques (Propst et Vande Woude, 1985), l'oncoprotéine p39Mos présente une activité sérine/thréonine-kinase et active la MAP2K/MEK, qui active MAPK (Sagata *et al.*, 1988 ; Nebreda et Hunt, 1993 ; Posada *et al.*, 1993) **(Figure 27)**.

Dans les ovocytes de Xénope, plusieurs travaux ont mis en évidence que p39Mos active la voie des MAPK par l'intermédiaire des MEK lors de la reprise méiotique stimulée par la progestérone :

- L'utilisation d'une protéine malE-Mos *in vitro* (Huang et Ferrell, 1996), ou la microinjection *in ovo* de l'ARNm *mos* (Sagata *et al.*, 1989b), ou d'une protéine p39Mos non dégradable (Yew *et al.*, 1992) provoque l'activation du MPF et la GVBD en absence de stimulation hormonale.
- Inversement, la microinjection d'oligonucléotides antisens *mos* de type phosphodiester (Barrett *et al.*, 1990), morpholine (Dupre *et al.*, 2002a) ou phosphorothioate (Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005) bloque la synthèse de p39Mos, l'activation des MAPK et l'activation de p90Rsk stimulés par la progestérone ou l'insuline. L'accumulation de p39Mos et l'activation de la voie MAPK ne semblent néanmoins pas essentielles à la GVBD puisqu'à la différence d'une stratégie antisens de type phosphodiester, la microinjection d'oligonucléotides antisens de type morpholine ne bloque pas la GVBD induite par la progestérone (Dupre *et al.*, 2002a ; Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005).
- Enfin, dans des extraits ovocytaires, l'ajout de p39Mos stimule l'activation des MAPK d'une façon dépendante de la MAP2K/MEK (Nebreda et Hunt, 1993 ; Posada *et al.*, 1993 ; Shibuya et Ruderman, 1993). En effet, p39Mos phosphoryle directement la MAP2K/MEK1 *in vivo* (Posada *et al.*, 1993) et l'injection d'anticorps dirigés contre MEK1 bloque la reprise méiotique stimulée par l'injection de p39Mos (Kosako *et al.*, 1994b).

Absente des ovocytes immatures, p39Mos est accumulée lors de la reprise méiotique (Sagata *et al.*, 1988 ; Freeman *et al.*, 1989 ; Sagata *et al.*, 1989b) **(Figure 27)**, puis stockée dans les ovocytes matures où elle est rapidement dégradée après la fécondation (Sagata *et al.*, 1988 ; Watanabe *et al.*, 1989 ; Watanabe *et al.*, 1991). Cette dégradation serait dépendante de l'ubiquitinylation, mais indépendante de Cdc20 (Nishizawa *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1993 ; Castro *et al.*, 2001a). Au cours de la maturation ovocytaire, l'accumulation de p39Mos résulte, d'une part, de la traduction de son ARNm maternel (synthèse) et, d'autre part, de la modification post-traductionnelle de la protéine (activation et stabilisation).

β. *Mécanismes de régulation de la synthèse de p39Mos*

Chez le Xénope, l'ARNm *mos* est détecté précocement au cours de l'ovogenèse et reste stable jusqu'à la gastrulation. La protéine n'est cependant présente qu'au cours de la maturation. Dans l'ovocyte en prophase I, l'absence de queue poly(A) sur les ARNm maternels *mos* empêche leur traduction. Après stimulation de l'ovocyte par la progestérone, les ARNm codant p39Mos sont parmi les premiers à être polyadénylés et traduits (Sheets *et al.*, 1995 ; Gebauer et Richter, 1997). Cette polyadénylation serait dépendante du MPF (Ballantyne *et al.*, 1997 ; Frank-Vaillant *et al.*, 1999) **(Figure 27)**. La protéine p39Mos s'accumule peu de temps avant la GVBD et n'est dégradée qu'à la fin de la seconde division méiotique (Sagata *et al.*, 1988).

Rôle de la PKA dans l'inhibition de la synthèse de p39Mos : La voie MAPK est activée en aval de la levée du blocage en prophase I par la PKA **(Figure 25)**. L'injection d'une PKA active ou inactive inhibe la phosphorylation des MAPK et de p90Rsk lors d'une stimulation par la progestérone (Schmitt et Nebreda, 2002b, a). La présence de la PKA empêche la synthèse de p39Mos lorsque les MAPK sont inactives (Faure *et al.*, 1998). Dans les ovocytes de rat, la PKA inhibe la polyadénylation de l'ARNm *mos* (Lazar *et al.*, 2002).

Phosphorylation et inhibition de la CPEB : La polyadénylation de l'ARNm *mos* nécessite la phosphorylation précoce de la CPEB sur la sérine 174 par Aurora A/Eg2 (Paris *et al.*, 1991 ; Hake et Richter, 1994 ; de Moor et Richter, 1997). La phosphorylation de la CPEB est nécessaire et suffisante pour déclencher la polyadénylation de *mos*. Elle permet le recrutement du CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) au niveau du signal de polyadénylation (Mendez *et al.,* 2000b). Dans les ovocytes immatures, un faible niveau de CPEB phosphorylée est détecté. Lors de la reprise méiotique, simultanément à la polyadénylation de l'ARNm *mos,* elle devient hautement phosphorylée **(Figure 18)**. La microinjection d'une protéine CPEB mutée pour ce résidu agit comme un dominant négatif non phosphorylable qui bloque la synthèse de p39Mos. À l'inverse, une protéine CPEB mutante, chargée d'acide aspartique mimant la phosphorylation, est suffisante pour stimuler la polyadénylation de l'ARNm *mos* et l'accumulation de la protéine, même en absence de progestérone (Mendez *et al.*, 2000b).

Le nombre de séquences CPE modifie la cinétique de polyadénylation : La polyadénylation séquentielle des ARNm est régulée par le nombre de CPE présents au niveau 3'UTR des ARNm. L'ARNm *mos*, qui est polyadénylé précocement, présente un seul CPE alors que les ARNm traduits tardivement, comme les ARNm *cyclines B1* et *B4,* en ont plusieurs **(Figure 19)**. Les travaux de de Moor et Richter (1997) ont montré que lorsqu'un des deux CPE de la *cycline B1* est retiré, la polyadénylation de l'ARNm devient indépendante de p39Mos et de Cdc2, et que l'ARNm est polyadénylé précocement. Il est possible que les deux CPE, et ainsi les deux CPEB qui les lient, puissent inhiber la formation d'un complexe de polyadénylation actif par dimérisation ou interaction avec d'autres facteurs qui lieraient les deux CPEB (Mendez *et al.*, 2000b). Une telle configuration de facteurs empêcherait l'interaction précoce de la CPEB avec le CPSF lors de la reprise méiotique. La destruction

partielle de la CPEB, induite par Cdc2, libèrerait une des molécules qui interagit avec le CPSF et permettrait la polyadénylation et la traduction des ARNm (Paris *et al.*, 1991 ; Hake et Richter, 1994 ; Katsu *et al.*, 1999). Il est à souligner que l'implication du nombre de CPE dans la cinétique de polyadénylation a été contestée par les travaux de Charlesworth et collaborateurs (2004) puisque l'ARNm *cycline A1* possède une seule séquence CPE bien qu'elle soit polyadénylé tardivement. D'après ces auteurs, le retard de polyadenylation de l'ARNm *cycline A1* s'explique, d'une part, par l'absence de séquence PRE et, d'autre part, par le chevauchement de la séquence CPE et du signal de polyadénylation en région 3'UTR de son ARNm.

Implication d'une séquence PRE dans la polyadénylation précoce : Des travaux récents suggèrent que l'activation traductionnelle initiale de p39Mos implique un nouvel élèment régulateur : le PRE (Polyadenylation Response Element) localisé dans la region 3'UTR de l'ARNm (Charlesworth *et al.*, 2002). Alors que le PRE et le CPE se chevauchent partiellement à l'intérieur du 3'UTR, ils sont fonctionnellement différents. La polyadénylation et la traduction stimulées par le PRE précèdent celles stimulées par le CPE. Le PRE serait sensible à l'activité des MAPK alors que la polyadénylation cytoplasmique dirigée par le CPE est principalement stimulée par Aurora A/Eg2 et Cdc2. Il est cependant à souligner que les MAPK ne sont pas actives lors de la synthèse très précoce PRE-dépendante de p39Mos.

La présence des deux séquences, PRE et CPE, en région 3'UTR de l'ARNm *mos* expliquerait l'accumulation biphasique de p39Mos observée suivant la stimulation hormonale (Gotoh *et al.*, 1995). Dans un premier temps, la progestérone stimulerait la traduction très précoce de p39Mos *via* le PRE. L'activation des MAPK soutiendrait ensuite la synthèse précoce de p39Mos par le biais d'une boucle d'autoamplification dépendante du PRE (Charlesworth *et al.*, 2004). Néanmoins, en absence de CPEB, la synthèse PRE-dépendante de p39Mos n'est pas suffisante pour stimuler la reprise méiotique (Charlesworth *et al.,* 2002). Dans un second temps, la phosphorylation précoce de la CPEB par Aurora A/Eg2 (puis tardive par Cdc2) permettra l'accumulation significative (puis soutenue) de p39Mos permettant l'activation des MAPK et la reprise méiotique **(Figure 19)**. De par sa nature transitoire, la polyadénylation induite par le PRE ne peut pas se suffire à elle-même. Ainsi, les séquences PRE et CPE pourraient fonctionner séquentiellement pour initier et maintenir l'accumulation de la protéine p39Mos *in vivo* en réponse à la progestérone (Charlesworth *et al.*, 2002). Il est à souligner qu'à la différence des ovocytes de Xénope, les ARNm *mos* de Mammifères ne présentent pas de séquence PRE et seraient uniquement régulés par les CPEB (Prasad *et al.*, 2008). Ceci expliquerait que dans l'ovocyte murin, l'oncoprotéine p39Mos s'accumule tardivement, *i.e.* après la GVBD (Gebauer *et al.*, 1994).

γ. Mécanismes de régulation post-traductionnelle de p39Mos

La protéine p39Mos synthétisée avant la GVBD présente un niveau partiel de phosphorylation associé à une faible demi-vie (Sagata *et al.*, 1989b ; Watanabe *et al.*, 1989 ; Sheng *et al.*, 2002). Cependant, cet état n'empêche pas l'activité catalytique de p39Mos et permet de stimuler la cascade MAPK ainsi que la GVBD (Sagata *et al.*, 1988 ; Freeman *et al.*, 1989 ;

Sagata *et al.*, 1989b). Pendant et après la GVBD, la phosphorylation de p39Mos augmente progressivement **(Figure 27)**. p39Mos est totalement phosphorylée et métaboliquement stable dans les ovocytes matures (Watanabe *et al.*, 1989). Les MAPK et Cdc2 phosphorylent et stabilisent p39Mos *in vitro* (Matten *et al.*, 1996 ; Singh et Arlinghaus, 1997 ; Pham *et al.*, 1999 ; Castro *et al.*, 2001a). Quatre résidus de p39Mos, les sérines 3, 16, 25 et 105, ont été identifiés comme des sites majeurs de phosphorylation **(Figure 28)** :

Sérine 3 : La phosphorylation de la sérine 3 facilite l'association de p39Mos avec MEK (Chen et Cooper, 1995). Ce résidu est une cible d'autophosphorylation (Nishizawa *et al.*, 1992). Cette phosphorylation de la sérine 3 persiste néanmoins lorsque l'activité kinasique de p39Mos est supprimée par mutation (Freeman *et al.*, 1992). *In vitro*, les MAPK phosphorylent également ce résidu (Matten *et al.*, 1996). Au moment de la GVBD, la phosphorylation de la sérine 3 augmente la stabilité de p39Mos en empêchant la reconnaissance par une Ubiquitine-ligase du résidu proline 2 adjacent (Freeman *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1993). La proline 2 n'interviendrait pas directement dans la stabilisation de p39Mos mais serait responsable d'une régulation négative de la phosphorylation de la sérine 3, qui inhibe la dégradation de la protéine. Ainsi, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée sur le résidu sérine 3, la demi-vie de p39Mos ne dépasserait pas la demi-heure (Sheng *et al.*, 2002).

Sérine 16 : Les MAPK (Matten *et al.*, 1996) et le MPF (Liu *et al.*, 1990) sont capables de phosphoryler le résidu sérine 16 de p39Mos *in vitro*. Dans les cellules COS7 transfectées exprimant p39Mos, la phosphorylation de la sérine 16 de la MAP3K inhibe sa dégradation (Pham *et al.*, 1999).

Sérine 25 : Dans les cellules somatiques, la sérine 25 est le site majeur de phosphorylation du produit de l'oncogène *v-mos*. Ce résidu est phosphorylé par la PKA. Cette phosphorylation provoque une légère augmentation de l'activité de p39Mos (Yang *et al.*, 1996). Pourtant, chez le Xénope, la phosphorylation de ce site inhiberait l'activation de p39Mos induite par la phosphorylation de la sérine 3 (Yang *et al.*, 1998 ; Yue et Ferrell, 2006).

Sérine 105 : Située en région N-terminale de l'hélice αC du domaine kinasique de p39Mos, la sérine 105 est impliquée dans l'activité de l'oncoproétine. La mutation de cette sérine rend la kinase inactive et ne stimule pas la reprise méiotique lorsque celle-ci est injectée dans un ovocyte immature (Freeman *et al.*, 1992 ; Yue et Ferrell, 2006). Les observations de Yue et Ferrell (2006) suggèrent enfin que la déphosphorylation de ce résidu est impliquée dans un changement de conformation de la protéine, impliquant la rotation de l'hélice αC, responsable de l'activité kinasique de p39Mos.

Un autre site de phosphorylation a été mis en évidence : la sérine 232 (S263 de v-Mos) est un site mineur de phosphorylation dans les cellules somatiques transformées. Il peut être phosphorylé *in vitro* par la PKA (Singh et Arlinghaus, 1997).

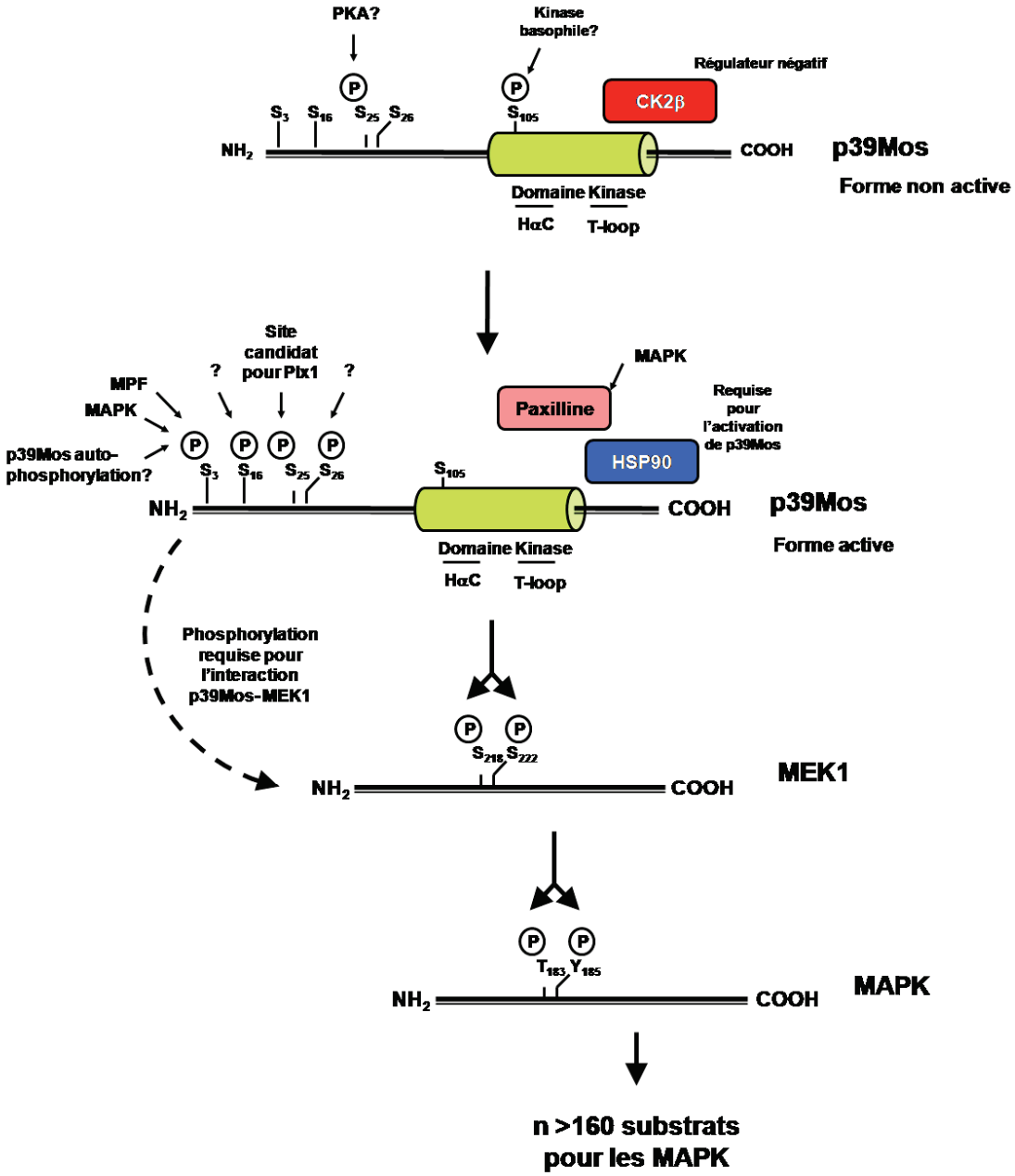


Figure 28 : Mécanismes de régulation post-traductionnelle de l'oncoprotéine p39Mos, de MEK et des MAPK lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. Avant la GVBD, la protéine p39Mos est instable et rapidement dégradée par le protéasome. Cette instabilité est dûe à la phosphorylation des sérines 25 et 105, et à l'absence de phosphorylation de la sérine 3. Sa liaison avec la CK2β empêche son activation catalytique. Pendant et après la GVBD, la sérine 16 est phosphorylée et la sérine 3 auto-phosphorylée, ou phosphorylée par le MPF et les MAPK. La dissociation de CK2β et l'association de Hsp90 et de la Paxilline avec p39Mos sont nécessaires à l'activation de la MAP3K. En aval, p39Mos phosphoryle les résidus S218 et S222 de MEK1, qui en retour phosphoryle les résidus T183 et Y185 des MAPK (Adapté d'aprèsYue et Ferrell, 2006).

δ. Les partenaires régulateurs de p39Mos

CK2β : La sous-unité régulatrice de la Caséine Kinase II s'associe à p39Mos et l'inhibe (Chen et Cooper, 1997 ; Chen *et al.*, 1997 ; Lieberman et Ruderman, 2004). Cette association empêcherait l'activation prématurée de la voie MAPK lors de la reprise méiotique. La dissociation de *CK2β* serait quant à elle nécessaire à l'activation de p39Mos (Yue et Ferrell, 2006) **(Figure 28)**.

Paxilline : La Paxilline serait requise pour l'accumulation de p39Mos, soit en augmentant la synthèse de la protéine, soit en inhibant sa dégradation (Rasar *et al.*, 2006) **(Figure 28)**. Cette protéine du cytosquelette est phosphorylée par les MAPK *in vitro*, ce qui suggère qu'elle participe à la mise en place d'un rétrocontrôle positif.

Hsp90 : La protéine chaperonne Hsp90 serait également nécessaire pour l'activation de p39Mos **(Figure 28)**. En effet, lors d'une stimulation des ovocytes par la progestérone, l'inhibition de Hsp90 par la Geldanamycine affecte la phosphorylation de p39Mos et bloque l'activation soutenue des MAPK. Dans ce contexte, la synthèse précoce de l'oncoprotéine n'est pas altérée, à l'inverse de la synthèse tardive qui se produit au environ de la GVBD (Fisher *et al.*, 2000). Il est à souligner que la protéine chaperonne ne semble plus nécessaire au maintien de l'activation et de l'activité de p39Mos en métaphase II puisque les MAPK restent actives après incubation des ovocytes matures dans une solution de Geldanamycine. Enfin, p39Mos interagirait avec la protéine Hsp70 bien que le rôle de celle-ci reste méconnu.

Cdc2 et MAPK : L'inhibition des mécanismes de dégradation de p39Mos facilite son accumulation. La microinjection d'une protéine Cdc2 purifiée dont l'activité kinasique est déficiente bloque l'accumulation de p39Mos sans affecter son taux de synthèse. Ceci suggère que la dégradation de p39Mos est régulée négativement par une voie dépendante du MPF (Nebreda *et al.*, 1995). *In vitro*, Cdc2 et les MAPK phosphorylent et stabilisent p39Mos (Matten *et al.*, 1996 ; Castro *et al.*, 2001a ; Castro *et al.*, 2001b) **(Figures 30 et 31)**.

XCdh1 : La synthèse de XCdh1, constituant de l'APC/c, est requise pour la GVBD stimulée par la progestérone. Le rôle de XCdh1 reposerait néanmoins sur un mécanisme indépendant de l'APC/c puisque l'activité du protéasome n'est pas nécessaire à la reprise méiotique. La microinjection de Cdh1 humaine permet d'accélérer les effets de la progestérone mais ne déclenche pas la GVBD en absence de stimulation hormonale. Par contre, elle entraîne la synthèse de p39Mos et l'activation des MAPK sans pour autant conduire à l'activation du MPF. Une activation des MAPK non-soutenue dans le temps n'aboutirait finalement pas à la GVBD (Papin *et al.*, 2004).

6.2.2. La MAPKK/MAP2K/MEK1 (44kDa)

Les MAP2K/MEK (MAPK/Erk-Kinase) sont les enzymes activatrices des MAPK. L'injection de formes constitutivement actives de MEK1 (Gotoh et Nishida, 1995a ; Huang *et al.*, 1995) ou de MEK2 (Bodart *et al.*, 2002b) dans des ovocytes immatures suffit à stimuler la reprise

méiotique. Détectable dans les ovocytes dès le stade I, la quantité de MEK1 augmente au cours de l'ovogenèse (Furuno *et al.*, 2003). Lors de la reprise méiotique, la MAP3K/p39Mos active directement les MEK1 *in vivo* par phosphorylation des résidus sérine 218 et sérine 222 (Posada *et al.*, 1993) **(Figure30)**. Dans les ovocytes, la MAPK/Xp42Mpk1 est le principal substrat identifié des MEK1 (Cowley *et al.*, 1994 ; Mansour *et al.*, 1994). Néanmoins, MEK1 phosphoryle une autre MAPK, JNK. La phosphorylation de JNK par MEK1 serait impliquée dans une boucle de rétrocontrôle, où JNK phosphoryle et active Raf (Baert *et al.*, 2003 ; Adler *et al.*, 2005) **(Figure 25)**. Expérimentalement, l'utilisation d'un inhibiteur chimique, l'U0126, inhibe l'activité catalytique mais pas la phosphorylation des MEK *in ovo.* Alors que l'injection d'anticorps anti-MEK1 bloque la reprise méiotique stimulée par injection de p39Mos, cet inhibiteur ne fait que retarder la GVBD (Kosako *et al.*, 1994c ; Gross *et al.*, 2000 ; Baert *et al.*, 2003).

6.2.3. Les MAPK

Les mécanismes précoces de l'activation des MAPK sont le résultat de l'activation des voies de transduction Ras-dépendantes et -indépendantes stimulées par les récepteurs à activité tyrosine-kinase.

6.2.3.1. MAPK/Xp42Mpk1/Erk2 (42 kDa)

Chez les vertébrés, deux formes très similaires de protéine Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase) sont exprimées : une protéine de 42 kDa (p42Erk2) et une protéine de 44 kDa (p44Erk1). Cependant, si les ovocytes d'Axolotl présentent les deux formes de la protéine Erk (Vaur *et al.*, 2004), une seule est exprimée et activée dans l'ovocyte de Xénope, MAPK/Xp42Mpk1 (Sagata *et al.*, 1988 ; Ferrell *et al.*, 1991 ; Gotoh *et al.*, 1991 ; Jessus *et al.*, 1991 ; Posada *et al.*, 1991). Également appelée Xp42Erk ou Xp42MAPK, elle est l'homologue de la MAPK mammalienne p42Erk2. Les Xp42Mpk1 sont les premières MAPK découvertes dans les ovocytes de Xénope pour leur capacité à phosphoryler la protéine MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) lors de la reprise méiotique (Haccard *et al.*, 1990). Par ailleurs, l'injection d'une forme thiophosphorylée de Erk2 dans des ovocytes immatures suffit à stimuler la reprise méiotique (Haccard *et al.*, 1995). Présente dès le stade I, le taux de MAPK ne s'accroit significativement qu'à partir du stade IV (Furuno *et al.*, 2003).

Chez *Xenopus laevis*, MAPK est activée par la MAP2K/MEK qui la phosphoryle sur les deux résidus thréonine 183 et tyrosine 185 présents au sein de la boucle d'activation de l'enzyme (Payne *et al.*, 1991 ; Kosako *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1994) **(Figure 27)**. Dans le modèle ovocytaire, MAPK présente une dynamique d'activation particulière dont les propriétés seront décrites dans au prochain chapitre. Bien que la protéine p90Rsk soit la principale cible des MAPK *in ovo* **(Figure 25)**, plus de 160 substrats des MAPK ont été recensés dans divers modèles cellulaires (Yoon et Seger, 2006). Ces substrats phosphorylés par les MAPK appartiennent à diverses catégories de protéines organisées selon leur rôle physiologique : facteurs de transcription, protéines du cytosquelette, kinases et phosphatases, protéines apoptotiques, protéases, protéines de signalisation, etc.

6.2.3.2. MAPK/JNK (40 et 49 kDa)

Les cellules mammaliennes expriment deux formes ubiquitaires JNK1 et JNK2 (Jun N-terminal protein Kinase), ainsi que JNK3, une forme spécifique du cerveau, du cœur et des testicules. Les poids moléculaires de ces protéines varient de 46 à 55 kDa (Gupta *et al.*, 1996). Lors de la reprise méiotique, deux isoformes de JNK sont exprimées et activées dans l'ovocyte. Leur poids moléculaire est respectivement de 40 kDa (Xp40JNK) et de 49 kDa (Xp49JNK). Xp40JNK et Xp49JNK sont les homologues des isoformes mammaliennes p42JNK1 et p54JNK2 (Bagowski *et al.*, 2001a).

Dans les ovocytes de Xénope, la microinjection de p39Mos, de MEK ou de Raf active les JNK. Bien qu'aucune MAP2K spécifique de la voie JNK n'ait été isolée dans les ovocytes de Xénope, ces dernières sont susceptibles d'être activées par MEK au moyen d'une boucle de rétrocontrôle impliquant MEK, JNK et Raf (Adler *et al.*, 2005) **(Figure 25)**. Par ailleurs, un choc osmotique provoqué par un milieu contenant 0,5 M de sorbitol active les JNK sans pour autant que les MAPK soient phosphorylées (Bagowski *et al.*, 2001a).

6.2.3.3. MAPK/p38MAPK (38 kDa)

Dans les cellules de Mammifères, quatre formes de MAPK de la famille des p38 sont connues : p38α, p38β, p38γ et p38δ (Johnson et Lapadat, 2002). Dans les ovocytes de Xénope, seules trois isoformes de p38MAPK ont été identifiées : p38α, p38β et p38γ. La présence de p38δ n'a pas été observée (Perdiguero *et al.,* 2003). MKK3 et MKK6 sont les deux MAP2K en amont de la voie de p38MAPK. Seule MKK6 a été clonée *in ovo* (Perdiguero *et al.*, 2003). Le rôle physiologique de p38MAPK dans la reprise méiotique reste à déterminer.

6.2.4. La principale MAPKAPK/p90Rsk (90 kDa)

La kinase p90Rsk (Ribosomal-S6 subunit protein kinase) a d'abord été découverte dans l'ovocyte de Xénope pour sa capacité à phosphoryler la sous-unité S6 du ribosome (Erikson et Maller, 1985). La MAPKAPK est un substrat des MAPK dont le rôle principal est d'être un relais de transduction de la voie p39Mos-MEK1-MAPK (Palmer *et al.*, 1998 ; Gross *et al.*, 2000). Dans l'ovocyte, deux isoformes de la protéine, Xp90Rsk1 et Xp90Rsk2, sont exprimées et ciblées par les MAPK (Bhatt et Ferrell, 1999). Ces protéines sont phosphorylées et activées lors de la reprise méiotique, puis déphosphorylées et désactivées après la fécondation (Erikson et Maller, 1989). Au cours de la maturation, les formes actives de p90Rsk phosphorylent et inhibent Myt1, la kinase inhibitrice de Cdc2 (Palmer *et al.*, 1998) **(Figure 25)**. L'injection d'une p90Rsk constitutivement active supplée les effets délétères de l'U0126, l'inhibiteur chimique des MEK (Gross *et al.*, 2000). Déjà présentes dans les ovocytes immatures, aucune dégradation de la protéine n'a jusqu'alors été rapportée.

6.2.5. Les Phosphatases

La phosphorylation réversible des protéines est un processus essentiel dans la régulation des événements cellulaires puisqu'environ 30% des protéines subissent cette modification post-traductionnelle au cours de leur vie (Cohen, 2000). Cette réversibilité est assurée par une balance fragile qui oppose la phosphorylation par les kinases à la déphosphorylation par les phosphatases. Les phosphatases sont communément divisées en trois groupes selon leur capacité à déphosphoryler le résidu tyrosine (tyrosine-phosphatases), le résidu thréonine (thréonine-phosphatases), voire les résidus tyrosines et thréonines. Ces dernières sont appelées phosphatases à double spécificité (DUSP ou DSP) (Farooq *et al.*, 2003). Les membres du réseau MAPK sont eux aussi susceptibles d'être régulés négativement par déphosphorylation de leurs résidus sérines, thréonines et/ou tyrosines (Saxena et Mustelin, 2000). Si de nombreuses phosphatases ont été identifiées dans les cellules somatiques, leur nature et leur rôle dans les ovocytes de Xénope sont peu définis. Les phosphatases identifiées ou étudiées dans le modèle ovocytaire seront présentées ci-dessous en fonction de leur affinité pour les MAPK.

6.2.5.1. Les MAPK-Phosphatases ou MKP

Les MKP sont des phosphatases qui déphosphorylent spécifiquement les MAPK. Elles font partie de la famille des DUSP à laquelle appartient également Cdc25. Les MKP comptent une dizaine de membres (Lewis *et al.*, 1995 ; Camps *et al.*, 2000 ; Theodosiou et Ashworth, 2002 ; Farooq et Zhou, 2004). Cependant, seules les phosphatases MKP1 et MKP3 ont été étudiées dans l'ovocyte de Xénope.

MKP1/DUSP1/CL100 déphosphoryle préférentiellement les JNK et p38MAPK plutôt que les MAPK de type Erk (Tanoue *et al.*, 2001 ; Theodosiou et Ashworth, 2002). XCL100 a été clonée chez le Xénope. Elle est la seule MKP connue dans les ovocytes immatures et matures dans lesquels elle est exprimée de manière constitutive. La surexpression de XCL100 retarde ou inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Sohaskey et Ferrell, 2002). *In vitro*, XCL100 recombinante déphosphoryle les résidus thréonines et tyrosines des MAPK de type Erk (Lewis *et al.*, 1995) et la microinjection de cette phosphatase *in ovo* inhibe partiellement la synthèse de p39Mos qui, par conséquent, est sous le rétrocontrôle positif des MAPK. Dans les ovocytes de bovins, l'injection d'ARNm *mkp1* empêche également l'activation des MAPK au cours de la maturation (Gordo *et al.*, 2001). Dans ce travail, le MPF est normalement activé mais le fuseau de métaphase est désorganisé et les chromosomes présentent un défaut d'alignement sur la plaque métaphasique. Le rôle de MKP1 sur les MAPK peut cependant être discuté. En effet, l'inhibition de MKP1 dans les cellules épithéliales n'a pas d'influence sur les MAPK (Adams *et al.*, 2005).

MKP3/DUSP6/PYST1/rVH6 est spécifique des MAPK de type Erk1 et Erk2 (Groom *et al.*, 1996 ; Muda *et al.*, 1996). La microinjection de MKP3 bloque la polyadénylation de l'ARNm *mos* stimulée par l'injection d'une MEK constitutivement active (Howard *et al.*, 1999). L'identification de MKP3 n'a néanmoins pas été rapportée dans l'ovocyte de Xénope.

6.2.5.2. Les phosphatases non-spécifiques des MAPK

Parmi les phosphatases non spécifiques des MAPK, les sérine/thréonine-phosphatases PP1 et PP2A ont été décrites dans l'ovocyte de Xénope. PP1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique fixe (cinq différentes chez les eucaryotes : α1, α2, β, γ1, γ2) et d'une sous-unité régulatrice variable qui module la localisation, l'activité enzymatique et la spécificité de la phosphatase pour son substrat (Ceulemans et Bollen, 2004 ; Wang *et al.*, 2008a). PP2A a été décrite comme un suppresseur de tumeur (Neviani *et al.*, 2005). Cette holoenzyme est constituée de trois sous-unités : une sous-unité catalytique (C), une sous-unité structurelle (A) et une sous-unité régulatrice (B). De nombreux isoformes existent pour la sous-unité B et seulement deux isoformes (α et β) existent pour les sous-unités A et C (Mumby et Walter, 1993 ; Wera et Hemmings, 1995 ; Virshup, 2000 ; Eichhorn *et al.*, 2009). Les permutations et combinaisons d'assemblage de PP2A confèrent à la protéine son activité enzymatique et sa spécificité pour son substrat (Janssens *et al.,* 2001). Le nombre de sous-unités régulatrices qui composent ces protéines compense la faible diversité des phosphatases.

Les phosphatases PP1 et PP2A sont inhibées par l'Acide Okadaïque (Bialojan et Takai, 1988). Dans l'ovocyte de Xénope, l'Acide Okadaïque provoque l'activation des MAPK de façon MEK-dépendante (Kosako *et al.*, 1994c), ainsi que l'autoamplification du MPF (Felix *et al.*, 1989 ; Goris *et al.*, 1989 ; Rime *et al.*, 1990). En accord avec cette dernière observation, la déplétion de PP2A active Cdc2 dans les extraits d'ovocytes de Xénope (Sohaskey et Ferrell, 1999 ; Maton *et al.*, 2005). Dans les extraits mitotiques, la déplétion de PP2A durant l'interphase et la phase M provoque respectivement une entrée prématurée et un retard de sortie de mitose (Mochida *et al.*, 2009). *In vitro*, PP1 et PP2A déphosphorylent les formes hyperphosphorylées de Cdc25 (Izumi *et al.*, 1992). PP1 déphosphoryle le résidu sérine 287 de Cdc25C, initialement phosphorylé par la PKA (Margolis *et al.*, 2003). Lorsqu'il est phosphorylé, ce résidu permet la fixation de 14-3-3, le régulateur négatif de Cdc25C (Kumagai *et al.*, 1998a). Par ailleurs, l'activation d'Aurora A/Eg2, impliquée dans la synthèse de p39Mos (Mendez *et al.*, 2000b ; Mendez *et al.*, 2000a ; Sarkissian *et al.*, 2004), est contre-régulée négativement par la PP1 (Tsai *et al.*, 2003) et nécessite l'activité du MPF (Maton *et al.*, 2005). La déphosphorylation inhibitrice du résidu thréonine 138 de Cdc25C par PP2A agit quant à elle en compétition avec la phosphorylation activatrice exercée par Plx1 (Karaiskou *et al.*, 1999). Récemment, il a été proposé que la kinase Greatwall inhibe PP2A dans le modèle ovocytaire. Greatwall active Cdc25C en absence d'activité Plx1 ou en présence d'activité PKA (Zhao *et al.*, 2008 ; Castilho *et al.*, 2009 ; Vigneron *et al.*, 2009). Dans les cellules somatiques, le rôle de ces phosphatases est moins clair. Dans les cellules épithéliales, une stratégie antisens *pp1* et *pp2A* prévient la déphosphorylation des MAPK (Aguilar *et al.*, 2009). À contrario, la surexpression de la sous-unité régulatrice de PP2ABγ provoque l'activation des MAPK et la différenciation des cellules neuronales (Strack, 2002). Dans les cellules rénales HEK, PP2A déphosphoryle un résidu inhibiteur de Raf1 qui active les MAPK (Adams *et al.*, 2005). Dans les cellules NIH3T3, la déphosphorylation activatrice de Raf1 serait renforcée par la déphosphorylation inhibitrice de KSR1 (Kinase Suppressor of Ras) par PP2A (Ory *et al.*, 2003). Suggérant un rôle plus complexe des phosphatases dans les fibroblastes du poumon HLF, l'inhibition des MAPK conduit à une hyperphosphorylation de

MEK de façon indépendante de Raf1, mais associée à l'inhibition de PP2A. Dans ce modèle, les MAPK activent la phosphatase *via* une boucle de rétrocontrôle (Bae et Ceryak, 2009).

D'autres phosphatases non spécifiques des MAPK sont présentes dans l'ovocyte. L'inhibition des PTP (*e.g.* XLPTP1) bloque l'activation calcium-dépendante des ovocytes en métaphase II (Bodart *et al.*, 1999). L'inhibition de PTEN (Phosphatase and TENsin homolg) inhibe la voie PI3-K en déphosphoyrlant PIP3 et provoque l'activation parthénogénétique des ovocytes matures (Mammadova *et al.*, 2009).

6.3. Rôles physiologiques de la voie MAPK dans le modèle ovocytaire

Contrairement aux cellules somatiques, la voie p39Mos-MEK1-MAPK n'a pas de fonction génomique dans les ovocytes de Xénope puisque le processus de maturation est indépendant de toute transcription. Néanmoins, la dynamique d'activation des MAPK apparait déterminante dans le bon déroulement de la méiose. L'utilisation de stratégies d'inhibition et d'activation de plus en plus spécifiques a permis d'identifier plus précisément la fonction des membres de la voie MAPK lors de la reprise méiotique et de la maturation des ovocytes de Xénope. Un état des connaissances sur les observations réalisées à partir de ces stratégies est proposé dans cette partie.

6.3.1. Rôle des MAPK dans l'entrée en phase M

6.3.1.1. Activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et GVBD

La reprise méiotique peut être déclenchée par la microinjection d'une protéine p21Ras humaine (Birchmeier *et al.*, 1985), par la microinjection d'une protéine p39Mos recombinante (Yew *et al.*, 1992) ou de son ARNm (Freeman *et al.*, 1989 ; Sagata *et al.*, 1989b). L'activation du MPF et la GVBD peuvent également être stimulées par la microinjection de formes constitutivement actives de MEK1 (Gotoh *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995) ou de MEK2 (Bodart *et al.*, 2002a), de Erk2 thiophosphorylée (Haccard *et al.*, 1995) ou de p90Rsk constitutivement active (Gross *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'activation du MPF et la GVBD, déclenchées par microinjection de p39Mos, MEK1 ou MEK2, sont indépendantes de la synthèse protéique (Yew *et al.*, 1992 ; Gotoh *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995 ; Bodart *et al.*, 2002b), alors que la reprise méiotique stimulée par une MAPK thiophosphorylée est dépendante de la traduction des ARNm maternels (Haccard *et al.*, 1995). L'activation du MPF et la GVBD peuvent donc être stimulées par le biais de la voie MAPK en absence d'hormone dans les ovocytes de Xénope.

6.3.1.2. Inhibition de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et GVBD

L'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK ne semble pas nécessaire pour la GVBD. Cependant, l'inhibition de la voie MAPK a donné des résultats contradictoires en fonction des stratégies d'inhibition utilisées **(Tableau 5)**.

Inhibiteur	Cible	p39Mos	GVBD	Réfrences
Mos-POAS	ARNm Mos	Non	Non	(Sagata et al., 1988)
Mos-MoAS	ARNm Mos	Non	Retard	(Baert et al., 2003 ; Dupré et al., 2002)
Mos-PTAS	ARNm Mos	Non	Retard	(Bodart et al., 2005)
Geldanamycine	Mos	Oui	Retard	(Fisher et al., 1999)
Raf-DN	Raf	n.d.	Non	(Muslin et al., 1993)
			Retard	(Fabian et al., 1993)
PD98059	MEK	n.d.	Non	(Cross et Smythe, 1998)
			Retard	(Fisher et al., 1999)
U0126	MEK	Oui	Retard	(Baert et al., 2003 ; Bodart et al., 2005 ; Gross et al., 2000)
		Non	Non	(Bagowski et al., 2001b)
Anthax LF	MEK	Non	Non	(Duesbery et al., 1998)
Ac anti-MEK	MEK	n.d.	Non	(Kosako et al., 1994)
CL100	MAPK	Faible	Non	(Gotoh et al., 1995)
ARNm *mkp1*	MAPK	Faible	Non	(Howard et al., 1999)
ARNm *rVH6*	MAPK	Faible	Non	(Howard et al., 1999)
ARNm *mkp3*	MAPK	n.d.	Retard	(Fisher et al., 1999)

Tableau 5 : Effets de différents inhibiteurs sélectifs des membres de la voie MAPK sur la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. L'effet des inhibiteurs est résumé en considérant l'accumulation de p39Mos et la reprise méiotique stimulée par la progestérone (GVBD). **Ac** : anticorps ; **DN** : dominant négatif ; **LF** : Facteur létal de la toxine de l'anthrax ; **Mos-MoAS** : oligonucléotides morpholines antisens *mos* ; **Mos-POAS** : oligonucléotides phosphorothioates antisens *mos* ; Mos-**MoAS** : oligonucléotides phosphodiesters antisens *mos* ; **n.d.** : non déterminé.

Certains travaux montrent que l'inhibition de la cascade des p39Mos-MEK1-MAPK par la microinjection d'oligonucleotides phosphodiesters antisens dirigés contre l'ARNm *mos* bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone ou par l'insuline et empêche l'activation du MPF ainsi que la GVBD (Sagata *et al.*, 1988 ; Barrett *et al.*, 1990). La reprise méiotique peut également être bloquée par microinjection d'anticorps anti-MEK (Kosako *et al.*, 1994a, c, b), par microinjection de la toxine du facteur létal de l'anthrax (LF) qui clive les MAP2K sans distinction (Duesbery *et al.*, 1998 ; Chopra *et al.*, 2003), ou par incubation des ovocytes en présence de PD98059, un inhibiteur de MEK1 et 2 (Cross et Smythe, 1998). Ce dernier résultat n'a néanmoins pas pu être reproduit (Fisher *et al.*, 1999b). Enfin, l'inhibition des MAPK par microinjection de la phosphatase CL100 (Gotoh *et al.*, 1995) ou d'anticorps neutralisants (Gotoh et Nishida, 1995b) empêche l'activation du MPF et la GVBD.

À l'inverse, d'autres travaux montrent que l'inhibition de la voie p39Mos-MEK1-MAPK induit un simple retard de GVBD lorsque les ovocytes sont traités par la progestérone. L'inhibition de la synthèse ou de l'activité de p39Mos, par microinjection d'oligonucléotides antisens de type morpholine ou phosphorothioate (Dupre *et al.*, 2002a ; Baert *et al.*, 2003) ou par incubation des ovocytes en présence de geldanamycine, inhibiteur de Hsp90 (Fisher *et al.*, 1999b ; Fisher *et al.*, 2000), n'empêche pas la GVBD mais la retarde. L'U0126, inhibiteur de MEK1 et 2, conduit à des résultats similaires (Gross *et al.*, 2000). La microinjection d'ARNm codant la phosphatase MKP3 retarde également la GVBD (Fisher *et al.*, 1999b).

6.3.1.3. Autres voies MAPK et GVBD

La microinjection d'anticorps ou d'une forme dominante négative de p21Ras n'empêche pas la reprise méiotique déclenchée par la progestérone mais bloque celle stimulée par l'insuline (Deshpande et Kung, 1987 ; Korn *et al.*, 1987). En présence de progestérone, la microinjection d'une forme dominante négative de Raf retarde (Fabian *et al.*, 1993b) ou inhibe (Muslin *et al.*, 1993b) la reprise méiotique.

Bien que la surexpression de MKK6 et de p38γ déclenche la GVBD, la microinjection de formes mutantes dominantes négatives de Xp38γ ou de MKK6 ne fait que la retarder (Perdiguero *et al.*, 2003).

6.3.2. Rôle des MAPK dans la morphogénèse du fuseau de division

Le rôle des MAPK dans la formation du fuseau de division est très bien documenté chez les Mammifères et moins chez les Batraciens. Afin d'appréhender clairement les fonctions des MAPK dans ce processus, les deux modèles seront présentés séparément.

6.3.2.1. Chez les Mammifères

De nombreuses études réalisées dans les ovocytes de Mammifères ont mis en évidence que la voie MAPK intervient dans le contrôle de la formation et de la stabilité du fuseau de division méiotique (Fan et Sun, 2004). Dans les ovocytes de porc et de souris, les MAPK sont localisées aux pôles du fuseau de métaphase et migre le long du fuseau durant la transition métaphase/anaphase (Lee *et al.*, 2000 ; Hatch et Capco, 2001 ; Fan *et al.*, 2003). Rsk suit le même profil de localisation (Fan *et al.*, 2003).

Dans les ovocytes de souris, l'inhibition de p39Mos par injection d'oligonucléotides antisens (Paules *et al.*, 1989) ou d'anticorps (Zhao *et al.*, 1991) empêche la formation du fuseau méiotique et bloque l'expulsion du premier globule polaire. Pourtant, des ovocytes de souris dont l'activité MAPK est inhibée par mutation des deux allèles du gène *mos* peuvent se diviser et expulser le premier globule polaire, même si ce dernier est anormalement grand (Verlhac *et al.*, 2000). Des ovocytes provenant de souris nullizygote *mos-/-* montrent des altérations microtubulaires et chromatiniennes. Le réseau microtubulaire prophasique se maintient au cours de la métaphase I. Des réseaux microtubulaires astraux persistants

pourraient être responsables de la mauvaise association du fuseau méiotique à la membrane (Araki *et al.*, 1996 ; Choi *et al.*, 1996). Une autre étude a montré que de nombreux ovocytes *mos*-/- présentent des anomalies de répartitions des chromosomes sur la plaque équatoriale ainsi qu'une condensation plus faible de la chromatine (Araki *et al.*, 1996). Dans une troisième étude, les microtubules et la chromatine prennent un aspect interphasique entre la métaphase I et la métaphase II dans les ovocytes *mos-/-*, contrairement aux ovocytes témoins dans lesquels l'organisation microtubulaire et la condensation des chromosomes restent stables entre les deux divisions de méiotique (Verlhac *et al.*, 1996). L'ensemble de ces résultats s'expliqueraient par une dérégulation de la protéine MISS (MAP-Kinase-interacting and spindle-stabilizing protein), impliquée dans la stabilité et l'intégrité du fuseau de métaphase II (Lefebvre *et al.,* 2002). L'inhibition de sa synthèse entraîne la perte de l'organisation bipolaire du fuseau de métaphase II et l'apparition de nombreux asters dans le cytoplasme. MISS est un substrat de la voie MAPK et possède 4 sites potentiels de phosphorylation par les MAPK, ainsi qu'une séquence consensus de reconnaissance par ces dernières, le « Docking site » (Lefebvre *et al.*, 2002). L'injection d'ARNm codant MKP1 dans des ovocytes bovins conduit à une désorganisation du fuseau et de l'alignement des chromosomes ainsi qu'à une activation parthénogénétique des ovocytes (Gordo *et al.*, 2001). Enfin, la surexpression de p39Mos dans des cellules somatiques entraîne des aberrations chromosomiques résultant de l'altération du fuseau mitotique et de la binucléation des cellules, voire un arrêt du cycle cellulaire (Fukasawa et Vande Woude, 1995, 1997).

6.3.2.2. Chez les Batraciens

Les études qui s'intéressent au rôle des MAPK sur le fuseau de division sont beaucoup moins abondantes dans les modèles Batraciens. Chez le Xénope, l'inhibition de la voie MAPK induit la formation de fuseaux monopolaires dans des extraits ovocytaires (Horne et Guadagno, 2003). De même, de telles structures de type aster ont été mises en évidence dans des ovocytes traités par l'U0126 (Bodart *et al.*, 2002b ; Horne et Guadagno, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005), ou injectés d'oligonucléotides morpholines ou phosphorothioates antisens dirigés contre l'ARNm de p39Mos (Bodart *et al.,* 2005). De plus, des expériences de restauration de fuseau ont montré que p39Mos et p90Rsk jouent des rôles essentiels et complémentaires dans la morphogenèse de ce dernier (Bodart *et al.*, 2005). Chez *Rana japonica*, l'inhibition de MEK par l'U0126 ne permet pas l'organisation d'un MTOC à la base de la vésicule germinale. Les chromosomes ne se condensent que partiellement et aucun fuseau bipolaire ne s'organise. Entre 9 et 12 heures après la GVBD, les chromosomes se décondensent, une enveloppe nucléaire se reforme et l'ADN est répliqué. 15 à 18 heures après la GVBD, les chromosomes se recondensent partiellement mais aucun fuseau ne se forme (Kotani et Yamashita, 2002). L'injection de p39Mos dans les ovocytes de *Rana japonica* induit l'activation des MAPK mais non celle du MPF et la GVBD ne se produit pas (Yoshida *et al.*, 2000). Les chromosomes se condensent partiellement et le réseau microtubulaire entourant la vésicule germinative se réorganise (Kotani et Yamashita, 2002).

6.3.3. Rôle des MAPK dans le contrôle de l'assemblage du fuseau

La voie MAPK régule le point de contrôle d'assemblage du fuseau (Spindle Assembly Checkpoint ou SAC) qui inhibe la sortie de phase M jusqu'à l'attachement complet des chromosomes au fuseau (Wells et Murray, 1996). Au cours de ce processus, lors de la métaphase, certaines protéines s'associent aux kinétochores (Chen *et al.*, 1996 ; Li et Benezra, 1996 ; Taylor et McKeon, 1997 ; Taylor *et al.*, 1998). Le point de contrôle du fuseau régule l'activité de l'APC/c en inactivant Cdc20 et XCdh1 (Li *et al.*, 1997 ; Fang *et al.*, 1998 ; Gorbsky *et al.*, 1998 ; Kallio *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1998 ; Alexandru *et al.*, 1999 ; Fesquet *et al.*, 1999 ; Fraschini *et al.*, 1999). Bub1, une des protéines impliquées dans le SAC, est capable de supprimer l'activité de l'APC/c induite par Cdc20 (Alexandru *et al.*, 1999) et est phosphorylée et activée par les MAPK et p90Rsk (Schwab *et al.*, 2001). Bub1 et p90Rsk s'associent aux kinétochores avant l'alignement des chromosomes (Taylor et McKeon, 1997 ; Taylor *et al.*, 1998 ; Vigneron *et al.*, 2010).

Une autre voie, indépendante des MAPK, régulerait le SAC. Dans des extraits ovocytaires, le complexe Cdk2/Cycline E provoquerait un arrêt en métaphase II en absence de l'oncoprotéine p39Mos. Cette voie recourrait à la protéine Mps1 (Monopolar Spindle 1) impliquée dans le recrutement des protéines du SAC : Bub1/3 et Mad1/2. Un autre travail a montré que la phosphorylation de Msp1 (sérine 844) par les MAPK serait nécessaire pour localiser Msp1 au niveau des kinétochores (Zhao et Chen, 2006).

6.3.4. Rôle des MAPK dans la suppression de la phase S

La méiose se définit comme la succession de deux divisions cellulaires (réductionnelle et équationnelle) ininterrompues par une interphase et donc par une phase S, permettant le passage d'un état cellulaire diploïde vers un état cellulaire haploïde. Après la phase S pré-méiotique, les ovocytes perdent la capacité de répliquer l'ADN. Parmi tous les composants des complexes d'initiation de la réplication et de pré-réplication, seule la protéine Cdc6 est absente des ovocytes immatures de Xénope. Cette dernière est synthétisée tardivement au cours de la maturation et constitue un bon marqueur de passage en seconde division de méiose (Lemaitre *et al.*, 2002). Dans l'ovocyte de Xénope, la réplication précoce de l'ADN après la première division de méiose peut être provoquée par l'inhibition de la voie p39Mos-MEK1-MAPK, suggérant un rôle primordial de cette voie dans l'inhibition de la phase S (Furuno *et al.*, 1994 ; Gross *et al.*, 2000 ; Dupre *et al.*, 2002a).

Le rôle des MAPK dans la suppression de la phase S impliquerait l'activation du MPF. En effet, l'inhibition de Cdc2 (par un dominant négatif) ou de la synthèse des Cyclines dans les ovocytes de Batraciens ou d'étoiles de mer provoquent une diminution de l'activité MPF lors de la transition entre les deux divisions de méiose, et conduit à la reformation d'une enveloppe nucléaire et à l'entrée en phase S (Furuno *et al.*, 1994 ; Picard *et al.*, 1996 ; Roy *et al.*, 1996 ; Thibier *et al.*, 1997 ; Gross *et al.*, 2000). Cette hypothèse est confirmée lorsque l'activité du MPF est maintenue en absence de synthèse protéique : la co-injection de Cdc6 et d'une forte concentration de Cycline A en présence de Cycloheximide provoque la GVBD et

inhibe la réplication de l'ADN (Whitmire *et al.*, 2002). *In fine*, la voie p39Mos-MEK1-MAPK pourrait inhiber la phase S en maintenant un niveau d'activité MPF suffisamment élevé entre les deux divisions (Sagata *et al.*, 1989a ; Nebreda *et al.*, 1995 ; Abrieu *et al.*, 2001 ; Hochegger *et al.*, 2001). Il faut cependant noter que la voie MAPK n'est pas nécessaire pour la réactivation du MPF entre les deux phases de méiose chez la souris (Verlhac *et al.*, 1996).

6.3.5. Rôle des MAPK dans l'activité cytostatique

L'achèvement de la maturation ovocytaire se caractérise par un arrêt de la cellule en métaphase II en attente de la fécondation. L'existence d'une activité cytostatique (CSF) responsable de l'arrêt des ovocytes en métaphase II a été mise en évidence par Masui et Markert (1971). La microinjection de cytoplasme issu d'un ovocyte mature dans un blastomère d'embryon au stade 2 cellules provoque l'arrêt de ce blastomère en métaphase alors que le blastomère non-injecté continue à se diviser normalement **(Figure 29)**. L'activité cytostatique de l'ovocyte mature disparaît 30 à 45 minutes après la fécondation.

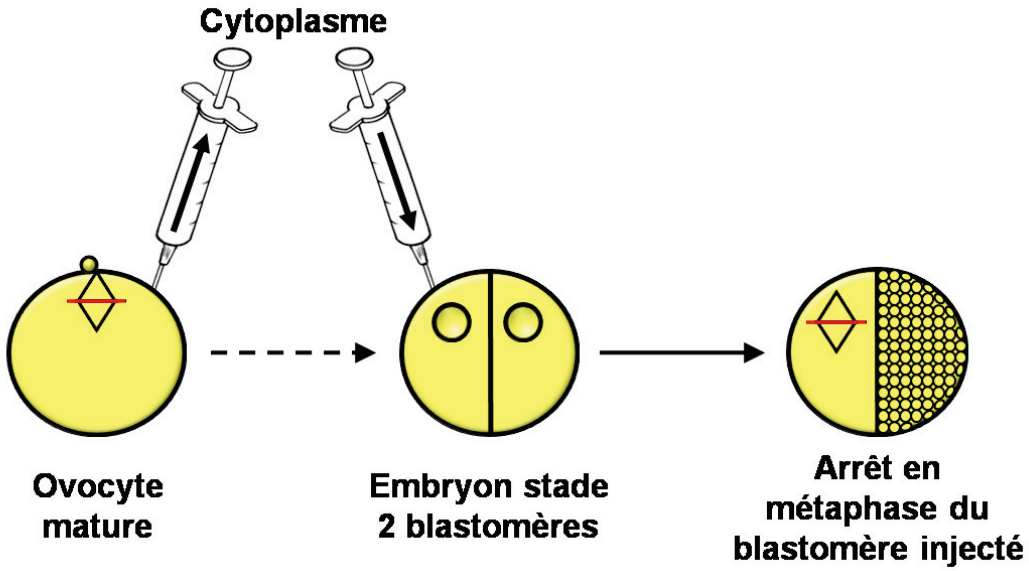


Figure 29 : Mise en évidence de l'activité CSF. La microinjection de cytoplasme issu d'un ovocyte mature dans un des deux blastomères d'un embryon au stade 2 cellules provoque l'arrêt de sa division en métaphase alors que le blastomère non-injecté continue sa division. Cette expérience montre que le cytoplasme de l'ovocyte mature contient un facteur diffusible, le CSF, responsable du blocage en métaphase II (Masui et Markert, 1971).

La nature moléculaire exacte du CSF a longtemps été débattue. Il a été démontré que cette activité ne dépend pas d'un complexe protéique tel que le MPF mais résulte de l'activité et de l'intervention de plusieurs protéines kinases distinctes. Historiquement, les premières expériences de caractérisation du CSF au niveau moléculaire ont montré que le celui-ci dépend de la présence d'ions Mg^{2+}, et qu'il est sensible à toute élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Meyerhof et Masui, 1977). L'activité est en outre indépendante de la synthèse protéique (Murray, 1989). Les travaux de Sagata et collaborateurs (1989a) ont suggéré que l'oncoprotéine p39Mos est un des composants majeurs du CSF. L'arrêt en

métaphase relayé par la cascade MAPK est lié au maintien dans l'ovocyte d'une autre activité kinasique, celle du MPF (Abrieu *et al.*, 1996 ; Gross *et al.*, 2000). Récemment, il a été demontré que l'activité CSF dépend d'une protéine nommée XErp1/Emi2 (Schmidt *et al.*, 2006 ; Wu et Kornbluth, 2008).

6.3.5.1. Implication de la voie MAPK dans l'activité CSF

Lorsqu'un des membres de la voie MAPK, p39Mos (Sagata *et al.*, 1989a), MEK1 (Kosako *et al.*, 1994a), les MAPK (Haccard *et al.*, 1993) ou p90Rsk (Gross *et al.*, 1999), est injecté dans un des blastomères d'un embryon au stade deux cellules, il bloque la division du blastomère injecté. Ces résultats démontrent que la voie p39Mos-MEK1-MAPK activatrice de p90Rsk est une composante majeure du CSF. Le même résultat est obtenu en injectant un ARNm codant une forme constitutivement active de MEK1 (Sagata, 1995).

L'activité cytostatique de p39Mos est également inhibée par des anticorps anti-MEK1 (Kosako *et al.*, 1994a). La phosphatase MKP1 ou l'immunosuppression de p90Rsk provoquent quant à eux l'arrêt métaphasique d'extraits d'œufs de Xénope (Minshull *et al.*, 1994 ; Bhatt et Ferrell, 1999). Enfin, l'utilisation d'une stratégie antisens a montré que l'absence de p39Mos entraîne l'activation périodique du MPF *in vivo*, sans arrêt de la cellule en métaphase II (Dupre *et al.*, 2002a). Néanmoins, la présence de p39Mos et l'activation des MAPK existent en métaphase I sans toutefois bloquer la cellule en phase M. L'activité CSF doit donc dépendre, en plus des MAPK, d'un autre facteur présent uniquement en seconde division de méiose et exerçant une action inhibitrice sur la dégradation des Cyclines. Il a été proposé que cette proteine soit XErp1/Emi2, qui ne s'accumule qu'au cours de la seconde division de méiose (Wu et Kornbluth, 2008).

6.3.5.2. La voie MAPK stabilise l'activité MPF en inhibant la dégradation des Cyclines

Dans les ovocytes matures, la dégradation de la Cycline B est fortement inhibée (Murray, 1989). La protéine p39Mos serait impliquée dans l'arrêt métaphasique en maintenant l'activité MPF au travers l'inhibition de la dégradation des Cyclines. L'inhibition de la protéolyse de la Cycline B par la voie MAPK serait principalement relayée par l'activation d'un inhibiteur de l'APC/c-Cdc20 (Vorlaufer et Peters, 1998). Cependant, les MAPK ne semblent pas inactiver la voie de dégradation des Cyclines mais plutôt prévenir la cette dégradation en maintenant le MPF actif (Abrieu *et al.*, 1996 ; Abrieu *et al.*, 2001).

6.3.5.3. MAPK, calcium et activité cytostatique

Il est admis que la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte augmente la concentration calcique intracellulaire et active la CaMKII et la calcineurine. Ce phénomène serait responsable d'une levée de blocage métaphasique entraînant la dégradation complète et rapide des Cyclines et la séparation des chromatides sœurs (Lorca *et al.*, 1991 ; Lorca *et al.*, 1993 ; Morin *et al.*, 1994 ; Mochida et Hunt, 2007). La protéolyse de p39Mos et la

déphosphorylation des MAPK ont lieu 30 à 40 minutes après la fécondation (Ferrell *et al.*, 1991 ; Posada *et al.*, 1991 ; Watanabe *et al.*, 1991 ; Hartley *et al.*, 1994 ; Roy *et al.*, 1996). Par ailleurs, suite à la fécondation et à l'entrée de calcium dans la cellule, l'activation d'une protéine tyrosine-phosphatase semble requise (Bodart *et al.*, 1999). L'identité de cette dernière reste cependant à determiner.

6.3.5.4. Rôle de XErp1/Emi2 dans l'activité du CSF

En recrutant Plx1 (Liu et Maller, 2005 ; Rauh *et al.*, 2005), CaMKII déclencherait la dégradation de XErp1/Emi2, un inhibiteur de l'APC/c-Cdc20. XErp1/Emi2 appartient à la famille des Emi/Erp (*Xenopus Emi related protein 1/Early mitoitc inhibitor 2*) qui comprend deux membres : Emi1 et Emi2. La phosphorylation de XErp1 par Plx1 provoque son ubiquitinylation par le SCF/βTRCP et sa dégradation (Reimann *et al.*, 2001 ; Schmidt *et al.*, 2005). La dégradation de XErp1 conduit finalement à la levée d'inhibition d'APC/c et rompt l'équilibre entre l'activation du MPF et celle de la voie p39Mos-MEK1-MAPK **(Figure 30)**.

Une mutation de la sérine 194 et de la thréonine 195 de XErp1 la rend insensible au signal induit par l'augmentation de calcium. Par ailleurs, la kinase p90Rsk phosphoryle XErp1/Emi2 directement sur les résidus sérine 335 et thréonine 336 (Inoue *et al.*, 2007), et sur les résidus sérine 342 et sérine 344 (Nishiyama *et al.*, 2007). Ces modifications post-traductionnelles augmenteraient la stabilité et l'activité de XErp1/Emi2. Cette augmentation d'activité et de stabilité serait également sous la dépendance de son association à PP2A et de la déphosphorylation subséquente de deux sites cibles de Cdc2 (Wu *et al.*, 2007a ; Wu *et al.*, 2007b). *In fine*, XErp1 apparaît comme une protéine pivot du CSF, dont l'activité et la stabilité dépendent de la cascade p39Mos-MEK1-MAPK et de l'activation de p90Rsk.

6.3.6. Rôle des MAPK dans l'apoptose

Les MAPK/JNK1 et 2 sont impliquées dans l'apoptose déclenchée par les UV dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Tournier *et al.*, 2000). JNK3 est responsable de la mort cellulaire des neurones de l'hippocampe de souris soumis à l'excitoxine (Yang *et al.*, 1997). En revanche, dans des cellules souches embryonnaires de souris, JNK inhibe l'apoptose (Yujiri *et al.*, 1998). Certains ovocytes subissent une lyse lors de leur conservation en culture. Dans ces ovocytes apparaît une activité JNK basale absente des ovocytes 'sains'. Bien qu'à ce jour aucun rôle des MAPK de type Erk n'ait été rapporté dans les mécanismes d'apoptose, l'activité des JNK pourrait être impliquée dans la mort cellulaire des ovocytes (Bagowski *et al.*, 2001a).

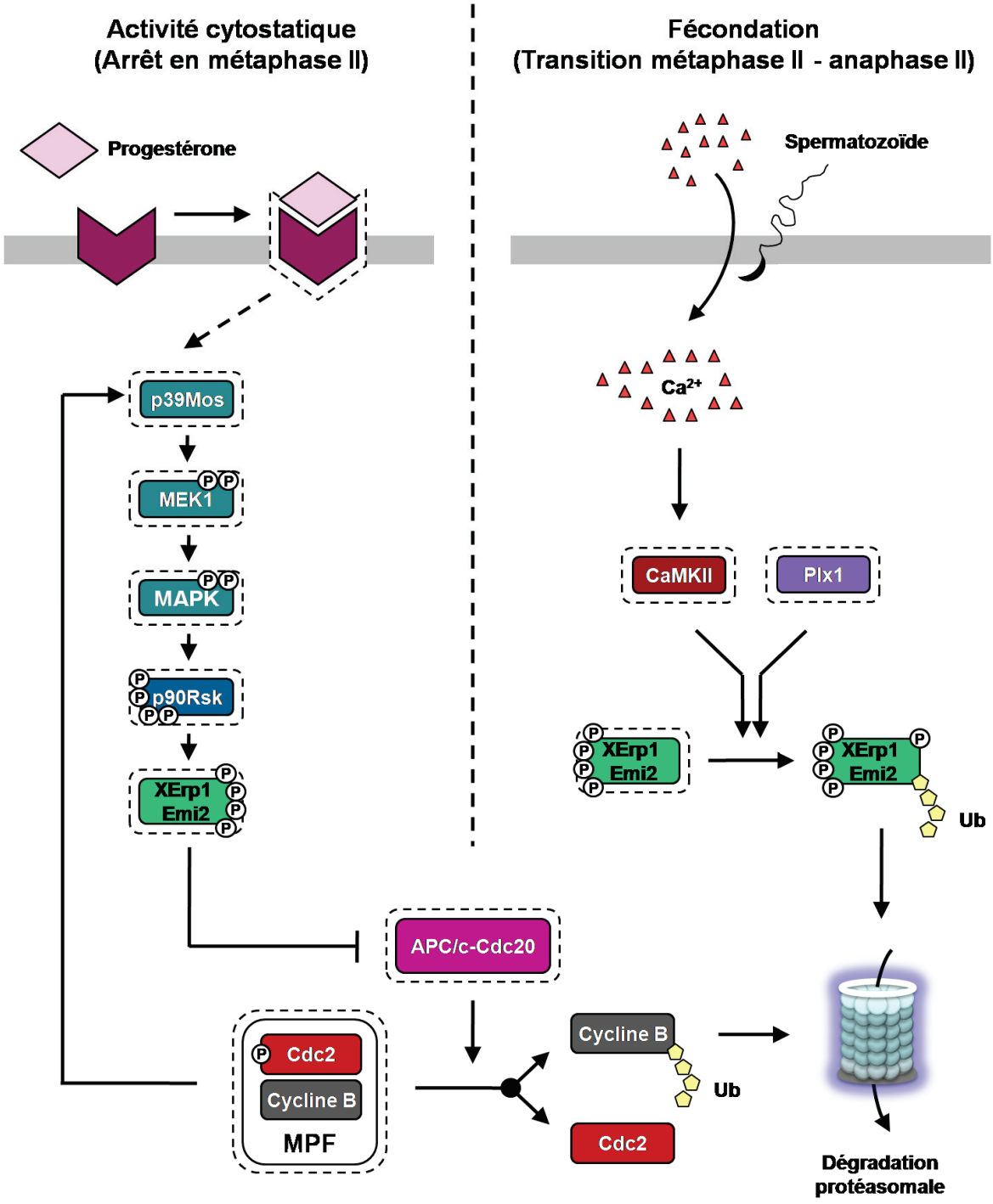


Figure 30 : Régulation de l'activité cytostatique par XErp1/Emi2 dans les ovocytes de Batraciens. Dans les ovocytes matures bloqués en métaphase II, la phosphorylation de XErp1 par p90Rsk stabilise la protéine qui peut alors exercer son activité inhibitrice de l'APC/c et maintenir l'activité du MPF. Suivant la fécondation, l'augmentation du calcium intracellulaire active la CaMKII. La phosphorylation de XErp1 par la CaMKII permet sa phosphorylation par Plx1. XErp1 est alors ubiquitinylée puis dégradée, l'APC/c n'est plus inhibé et la Cycline B est dégradée. La chute de l'activité du MPF permet finalement la levée du blocage métaphasique.

PARTIE IV : DYNAMIQUE D'ACTIVATION DES MAPK LORS DE LA TRANSITION G2/M DES OVOCYTES DE XÉNOPE

L'avènement des nouvelles techniques de criblage à haut débit en biologie s'est accompagné d'un changement de paradigme dans la compréhension du concept des systèmes biologiques. Certains experts de la biologie systémique estiment que les réponses aux principales questions biologiques ne peuvent pas être résolues par la connaissance de tous les détails moléculaires, mais plutôt par la meilleure compréhension des actions concertées de ces molécules au sein du réseau d'interactions dynamiques qu'elles constituent dans la cellule (Barabasi et Oltvai, 2004 ; Yook *et al.*, 2004 ; Papin *et al.*, 2005). La complexité du système ovocytaire réside dans le fait que la transition d'état (inactif/actif) des principaux effecteurs de la reprise méiotique implique simultanément de nombreux régulateurs par l'intermédiaire de plusieurs voies parallèles bien qu'interconnectées.

1. Interconnections et motifs de régulation des voies p39Mos-MEK1-MAPK et Plx1-Cdc25C-MPF

Il a été préalablement rapporté qu'une stimulation des ovocytes par la progestérone provoque d'une part l'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et, d'autre part, l'activation de la voie Plx1-Cdc25C-MPF *via* la synthèse respective de p39Mos et de Ringo **(Figure 25)**. Si l'on considère ces deux cascades de signalisation comme appartenant à un réseau d'interactions, il est possible de distinguer de nombreux motifs de régulation intra-cascades et inter-cascades. Définir ces interactions et ces motifs de régulation constitue la première étape dans l'étude de la dynamique d'activation des MAPK lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. Bien que ces motifs de régulation aient été évoqués isolément dans cette introduction, un récapitulatif est proposé ci-après.

1.1. Motifs de régulation intra-cascades

1.1.1. Régulations au sein de la voie Plx1-Cdc25C-MPF

Les expériences de transferts de cytoplasme en série ont souligné la propriété d'autoamplification du MPF (Masui et Markert, 1971). Cette dernière amplification est rendue possible par la présence de plusieurs boucles de rétrocontrôle positif exercé par le MPF sur ses activateurs en amont **(Figure 31)** :

- *Boucle de rétrocontrôle positif du MPF via Cdc25 : In vitro*, le MPF phosphoryle et active Cdc25C sur au moins 5 résidus d'acides aminés : les thréonines 48, 67 et 138 et les sérines 205 et 285. La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'autoamplification du MPF (Izumi et Maller, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994).

- *Boucles de rétrocontrôles positifs du MPF sur la synthèse des Cyclines :* Le MPF contrôle la synthèse protéique en provoquant la dégradation de la CPEB (Reverte *et al.*, 2001 ; Thom *et al.*, 2003). Au cours de la maturation ovocytaire, cette étape est impliquée dans la synthèse de Cyclines B2 et B5, puis B1 et B4. Elle permet l'accumulation de complexes MPF actifs.

- *Boucles de rétrocontrôles positifs du MPF via Plx1 et Myt1 :* Le MPF est capable de phosphoryler Plx1 *in vitro* et d'inhiber Myt1 (Booher *et al.*, 1997 ; Qian *et al.*, 1998b ; Patra *et al.*, 1999). *In vivo*, Cdc2 phosphoryle également la Cycline B2 sur son résidu sérine 90 (Gautier *et al.*, 1990 ; Izumi et Maller, 1991). Cette dernière phosphorylation serait nécessaire pour assurer l'activité du complexe Cdc2/Cycline B2 (Yoshitome *et al.*, 1998). La phosphorylation de ces protéines constitue un élément notable du rétrocontrôle positif mais il est généralement admis que la phosphorylation de Cdc25 constitue l'élément moteur principal de l'autoamplification du MPF, indépendamment de la synthèse protéique.

1.1.2. Régulations au sein de la voie p39Mos-MEK1-MAPK

Trois motifs de régulation positive ont été identifiés au sein de la voie p39Mos-MEK1-MAPK **(Figure 31)** :

- *Boucle de rétrocontrôle positif exercé par p39Mos et MAPK sur la stabilisation et l'activité de p39Mos :* La phosphorylation de p39Mos régule son activité et sa stabilité. Les résidus sérine 3 et 16 de p39Mos sont tous les deux phosphorylés par les MAPK lors de la reprise méiotique. La protéine p39Mos serait également capable de s'autophosphoryler sur la sérine 3, principal résidu impliqué dans la stabilisation de la protéine.

- *Boucle de rétrocontrôle positif exercé par MEK1 sur JNK :* En 2005, Adler et collaborateurs observent *in vitro* que la protéine MEK1 active phosphoryle JNK qui, en retour, phosphoryle la MAP3K/Raf (Adler *et al.*, 2005). L'implication de cette boucle de rétrocontrôle positif dans la dynamique d'activation des MAPK reste à démontrer dans l'ovocyte.

- *Boucle de pro-action :* Une boucle de pro-action *(ou pro-boucle, ou feed-forward loop)* est un motif de régulation au sein duquel un activateur module une réponse au travers de deux voies parallèles. Si p39Mos active directement MEK-MAPK *in ovo*, il a été démontré lors de la reprise méiotique des ovocytes de souris, qu'une activité MEK-phosphatase serait inhibée par le bais de la MAP3K/p39Mos (Verlhac *et al.*, 2000). À ce jour, aucun motif de régulation de ce type n'a été décrit au niveau post-traductionnel chez le Xénope.

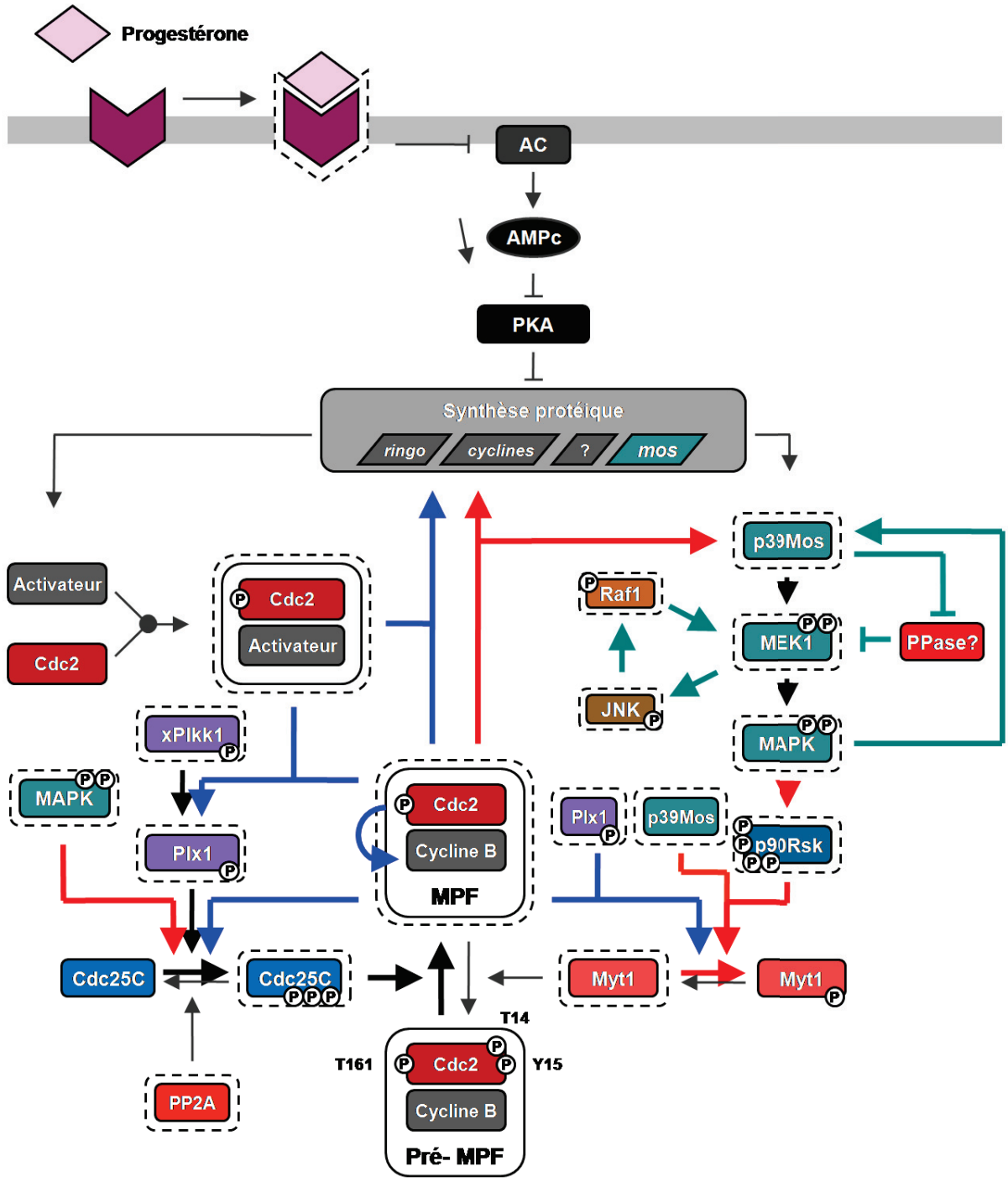


Figure 31 : Motifs de régulation des voies Plx1-Cdc25c-MPF et p39Mos-MEK1-MAPK. Les nombreux motifs de régulation positive rendent le réseau d'interactions plus robuste aux contraintes. Flèches noires : voies 'classiques' p39Mos-MEK1-MAPK et Plx1-Cdc25C-MPF ; Flèches vertes : régulations au sein de la voie p39Mos-MEK1-MAPK ; Flèches bleues : régulations au sein de la voie Plx1-Cdc25C-MPF ; Flèches rouges : interconnections entre les deux voies (cross-talk).

1.2. Interconnections

1.2.1. Rétrocontrôle positif : renforcement de la voie Plx1-Cdc25C-MPF par la voie p39Mos-MEK1-MAPK

Suite à une stimulation des ovocytes par la progestérone, les MAPK participent à l'activation du MPF en inhibant Myt1 et en activant Cdc25C **(Figure 31)**.

Myt1 : Lorsqu'elle est active, p90Rsk s'associe à la kinase inhibitrice Myt1. Le complexe a été immunoprécipité *in ovo* et il a été démontré que p90Rsk phosphoryle et inactive Myt1 *in vitro* (Palmer *et al.*, 1998). La MAPKAPK/p90Rsk participe donc à l'activation du MPF en inhibant Myt1. Par ailleurs, p39Mos est également capable d'interagir avec Myt1 *in vitro* et de la phosphoryler *in vivo* de manière à faciliter la conversion du pré-MPF en MPF, même en absence d'activité MAPK (Peter *et al.*, 2002). Cependant, l'inhibition de p39Mos et indirectement de p90Rsk par la Geldanamycine n'empêche pas totalement la phosphorylation de Myt1, ce qui suggére une régulation plus complexe de la kinase par une autre voie que celle décrite ci-avant (Fisher *et al.*, 1999b).

Cdc25C : Les MAPK phosphorylent les résidus thréonines 48 et 138 et la sérine 205 de Cdc25C de manière à favoriser son activité (Wang *et al.*, 2007).

1.2.2. Rétrocontrôle positif : renforcement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK par la voie Plx1-Cdc25C-MPF

Les expériences d'injection de cytoplasme d'ovocytes matures dans des ovocytes immatures conduit à l'activation de la cascade p39Mos-MEK1-MAPK indépendamment de toute stimulation hormonale (Masui et Markert, 1971). Ce résultat suggère qu'il existe une connexion entre le MPF actif injecté et l'activation des MAPK. En effet, le MPF phosphoryle CPEB et régule positivement la machinerie de polyadénylation et de synthèse protéique. Par ce biais, il débloque la synthèse de p39Mos puis stabilise la protéine en la phosphorylant sur la sérine 3 (Paris *et al.*, 1991 ; Castro *et al.*, 2001a ; Castro *et al.*, 2001b ; Hochegger *et al.*, 2001) **(Figure 31)**.

1.3. Propriétés d'activation des MAPK lors de la reprise méiotique

Si, de prime abord, la machinerie de signalisation s'apparente à un ensemble discret de voies linéaires, il apparaît que ces cascades, ou plus précisément ce réseau complexe d'interactions, est parcouru de motifs de régulation qui conditionnent la dynamique d'activation des MAPK et la réponse cellulaire qui en découle. Ainsi, lors de la reprise méiotique stimulée par la progestérone, l'architecture du réseau de régulation confère aux MAPK leurs propriétés d'activation dans l'ovocyte de Xénope, à savoir l'ultrasensibilité, la bistabilité, l'irreversibilité, la robustesse et le caractère tout-ou-rien de cette réponse.

1.3.1. Ultrasensibilité et coopérativité

L'ultrasensibilité se définit comme la propriété d'un système qui montre une courbe dose-réponse de type sigmoïde : les faibles niveaux de stimulation génèrent de faibles réponses tandis que des niveaux élevés génèrent des réponses abruptes. Le terme 'ultrasensibilité' a également été proposé par Goldbeter et Koshland (1981) pour décrire une courbe de réponse à un stimulus qui est plus abrupte que la courbe hyperbolique produite pour la cinétique d'une enzyme de type Michaelis-Menten. La propriété ultrasensible d'un système peut être estimée par mesure du coefficient de Hill. Ce dernier coefficient, noté n ou nH, définie le degré de non-linéarité d'une courbe expérimentale de type dose-réponse et détermine donc la sensibilité d'une cible vis-à-vis d'un effecteur ou d'un stimulus.

1.3.1.1. Coopérativité et coefficient de Hill

En cinétique enzymatique, la mesure du degré de coopérativité est réalisée au moyen d'une fonction empirique proposée par Archibald Hill qui porte son nom (Hill, 1910). Cette fonction a été utilisée pour décrire la liaison et la coopérativité entre l'oxygène et l'hémoglobine. Elle est de la forme suivante : $v = Vmax . [S]^n / (K^n_{0,5} + [S]^n)$; où v et Vmax sont respectivement la vitesse et la vitesse limite de la réaction enzymatique ; [S] est la concentration de substrat ; $K^n_{0,5}$ est la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction vaut la moitié de Vmax ; et n (ou nH) correspond au coefficient de Hill. On remarque une similitude entre cette équation de Hill et l'équation proposée par Michaelis-Menten : $v = Vmax . [S] / (K_M + [S])$; où v et Vmax sont respectivement la vitesse et la vitesse limite de la réaction enzymatique ; [S] est la concentration en substrat ; K_M est la constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. Cette dernière constante se défnit par la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale. En absence de coopérativité ($n = 1$), ces équations sont équivalentes.

Le degré de coopérativité peut être estimé pour des molécules qui ne sont pas en interaction directe et ainsi rendre compte de l'activation d'une voie dans son ensemble (Goldbeter et Koshland, 1981 ; Ferrell et Machleder, 1998). Le degré de coopérativité est indiqué par le coefficient de Hill qui peut être extrait mathématiquement ou estimé par des mesures expérimentales. Lorsque $n < 1$, la coopérativité est négative. Lorsque $n > 1$, la coopérativité est positive et la courbe dose-réponse tend vers un profil sigmoïde. Dans le cas $n = 1$, la coopérativité est nulle et le profil de la courbe dose-réponse produit par une enzyme de type Michaelis-Menten est une hyperbole **(Figure 32)**. Plus la valeur de n augmente, plus la courbe formera un pallier correspondant à la transition d'état inactif vers l'état actif de l'enzyme. Goldbeter et Koshland (1981) ont qualifié ce type de réponse par le terme « ultrasensibilité ». La particularité d'une enzyme au comportement ultrasensible est d'être moins sensible aux faibles valeurs de stimuli qu'une enzyme dont la réponse est de type Michaelis-Menten. De ce fait, une enzyme dont la courbe dose-réponse indique un coefficient de Hill élevé produira une réponse élevée uniquement lorsque le stimulus est supérieur à une valeur seuil. Quand la valeur du stimulus est inférieure à cette valeur, la réponse est très faible, voire nulle.

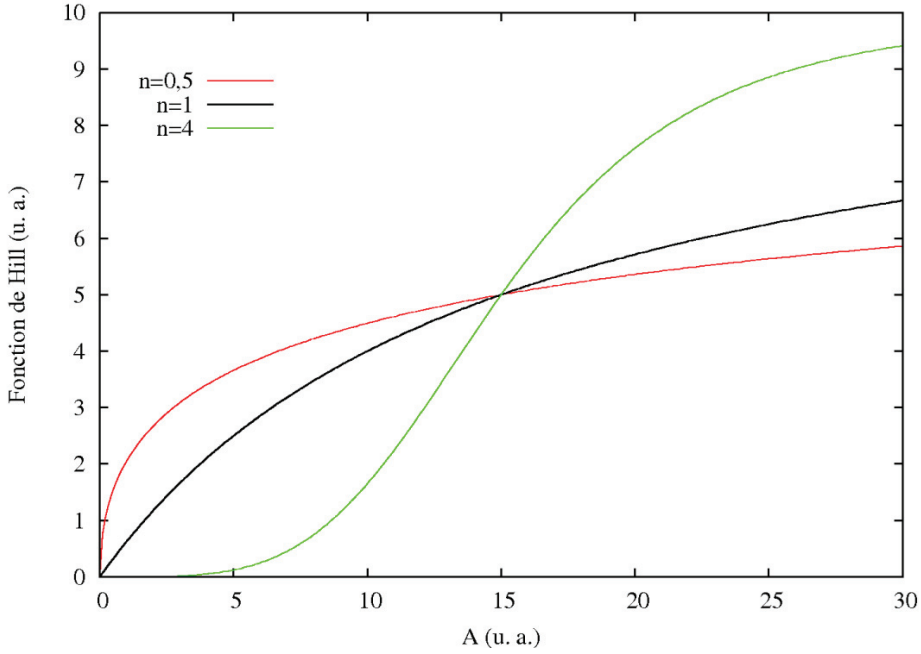


Figure 32 : Influence du coefficient de Hill sur la courbe dose-réponse. Illustration de l'influence de la valeur de n (ou nH) sur le profil de la fonction de Hill. Cet exemple arbitraire est donné en considérant les valeurs suivantes : V = 10 µmol/min ; $K^n_{0,5}$ = 15 mol/l ; n = 0,5 ou 1 ou 4 ; A, une concentration arbitraire (Schéma de Christophe Russo, Thèse 2009).

1.3.1.2. Ultrasensibilité de la voie p39Mos-MEK1-MAPK

La voie de signalisation p39Mos-MEK1-MAPK agit sous la forme d'une cascade déclenchée par un ou plusieurs stimuli. Elle a pour rôle de transmettre et d'amplifier un signal extérieur à la cellule vers des cibles cytoplasmiques ou nucléaires. La sensibilité de réponse et la dynamique de transduction du signal dépendent de la structure en cascade des divers composants de la voie, ainsi que des cinétiques de phosphorylation et de déphosphorylation de chaque kinase du réseau. L'analyse de la cascade par Huang et Ferrell (1996) se concentre sur les courbes dose-réponse obtenues pour l'activité de p39Mos, MEK1 et MAPK. Bien qu'il n'y ait pas de coopérativité entre les enzymes de la cascade, ils ont quantifié le degré de non-linéarité de leurs graphes au moyen d'une fonction de Hill décrite par : $y = x^n / (K + x^n)$; où y représente le niveau d'activité des kinases ; x représente la concentration du stimulus ; K une constante et n (ou nH) le coefficient de Hill. Dans les ovocytes, à partir de la résolution numérique de leur modèle, la phosphorylation des MAPK en réponse à un stimulus suit un profil sigmoïdal équivalent à celui observé pour une enzyme coopérative avec un coefficient de Hill égal à 4,9. Ce dernier est très supérieur à celui qui lie l'hémoglobine à l'oxygène estimé à 2,8 (Stryer, 1988). Par conséquent, en absence de coopérativité, il est possible d'obtenir une réponse de type ultrasensible.

L'ultrasensibilité des MAPK en réponse à la progestérone proviendrait :

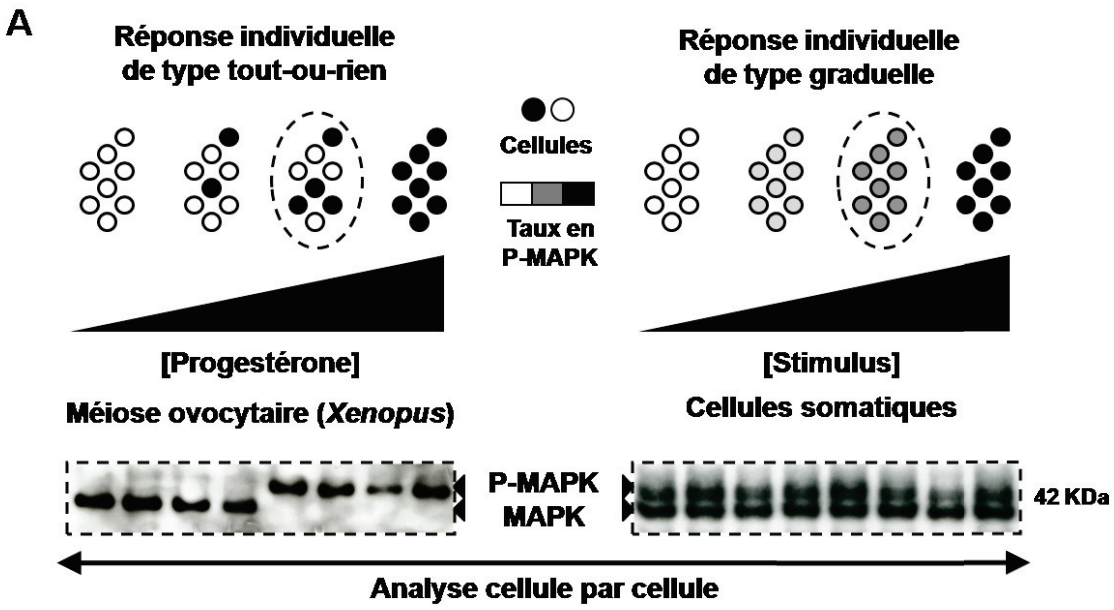
- De la structure en cascade des activateurs des MAPK (Ferrell et Bhatt, 1997). le coefficient de Hill associé à chaque kinase de la cascade augmente au fur et à mesure que la kinase est située en aval de la voie. La voie est donc peu sensible aux faibles stimulations car elle filtre les stimuli qui sont inférieurs à une valeur seuil. L'augmentation d'activité des MAPK ne se déroule que lorsque le stimulus, telle que la concentration en progestérone, dépasse une valeur seuil.

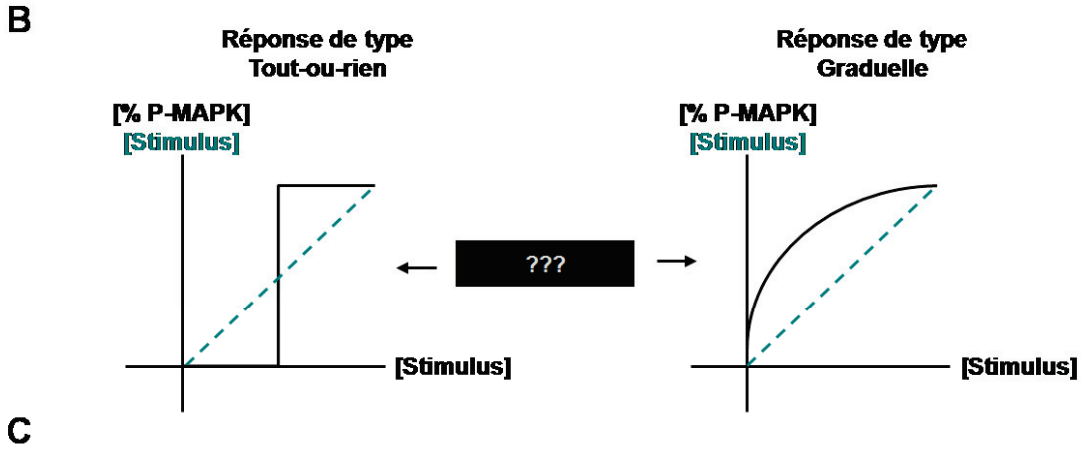
- De la nécessité de phosphoryler deux sites pour activer les MAPK (Ferrell, 1996 ; Ferrell et Bhatt, 1997). Les kinases MEK1 et MAPK ne sont actives que lorsqu'elles sont phosphorylées sur deux sites (MEK1 : sérines 218 et 222 ; MAPK : thréonine 183 et tyrosine 185). Ces phosphorylations ne seraient pas réalisées simultanément sur les deux sites mais se dérouleraient en deux étapes. Ce processus en deux temps contribuerait à l'augmentation du coefficient de Hill. Bien que cette idée ait été récemment contestée (Thomson et Gunawardena, 2009), il est généralement admis que l'augmentation du nombre de sites de phosphorylation crée une réponse proportionnellement plus sensible (*i.e.* 6 sites de phosphorylation pour Sic1, un inhibiteur de Cdk, pour coefficient de Hill = 6 (Nash *et al.*, 2001)).

Des aspects spatiaux et temporels peuvent également jouer un rôle crucial dans la sensibilité de la voie MAPK et de la propagation du signal (Kholodenko, 2006). La sensibilité de la cascade n'est pas la même à la membrane plasmique, au niveau de l'appareil de Golgi ou des endosomes. Par ailleurs, l'existence de deux boucles rapides (autoamplification du MPF) et d'une lente (activation de la cascade MAPK) au sein du réseau de régulation de la reprise méiotique entraînerait une réponse cellulaire de type tout-ou-rien (Brandman *et al.*, 2005).

1.3.2. Bistabilité et réponse tout-ou-rien des MAPK

La bistabilité se caractérise par la coexistence de deux états stables, séparés par un état intermédiaire instable. À l'image d'une balance, deux états stables alternatifs existent mais la forme intermédiaire n'est que très rarement, voire jamais observée. En 1998, Ferrell et Machleder étudient la phosphorylation des MAPK, non plus en population d'ovocytes de Xénope mais en cellules uniques (Ferrell et Machleder, 1998). Des lots d'ovocytes sont successivement stimulés par la progestérone selon un gradient linéaire croissant de concentration. Les taux en MAPK actives sont ensuite estimés cellule par cellule. Ferrell et Machleder remarquent que l'activation des MAPK n'est pas linéaire en réponse à la progestérone mais prend deux valeurs distinctes : soit les MAPK sont inactives, soit elles sont actives. La transition entre ces deux états apparaît alors brutale. Le résultat est identique lorsque la cascade p39Mos-MEK1-MAPK est activée par l'injection d'une protéine de synthèse malE-Mos (Escherichia coli maltose-binding c-Mos protein kinase) (Nebreda et Hunt, 1993).





C

Stimulus	Progestérone	MalE-Mos	MalE-Mos + CHX
Synthèse protéique	Oui	Oui	Non
p39Mos	Oui	Oui	Oui
MPF	Actif	Actif	Inactif
Rétrocontrôle(s)	Double	Double	Aucun
Réponse MAPK	Tout -ou-rien	Tout-ou-rien	Graduelle
Coefficient de Hill	42 (1)	35 (5)	3 (2,3)

Figure 33 : La réponse bistable des MAPK s'oppose à la réponse de type graduel. (A) En western blot, dans le cas d'une réponse bistable, les deux formes de MAPK (phosphorylées ou non) ne sont jamais retrouvées dans une même cellule. **(B)** En réponse à une variation linéaire du stimulus (courbe verte), l'activation des MAPK (courbe noire) ressemble respectivement à une sigmoïde (réponse bistable) ou une hyperbole (réponse graduelle). Les mécanismes de régulation responsables de ces comportements sont à identifier. **(C)** La structure du réseau modifie le type et la sensibilité de réponse des MAPK. Les rétrocontrôles exercés par le MPF et les MAPK sur la synthèse de p39Mos ont été considérés. Le coefficient de Hill a été estimé par une analyse en cellule unique, ou en population cellulaire (parenthèses). Adapté d'après Ferrell et Machleder (1998).

Dans l'ovocyte de Xénope, la cascade MAPK répond aux stimuli suivant une courbe sigmoïde (nH très supérieur à 1 ; **Figure 32**), selon un mode binaire où le taux en MAPK actives et stables dans le temps est soit faible, soit élevé. Cette réponse de type tout-ou-rien caractérise ce que l'on nomme la bistabilité de la cascade. Ce type de réponse s'oppose à une réponse graduelle des MAPK observée par les mêmes auteurs lorsque la GVBD est stimulée en absence de synthèse protéique **(Figure 33)**. Cette perte de bistabilité a été attribuée à la perte du rétrocontrôle positif exercé sur la synthèse protéique.

Une réponse de type bistable a également été observée pour les JNK (Bagowski et Ferrell, 2001 ; Ferrell, 2002). La phosphorylation de JNK étant dépendante de MEK *via* la boucle de rétrocontrôle identifiée par Adler et collaborateurs (2005), la réponse binaire des JNK trouve sa justification dans la bistabilité des MAPK et les interconnections entre les voies **(Figure 31)**.

1.3.3. Irréversibilité de réponse des MAPK

Lorsque la valeur de concentration en stimulus (soit en progestérone, soit en malE-Mos) est supérieure à une valeur seuil, la cascade génère une accumulation abrupte en MAPK actives et entraine la maturation ovocytaire. Ainsi les stimuli inférieurs à cette valeur seuil sont filtrés et n'induisent pas la reprise méiotique. Toujours à l'image d'une balance, cette valeur seuil équivaut à la valeur de concentration en stimulus correspondant à un point d'équilibre instable de la cascade. Dans ce cas, la concentration en MAPK actives bascule soit vers l'état stable bas (la réponse génère un faible taux en MAPK actives), soit vers l'état stable haut (la réponse génère un fort taux en MAPK actives). On remarque que la bistabilité qui caractérise l'activation des MAPK induit la bistabilité de p39Mos *via* l'action de la boucle de rétrocontrôle. Par ailleurs, la transition activatrice des MAPK peut être soit réversible, soit irréversible. Dans le cas réversible, la cascade qui se trouve dans un état stable haut peut se retrouver dans un état bas lorsque le stimulus décroît en intensité. Dans le cas d'une transition irréversible, la cascade n'est plus sous influence du stimulus et reste de manière irréversible dans son état haut.

En 2003, Xiong et Ferrell ont analysé le lien entre une stimulation transitoire de l'ovocyte par la progestérone et le caractère irréversible de la transition d'état de la cascade p39Mos-MEK1-MAPK, couplée à la cascade Plx1-Cdc25C-MPF (Xiong et Ferrell, 2003). En effet, la cascade p39Mos-MEK1-MAPK tient un rôle dans la stabilisation du MPF. De plus, ce complexe est responsable de la stabilisation de p39Mos, et donc du maintien de l'activité des MAPK. Après avoir exposé les ovocytes à la progestérone (600 nM) pendant 5 heures, ces derniers sont rincés pendant 10 heures pour éliminer toute trace de l'hormone, puis de nouveau stimulés par des concentrations variables de progestérone (de 0 à 600 nM). Durant ces deux étapes de stimulation, les concentrations en MEK1 et MAPK actives sont mesurées, ainsi que la phosphorylation de l'Histone H1 (marqueur de l'activité du MPF). Les résultats indiquent que ces valeurs augmentent durant la phase d'induction de la maturation, puis restent élevées en absence de stimulation par la progestérone au cours de la

phase dite de maintien. Xiong et Ferrell suggèrent qu'en absence de stimulus, la boucle de rétrocontrôle stabilise la réponse de la cascade et maintient son activité de manière irréversible.

1.3.4. Robustesse et redondance du réseau p39Mos-MEK1-MAPK

La robustesse est l'attribut des systèmes complexes où coexistent des réseaux de régulation. Confronté à des perturbations, un système est considéré robuste lorsqu'il continue à fonctionner.

L'existence de comportements robustes a été rapportée dans une grande variété de réseaux biochimiques : voie métabolique, signalisation inter-cellulaire (Freeman, 2000), chemotaxie (Kollmann *et al.*, 2005) et cycle cellulaire (Borisuk et Tyson, 1998). Cette capacité à répondre à un stimulus en dépit d'une perturbation repose sur la redondance entre les mécanismes de régulation. Elle rend complexe l'analyse des réponses cellulaires face à l'extinction d'un seul de ces mécanismes. Illustrant cette notion, les travaux de Haccard et Jessus (2006a ; 2006b) ont souligné la redondance de la voie p39Mos-MEK1-MAPK vis-à-vis de la voie Plx1-Cdc25C-MPF lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. Lorsque la synthèse de p39Mos est inhibée par une stratégie antisens, le MPF reste fonctionnel et la GVBD a lieu. Inversement, lorsque la synthèse des Cyclines est inhibée par une stratégie antisens, p39Mos active les MAPK et la GVBD se produit. En revanche, si les deux voies sont inhibées, aucune GVBD n'est observée. Deux niveaux de redondance ont ainsi pu être observés dans le réseau moléculaire qui régule la reprise méiotique des ovocytes de Batraciens.

Le premier niveau de redondance implique la stimulation de la synthèse protéique débouchant sur l'activation de deux voies parallèles lors de la reprise méiotique : p39Mos-MEK1-MAPK et Plx1-Cdc25C-MPF **(Figures 25 et 31)**. Le réseau moléculaire offre donc deux voies alternatives pour l'activation du MPF et la GVBD (Haccard et Jessus, 2006a, b) :

- p39Mos activerait le MPF par la phosphorylation de Cdc25C (Wang *et al.*, 2007) ou la régulation négative de Myt1 *via* l'activation de p90Rsk (Palmer *et al.*, 1998).
- La formation de nouveaux complexes Cdc2/Cycline B déclencherait l'activation directe ou non (*via* Plx1) de Cdc25C (Hoffmann *et al.*, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994), contrecarrant l'action inhibitrice de Myt1(Karaiskou *et al.*, 2004).

Le deuxième niveau de redondance a été suggéré par les observations des groupes de Duesbery et Nebreda (Duesbery *et al.*, 1998 ; Palmer *et al.*, 1998 ; Chopra *et al.*, 2003 ; Perdiguero *et al.*, 2003). L'inhibition complète de la GVBD induite par le facteur létal de l'anthrax serait dûe à l'extinction simultanée de deux voies MAPK qui convergent vers le MPF :

- Les MAPK activent le MPF par les mécanismes précédemment rapportés, en régulant négativement Myt1, voire en phosphorylant Cdc25C (Palmer *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2007) ;
- p38MAPKγ recrute et phosphoryle Cdc25C (Perdiguero *et al.*, 2003) **(Figure 24)**.

1.4. Dynamique d'activation des MAPK et réponse cellulaire

Si l'injection de p39Mos provoque la reprise méiotique et la GVBD, le caractère tout-ou-rien de l'entrée en phase M des ovocytes de Xénope n'est pas supporté par la bistabilité de la voie MAPK. En effet, la GVBD peut se produire en absence d'activité MAPK (Gross *et al.*, 2000 ; Dupre *et al.*, 2002a ; Baert *et al.*, 2003). Pour autant, la dynamique d'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK semble jouer un rôle primordial dans la mise en place des processus qui caractèrisent la maturation ovocytaire, à savoir la morphogenèse du fuseau de division (Bodart *et al.*, 2005), l'inhibition de la réplication entre les deux divisions de méiose (Furuno *et al.*, 1994 ; Gross *et al.*, 2000), ou encore l'arrêt de la cellule en métaphase II (Sagata *et al.*, 1989a ; Kosako *et al.*, 1994a) **(Figure 34)**.

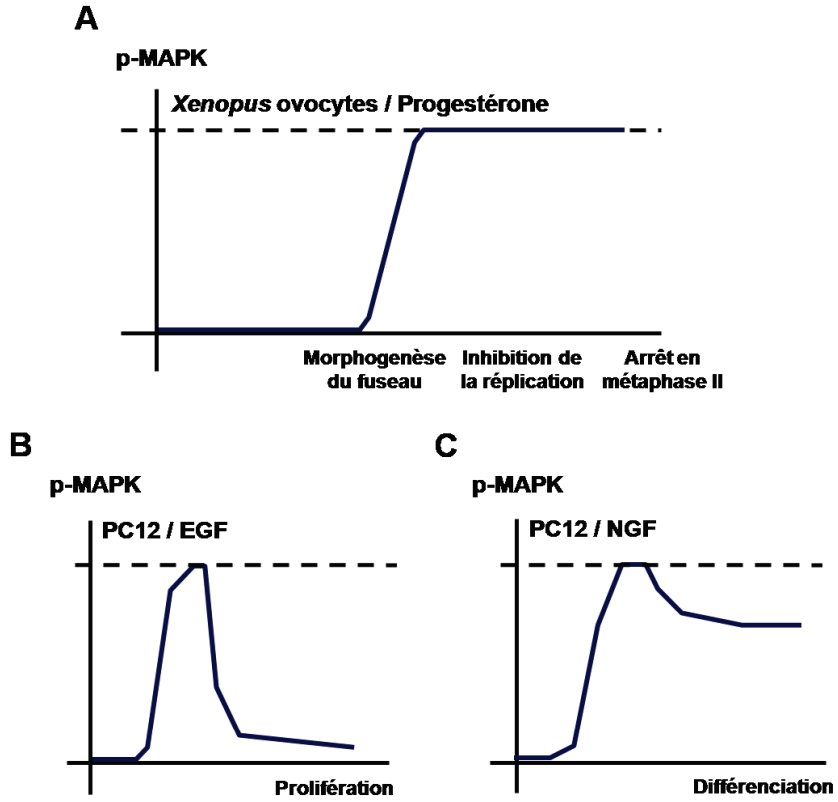


Figure 34 : Rôle de la dynamique d'activation des MAPK dans la réponse cellulaire. Cette dynamique est différente selon les modèles cellulaires ou les stimuli considérés. **(A)** Dans les ovocytes de Xénope incubés dans la progestérone et **(B)** les cellules PC12 stimulées par l'EGF ou **(C)** le NGF.

Dans des cellules somatiques telles que les cellules PC12, les effets cellulaires de l'activation des MAPK dépendent de la configuration des interactions protéiques. Lorsque les cellules PC12 sont stimulées par le facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor), les MAPK présentent un taux d'activation élevé et soutenu, et les cellules se différencient. Par contre, après stimulation des PC12 par l'EGF (Epithelial Growth Factor), la phosphorylation des MAPK est transitoire et les cellules prolifèrent (Santos *et al.*, 2007). Ces deux dynamiques impliquent deux architectures différentes du réseau et dépendent des voies et des motifs de

régulation recrutés par les récepteurs **(Figure 34)**. L'activation des MAPK par l'EGF implique la phosphorylation d'un résidu tyrosine du récepteur à l'EGF et l'activation SOS-dépendante de Ras, suivie de l'activation de la MAP3K/Raf. Le caractère transitoire de la réponse résulte de l'inhibition de SOS par une boucle de rétrocontrôle négatif exercé par les MAPK. Bien qu'après stimulation des cellules par le NGF, l'activation des MAPK implique également Ras, le systême Rap1 permet l'activation soutenue des MAPK *via* la proteine B-Raf (Sasagawa *et al.*, 2005). Ainsi, en fonction du type de stimulation et du contexte cellulaire, la dynamique d'activation des MAPK peut être contrôlée par des boucles de rétrocontrôles positifs et/ou négatifs.

2. Approche modulaire des voies de signalisation

2.1. Généralités sur les notions de modules et de modularité

Sur le plan moléculaire, la transition vers une perspective de réseaux a amené les biologistes à appliquer des concepts utilisés dans le domaine de l'informatique. Parmi ces notions, émerge celle de la modularité au sein d'un réseau. Toute partie constitutive d'un système peut être considérée comme un module. De manière générale, la modularité est la caractéristique d'un système composé de parties plus simples qui confèrent au système son dynamisme, sa flexibilité et son adaptabilité, voire sa robustesse. En biologie, un module peut être conçu comme un ensemble de processus dans un compartiment, qui accomplissent une à plusieurs tâches complexes et/ou intègre un mécanisme. Dans ce contexte, un module n'est pas considéré comme déconnecté mais est interconnecté avec d'autres modules. Dans les cellules, les modules constituent des voies spécifiques, comme des voies de signalisation ou des voies métaboliques. La fonction d'un module est par ailleurs dépendante ou dérive du fonctionnement de ses composants. Néanmoins, la notion de module laisse part à une très libre interprétation qui dépendra du contexte d'étude considéré :

– tissus/organes ;
– cellules ;
– événements cellulaires ou événements de la physiologie cellulaire ;
– voies métaboliques ou de signalisation ;
– réactions biochimiques ;
– protéines, ARNm, gènes.

Les mécanismes qui régulent le cycle cellulaire s'inscrivent dans un contexte particulier. Ils peuvent être considérés comme un système qui effectue des tâches complexes où l'accomplissement d'une tâche est subordonné à la réalisation correcte de la précédente. Ce système effectue ses tâches sous un certain nombre de contraintes. Il est possible de découpler le système du cycle cellulaire en trois modules d'action distincts qui régulent les transitions G1/S, G2/M, ainsi que la transition métaphase/anaphase de sortie de mitose. Le franchissement de ces points de contrôle se déroule sous l'influence d'un réseau de régulateurs qui implique, entre autres, les couples Cdk/Cycline.

2.2. Modularité et cascade MAPK

Parmi les composants des modules d'action du cycle cellulaire, les différentes voies MAPK peuvent être considérées comme des modules qui intègrent un ou plusieurs signaux d'entrée (facteurs de croissance, cytokine, etc…) et promeuvent des réponses cellulaires différentes (prolifération, différenciation, apoptose, inflammation, etc…). Dans ce contexte, cinq modules ou cascades peuvent être discernés **(Tableau 4)**. Au sein de chacune de ces voies, trois composants essentiels sont distingués, une MAP3K, une MAP2K et une MAPK, auxquels est associée la notion de cascade de phosphorylation.

Si l'on considère la voie de signalisation p39Mos-MEK1-MAPK, le dénombrement des composants associés à chaque niveau de la cascade laisse entendre que ces derniers peuvent être considérés comme des modules distincts. En effet, chacun reçoit un stimulus du module (niveau) en amont, réagit en conséquence et finalement transmet un stimulus au module (niveau) en aval. Cette description correspond à l'image simplifiée d'une cascade classiquement employée pour désigner cette voie. Cependant, un module peut traiter plusieurs stimuli simultanément et transmettre des stimuli en réponse. Cela indique que l'étude du comportement de chaque module nécessite de bien identifier ses partenaires et le type d'interaction qui les relie (stimulation ou inhibition). La difficulté de cette approche tient au fait qu'en fonction du contexte cellulaire, des facteurs environnementaux et des conditions expérimentales, les modules changent de partenaires ainsi que de type d'interaction. Corrélée à l'étude d'une réponse cellulaire et physiologique, cette approche modulaire offre une vue plus globale des réseaux de régulation considérés comme complexes. Cette approche nous permet également d'évaluer le rôle des motifs de régulation dans la dynamique d'(in)activation d'un module préalablement défini, et de corréler cette dynamique à la réponse cellulaire qui en découle. Par conséquent, la complexité de cette approche modulaire est fondée sur le choix et la définition d'un module, et sur la variation de la topologie des interactions avec d'autres modules en fonction des stimuli et de l'évolution temporelle.

Les travaux de Frémin et collaborateurs (2007 ; 2009) montrent que différents modules peuvent se distinguer au sein d'une même voie MAPK et coordonner des processus cellulaires distincts. Dans les hépatocytes de souris prélevés par hépatectomie partielle, deux isoformes de MAPK (Erk1 et Erk2) sont activées. Les cultures d'hépatocytes issus de foies de souris sauvages et de souris KO (Knock-out) *erk1*$^{-/-}$ présentent la même cinétique de réplication de l'ADN, minimisant le rôle des MAPK de type Erk1 dans ce processus. Parallèlement, dans ce modèle, l'inhibition sélective de l'expression de Erk2 par siRNA (small interfering RNA) conduit à de graves défauts de réplication, ce qui suggère que la MAPK/Erk2 régule ce processus (Fremin *et al.*, 2007). En 2009, les même auteurs montrent que les hépatocytes stimulés de façon soutenue par l'EGF échouent à enchainer un second cycle cellulaire et restent bloqués en phase G1. L'inhibition transitoire des MAPK par l'U0126 (inhibiteur de MEK) restaure alors la capacité de ces cellules à entrer en réplication. Le blocage des hépatocytes s'expliquent par la synthèse Erk2-dépendante de p21Cip1, un inhibiteur du cycle cellulaire. Par ailleurs, le traitement prolongé de ces cellules par l'U0126 conduit à une diminution de l'apoptose et une survie cellulaire accrue. L'utilisation d'une stratégie siRNA

contre *erk1* a finalement montré que cette survie est imputable à l'inhibition des MAPK de type Erk1 par l'U0126 (Fremin *et al.*, 2009). Ces resulats peuvent être discutés tant sur la dynamique d'activation des MAPK que dans le domaine de la modularité. Dans un premier temps, l'enchainement des cycles cellulaires par les cellules hépatocytaires est garanti par la nature transitoire de l'activation des MAPK puisqu'en sortie de phase S, une activation prolongée d'Erk2 nuit au bon déroulement de ce processus. Dans un second temps, les MAPK de type Erk1 et Erk2 jouent des rôles très différents au cours du cycle cellulaire des hépatocytes. Bien qu'elles soient toutes les deux activées par MEK, les MAPK/Erk2 régulent finement la réplication de l'ADN tandis que les MAPK/Erk1 sont impliquées dans une voie de mort cellulaire. Dans un même modèle cellulaire et une même voie de signalisation stimulée par l'EGF, MEK-Erk1 et MEK-Erk2 consituent donc deux modules distincts. Dans ce contexte, MEK appartient à deux modules différents qui coordonnent des fonctions cellulaires divergeantes. Ci-après nous verrons qu'une même voie de signalisation peut être divisée en plusieurs modules régulant un seul processus.

2.3. Exemple d'approche modulaire impliquant le réseau MAPK dans la morphogenèse du fuseau de division méiotique des ovocytes de Batraciens

La notion de modularité dépend de l'aspect biologique étudié. La voie p39Mos-MEK1-MAPK joue un rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'établissement de l'axe bipolaire du fuseau de division méiotique et peut, dans ce contexte, être considérée comme un module unique et fonctionnel. Ce module peut également être découplé dans la mesure où les protéines p39Mos et p90Rsk jouent des rôles complémentaires dans la morphogenèse du fuseau de division méiotique (Bodart *et al.*, 2005). En effet, si p90Rsk est l'enzyme clef dans l'établissement de l'activité CSF, elle n'est pas suffisante à elle-seule pour promouvoir la formation d'un fuseau en absence de p39Mos. Deux modules fonctionnels exerçant des fonctions différentes dans la morphogenèse du fuseau des ovocytes de Xénope peuvent alors être décris. Le premier est uniquement constitué de la protéine p39Mos et le second de la cascade MEK1-MAPK-p90Rsk **(Figure 35)**. Néanmoins, en dehors de ce cadre d'étude, ces deux modules sont insuffisants pour comprendre la manière dont la voie est régulée, et ainsi rendre compte de la manière dont elle exerce ses fonctions pléiotropes dans un environnement ou un type cellulaire déterminé. En conséquence, en fonction du processus physiologique considéré, la cascade MAPK peut être définie soit comme un module fonctionnel monobloc imbriqué dans un réseau moléculaire plus étendu, soit comme un réseau à part entière ayant des rôles cellulaires pléiotropes basés sur le couplage de différents modules fonctionnels.

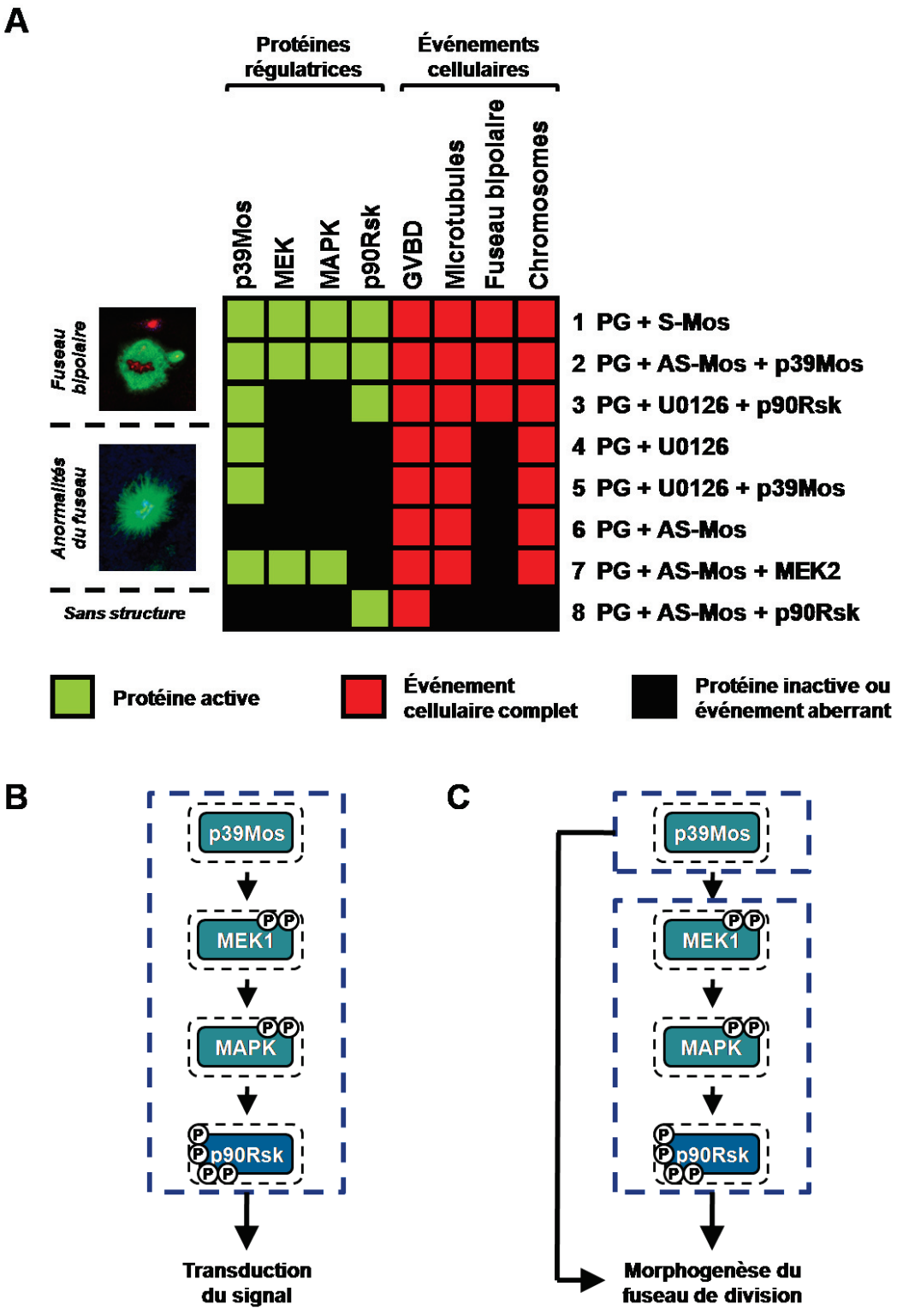


Figure 35 : Approche modulaire de la morphogenèse du fuseau. (A) Résultats de l'inhibition sélective des protéines. Différents événements cellulaires ont été analysés : la reprise méiotique (GVBD), la nucléation des microtubules, la formation d'un fuseau bipolaire de division et la condensation des chromosomes. Des protéines p39Mos, MEK2 ou p90Rsk ont été injectées dans des conditions inhibitrices de la voie. **(B)** La cascade peut être considérée comme un module à part entière (Hartwell *et al.*, 1999). **(C)** p39Mos et p90Rsk sont complémentaires dans la formation du fuseau. Dans ce contexte, la cascade peut être subdivisée en deux modules fonctionnels. **PG**, progestérone ; **S-Mos**, oligonucléotides morpholines sens *mos* ; **AS-Mos**, antisens *mos* ; **U0126** ; inhibiteur de MEK.

OBJECTIFS

Lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope, l'oncoprotéine p39Mos est l'enzyme clef de l'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et de sa cible p90Rsk (Baert *et al.*, 2003). De nombreux motifs de régulation influencent la synthèse de p39Mos et l'activation des MAPK ; ils rendent le réseau robuste vis-à-vis des perturbations. L'objectif principal de cette thèse porte sur le rôle des motifs de régulation dans la mise en place des propriétés physiques d'activation du réseau p39Mos-MEK1-MAPK, à savoir l'ultrasensibilité, la bistabilité, l'irréversibilité et le caractère tout-ou-rien de cette réponse. Deux questions principales ont été abordées :

- **Quels sont les rôles respectifs des rétrocontrôles exercés par les MAPK et le MPF dans la synthèse de p39Mos et l'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK ?**

Une approche mathématique du réseau p39Mos-MEK1-MAPK a été développée. Elle tend à définir le rôle des boucles de rétrocontrôle exercé par le MPF et MAPK dans la régulation des événements précoces d'activation de la cascade lors de l'entrée en phase M des ovocytes de Xénope. Cette stratégie *in silico* est confrontée aux résultats expérimentaux qui montrent que p39Mos est accumulée en absence d'activité MAPK. Nos résultats ajustent le rôle du MPF dans la synthèse de p39Mos et l'activation de la cascade. Ils démontrent également que p90Rsk est dégradée 48 heures après l'entrée en phase M des ovocytes stimulés par la progestérone. Dans ce contexte, l'évolution dans le temps des éléments du réseau est discutée et suggère que notre modèle de prédiction n'est valide que pour une fenêtre de temps limitée.

- **Peut-on recruter efficacement les MAPK en absence de la MAP3K/p39Mos ?**

Des conditions expérimentales ont été recherchées pour activer efficacement les MAPK en absence de p39Mos. Cette approche vise à déterminer le rôle de cette dernière dans l'établissement des propriétés physique du réseau. La 1,10-Phénanthroline monohydrate a été exploité à ces fins. Ce chélateur de zinc permet d'activer les MAPK en absence de p39Mos et selon une réponse graduelle et ultrasensible. Un modèle de pro-action (feed-forward loop) est discuté dans ce contexte.

RÉSULTATS

PARTIE I : MODÉLISATION DU RÉSEAU DE RÉGULATION DE LA VOIE P39MOS-MEK1-MAPK

Une partie de mon travail a contribué à la modélisation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. Un modèle physiquement et biologiquement réaliste a été obtenu en confrontant des données expérimentales et *in silico*. Notre modèle tient compte de l'influence du MPF sur l'accumulation de l'oncoprotéine p39Mos et ajuste le rôle de la boucle de rétrocontrôle positif exercé par MAPK. La validité temporelle de ce modèle a également été évaluée.

1. Modélisation du réseau de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK

Plusieurs articles de référence dans le domaine de la modélisation de la cascade MAPK ont procuré une base théorique pour la description des interactions au sein de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe Nanosystèmes Biologiques de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire. L'importance du choix du type de cinétique et des termes qui composent les équations a été démontrée, en particulier pour représenter l'évolution temporelle de p39Mos. De plus, nous avons montré que le comportement de la cascade p39Mos-MEK1-MAPK peut être interprété *via* une approche analytique dans un cadre particulier de valeurs de paramètres. Bien que les aspects paramétriques du modèle soient discutés ci-après, l'approche mathématique réalisée par Christophe Russo au cours de son doctorat (2006-2009) ne sera pas détaillée.

1.1. Approche bibliographique : vers une simplification du modèle

L'analyse théorique du comportement de la voie de signalisation p39Mos-MEK1-MAPK lors de la transition G2/M des ovocytes de *Xenopus laevis* a suscité un grand intérêt au cours des dernières décennies. Dans ce modèle, l'apport de données expérimentales a permis d'élaborer des modèles prédictifs et de tester leur conformité en relation avec de nouvelles observations. L'une des références majeures dans ce domaine est constituée par l'ensemble des travaux menés par le groupe de James E. Ferrell (Huang et Ferrell, 1996 ; Ferrell et Machleder, 1998 ; Ferrell, 1999b ; Ferrell et Xiong, 2001 ; Xiong et Ferrell, 2003 ; Angeli *et al.*, 2004 ; Brandman *et al.*, 2005 ; Justman *et al.*, 2009). Dès 1996, Huang et Ferrell étudient la cascade MAPK activée par p39Mos en combinant une approche théorique et une approche expérimentale. Des extraits d'ovocytes supplémentés en protéine malE-Mos ont été utilisés dans ces travaux (Huang et Ferrell, 1996). Leurs équations tiennent compte des interactions entre les protéines et leur assemblage, sous l'hypothèse d'une dynamique qui suit une loi proposée par Guldberg et Waage traitant de l'équilibre chimique (Waage et Guldberg, 1864). Son énoncé indique que la vitesse d'une réaction chimique est proportionnelle au produit des masses actives des substances réagissantes. Les masses actives sont les concentrations dans le cas du modèle. Parallèlement, Huang et Ferrell (1996) démontrent numériquement et expérimentalement que la structure en cascade implique une évolution temporelle de l'activité des MAPK phosphorylées et actives. Ainsi, l'activation des MAPK suit un profil sigmoïdal en réponse à un stimulus qui varie linéairement. Ce comportement caractérise les enzymes qui possèdent un fort degré de coopérativité. Afin d'expliquer la réponse particulière des MAPK

dans l'ovocyte de Xénope, l'activation mutuelle des cascades p39Mos-MEK1-MAPK et Plx1-Cdc25-MPF est proposée par Ferrell (1999a). S'il ne propose pas un modèle mathématique pour l'étude des interactions entres ces deux cascades, il discute des propriétés de chacune d'elles et de l'effet de leur couplage sur la réponse de type tout-ou-rien dans l'ovocyte après une stimulation par la progestérone (Ferrell et Machleder, 1998). En 2004, Angeli et collaborateurs proposent un modèle de cascade qui ne tient compte que de p39Mos, de MEK1 et des MAPK, sans autre partenaire (Angeli *et al.*, 2004). Ce modèle est caractérisé par l'utilisation d'une cinétique de type Michaelis-Menten pour exprimer les taux de synthèse et la production des divers états des protéines kinases étudiées. Afin de déterminer numériquement les valeurs de concentration de p39Mos, de MEK et des MAPK, des données expérimentales sont utilisées. Ce modèle se réfère également aux vitesses des réactions et aux valeurs des constantes de Michaelis-Menten. Par ailleurs, Brandman et Ferrell (2005) ont analysé les mécanismes de transmission d'un signal par un système formé de plusieurs cascades qui présentent des boucles de rétrocontrôle positif, dont au moins une est plus rapidement activée que les autres. Parmi les exemples utilisés pour l'ovocyte de Xénope, trois boucles positives sont citées :

1/ Cdc2/Cycline B → p39Mos → Cdc2/Cycline B (Boucle lente)
2/ Cdc2/Cycline B → Cdc25C → Cdc2/Cycline B (Boucle rapide)
3/ Cdc2/Cycline B → Myt1 → Cdc2/Cycline B (Boucle rapide)

Les mécanismes exacts par lesquelles la progestérone active le MPF restent mal connus, mais impliquent la synthèse de Cycline B. On remarque que le MPF interagit avec ses deux régulateurs, Cdc25 et Myt1. Récemment, Justman et Ferrell ont analysé le rôle de la Glycogène Synthase Kinase-3β (GSK-3β) sur la variation du niveau d'activation de la cascade par la progestérone (Justman *et al.*, 2009). Cette kinase est un régulateur négatif qui inhibe le processus de traduction de la protéine p39Mos. Différents modèles ont été développés pour déterminer l'influence des motifs de régulation sur le niveau d'activation de la cascade. À l'opposé des modèles antérieurs, p39Mos est représentée par deux variables : l'une, notée M, tient compte de la concentration de p39Mos synthétisée (déphosphorylée, non-stable et inactive) ; l'autre, notée M*, est une variable composite représentatrice de la forme active de p39Mos (phosphorylée, stable) et des kinases dépendantes de p39Mos (MEK et MAPK). La boucle de rétrocontrôle positif exercé par les MAPK sur l'activation de p39Mos n'apparait pas explicitement, cependant une boucle de rétrocontrôle positif est désignée pour indiquer l'influence de M* sur la production de M. Dans ce système, les auteurs ne se focalisent donc plus sur la dynamique d'activation de la cascade p39Mos-MEK1-MAPK, mais sur les événements précoces qui conditionnent la dynamique de la cascade, à savoir la synthèse de la protéine p39Mos sur laquelle interviennent la progestérone et la GSK-3β.

D'autres équipes ont proposé des modèles d'étude de la voie de signalisation. Ainsi, des oscillations de phosphorylation des MAPK ont pu être prédites en combinant l'ultrasensibilité intrinsèque de la cascade à des mécanismes de rétrocontrôle négatif (Kholodenko, 2000).

Enfin, la prise en compte de la forme sphérique de l'ovocyte a amené de nouvelles perspectives de travail considérant la progression spatiale de la cascade depuis la membrane cellulaire vers le noyau (Markevich *et al.*, 2006 ; Ferrell *et al.*, 2009).

1.2. Présentation du modèle de prédiction et de sa nomenclature

L'interdisciplinarité appliquée à l'étude d'un système biologique complexe nécessite dans un premier temps de définir chacun des termes qui le compose. Dans ce contexte, il est impératif de mettre en place une base commune, *i.e.* de définir une nomenclature et un lexique communs qui permettent l'intégration des membres du système sous une forme mathématique. Par ailleurs, dans l'élaboration d'un modèle de prédiction, le nombre de modules et le choix des interactions qui composent le réseau doivent parfois être restreints de manière à le simplifier. Il est à souligner qu'une simplification ne nuit pas à la compréhension de la dynamique d'un système mais, au contraire, assure un support fiable susceptible d'évoluer et d'intégrer de nouveaux régulateurs de la voie p39Mos-MEK1-MAPK.

1.2.1. Présentation du modèle et de sa nomenclature

Le modèle topologique de la voie MAPK originellement proposé par Ferrell repose sur une forte implication de la boucle de rétroaction positive activée par les MAPK sur la polyadénylation et la traduction des ARNm *mos* (Huang et Ferrell, 1996 ; Angeli *et al.*, 2004). Ce modèle, qui considère les MAPK comme le régulateur principal de l'accumulation de p39Mos, a été corroboré par Bagowski et Ferrell (2001a). Ces derniers n'ont observé aucune accumulation de p39Mos en présence d'un inhibiteur chimique des MEK, l'U0126. Néanmoins, deux autres groupes ont récemment rapporté que l'U0126 n'empêche pas l'accumulation de p39Mos, qu'elle soit stimulée par la progestérone (Gross *et al.*, 2000 ; Bodart *et al.*, 2005), l'insuline (Baert *et al.*, 2003) ou l'injection de MPF (Sellier *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent donc que la boucle de rétroaction positive activée par les MAPK n'est pas strictement nécessaire pour l'accumulation de la MAP3K, et que l'ultrasensibilité de la voie MAPK peut reposer sur d'autres mécanismes de régulation. La modelisation du réseau nous permettra de pallier le défaut du modèle initial de Ferrell qui place les MAPK comme principal effecteur de l'accumulation de p39Mos (Huang et Ferrell, 1996).

La **Figure 36** présente le réseau p39Mos-MEK1-MAPK sous la forme d'un diagramme des transitions d'états entre espèces. Dans le cadre de ce travail, nous nommons 'espèce' soit un ARN messager, soit une protéine dans un de ses états de phosphorylation. Cette représentation du réseau formé d'entités biologiques a été inspirée du logiciel CellDesigner^{TM}. Les symboles X, Xa et Xas désignent respectivement la forme non-active, la forme active non-stable et la forme active non-dégradable de la protéine p39Mos. Les symboles Y1,2,3 et Z1,2,3 rendent respectivement compte des trois différents degrés de phosphorylation des protéines kinases MEK et MAPK. Les indices, par ordre croissant, représentent les formes non-phosphorylées, mono-phosphorylées et doublement phosphorylées des protéines. Les symboles PX, PY et PZ désignent les phosphatases qui déphosphorylent les protéines p39Mos, MEK et MAPK.

Dans ce diagramme, nous proposons de décomposer l'activation de p39Mos en plusieurs étapes de manière à distinguer une source (ARNm), une protéine inactive (X), une forme active instable (Xa) et une forme active stable (Xas). Nous avons vu dans un chapitre précédent que la stabilisation de la forme active de p39Mos (Xa et Xas) dépend, d'une part, de la déphosphorylation de la sérine 105 de Xa et, d'autre part, de la phosphorylation du résidu sérine 3 de Xas par le MPF et les MAPK actives (Z3). L'existence de ces deux mécanismes de stabilisation nous incite à proposer un modèle qui représente ces interactions. De manière réaliste, Xa et Xas sont considérées actives et phosphorylent les kinases Y1 et Y2. Cela implique qu'en absence de Xas, les protéines kinases Xa provoqueront la formation de Y3 et de Z3.

1.2.2. Définitions des paramètres et constantes

Chaque flèche de la **Figure 36** symbolise la transition d'une espèce d'un état vers un autre :

- La flèche numéro 1 correspond à la synthèse de la forme (X) non-active de la protéine p39Mos par traduction de l'ARN messager *mos*. Le taux de production de X est constant et peut être désigné par le symbole k1. La dimension physique de ce paramètre est une vitesse de concentration d'unité nMs^{-1}.
- La flèche numéro 2 symbolise la production de Xa à partir de l'état X. Le phénomène qui est décrit par ce processus est le repliement de la protéine consécutif à la déphosphorylation du résidu sérine 105 de X (k2[X], s^{-1}). La vitesse de synthèse de Xa est donc proportionnelle à la concentration de X.
- La flèche numéro 3 rend compte de l'étape de stabilisation de la protéine p39Mos par la phosphorylation de son résidu sérine 3. Deux entités biologiques catalysent cette transition d'état : le MPF et les formes actives de MAPK (Z3). La relation mathématique qui décrit le taux de synthèse de Xas implique donc deux constantes (k3 et k4) dont la dimension physique correspond à des constantes de spécificité ($nM^{-1}s^{-1}$). Elles désignent les taux respectifs de phosphorylation de Xa par le MPF et les Z3. Ainsi, le taux de production de Xas dépend à la fois de la variation de la concentration du MPF et de Z3, mais également de leur interaction avec Xa.
- La flèche numéro 4 décrit l'étape de déphosphorylation de Xas par PX, et donc la production de Xa. Le taux de déphosphorylation est représenté par la constante k5 de spécificité entre PX et Xas.
- Les flèches 5 et 6 décrivent le processus de dégradation des protéines Xa et Xas par le protéasome. Les constantes k6 et k7 possèdent la dimension physique s^{-1}. La machinerie de dégradation étant identique pour les deux espèces, les valeurs attribuées aux deux paramètres sont considérées identiques.
- Les étapes de phosphorylation de Y1 et Y2 sont identifiées par les flèches 7 et 8. Il est important de noter que pour ce modèle, la phosphorylation de ces deux espèces est réalisée par Xa et Xas de manière indépendante. La constante de spécificité k8 est identique pour les interactions entre Y1 et Xa ou Xas. Cette hypothèse se fonde sur le fait que la structure des protéines Xa et Xas présentent le même site actif. Il en est de même pour la constante de spécificité k9 qui lie Y2 et Xa ou Xas.

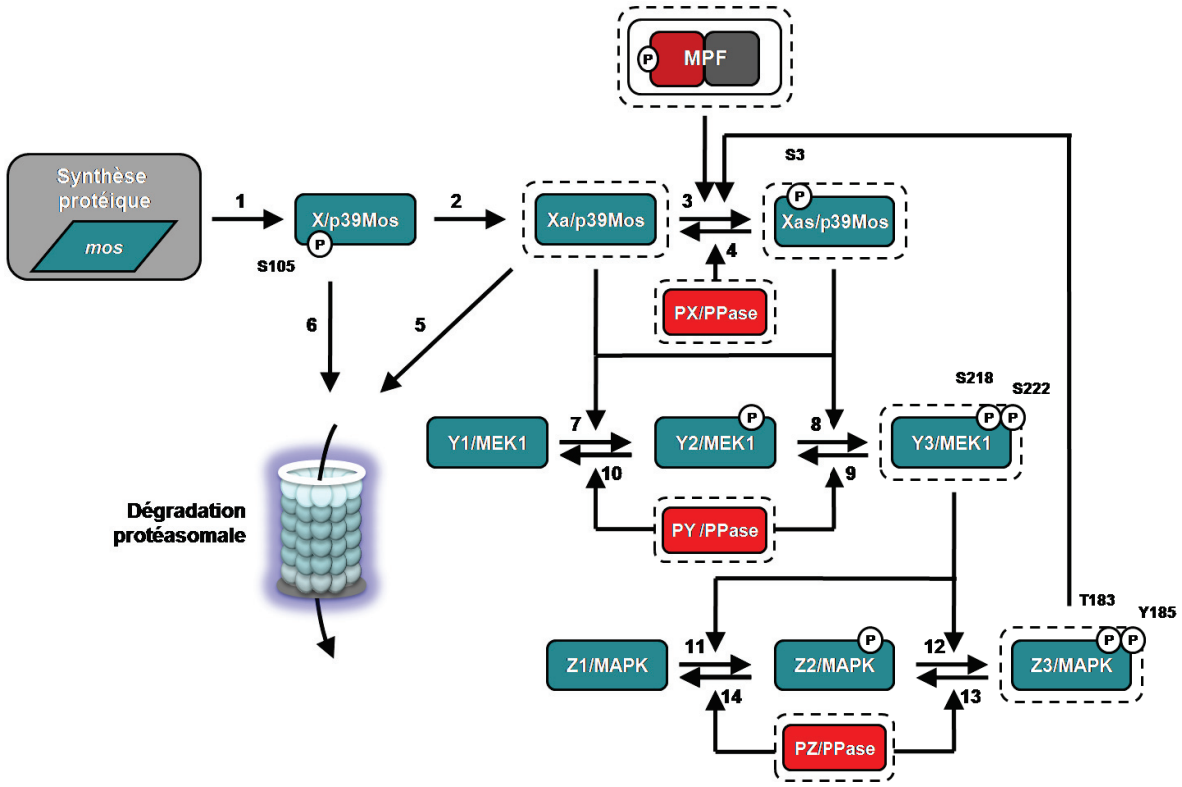


Figure 36 : Réseau de régulation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. (A) Représentation simplifiée du modèle suivant une nomenclature inspirée du logiciel CellDesigner™ grâce auquel le modèle a été paramétré. Les protéines actives sont symbolisées par un encadrement en pointillés. Le parallélépipède symbolise l'ARN *mos*.

Réaction	Paramètre	Unité	Type de constante	Effecteur	Cible	Processus
1	k1	nMs^{-1}	Accumulation	--	X	Synthèse
2	k2	s^{-1}	Vitesse	--	Xa	Repliement
3	k3, k4	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	MPF, Z3	Xa	Phosphorylation
4	k5	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	PX	Xas	Déphosphorylation
5	k6	s^{-1}	Vitesse	--	Xa	Dégradation
6	k7	s^{-1}	Vitesse	--	X	Dégradation
7	k8	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	Xas	Y1	Phosphorylation
8	k9	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	Xas	Y2	Phosphorylation
9	k10	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	PY	Y3	Déphosphorylation
10	k11	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	PY	Y2	Déphosphorylation
11	k12	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	Y3	Z1	Phosphorylation
12	k13	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	Y3	Z2	Phosphorylation
13	k14	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	PZ	Z3	Déphosphorylation
14	k15	$nM^{-1}s^{-1}$	Spécificité	PZ	Z2	Déphosphorylation

Tableau 6 : Résumé des paramètres du modèle prédictif. Chaque interaction du modèle est caractérisée par un paramètre ou une constante possédant une unité de mesure définie en relation avec la réaction considérée.

- Les transitions 9 et 10 caractérisent la déphosphorylation de Y2 et Y3 par une phosphatase symbolisée par PY. k10 et k11 sont les constantes de spécificité des interactions entre la phosphatase et ses substrats.
- Les transitions entre les espèces Z1,2,3 montrent une topologie d'interactions identique à celle de Y1,2,3. La différence principale est que seule Y3 phosphoryle Z1,2. Les taux de phosphorylation associés aux relations 11 et 12 font intervenir les constantes de spécificité k12 et k13. Les taux de déphosphorylation associés à PZ et aux relations 13 et 14 impliquent les constantes de spécificité k14 et k15.

Lorsque les paramètres de toutes les entités biologiques ont été définis **(Tableau 6)**, un système d'équations différentielles ordinaires (ODE) a été mis en place avec Chistophe Russo et Ralf Blossey. Des valeurs, ou plages de valeurs, ont ensuite été attribuées pour chacun des paramètres du système afin tester la réalité physique et biologique du modèle. Une analyse de bifurcation a finalement permis d'étudier le comportement du réseau lorsque celui-ci est perturbé et que les valeurs de paramètres ont subit des variations, soit isolément, soit simultanément.

1.3. Paramétrisation du modèle et analyse de bifurcation

1.3.1. Paramétrisation du modèle

L'analyse numérique du système d'équations différentielles est importante pour appréhender le comportement de la cascade. Afin de résoudre numériquement ce système, il est nécessaire de connaître les concentrations des termes qui constituent ces équations, et de déterminer, ou à défaut d'estimer, une valeur pour chacun des 15 paramètres du modèle que sont les constantes de vitesse et de spécificité. La mise sous paramètres du modèle s'est basée sur trois sources distinctes : (1) des mesures expérimentales issues de la littérature **(Tableaux 7 et 8)**, (2) un choix arbitré par la connaissance du comportement du système, (3) des estimations théoriques, à partir de plages de valeurs fixées expérimentalement. Les paramètres intégrés au modèle sont résumées dans les tableaux de la publication 1.

1.3.2. Analyse de bifurcations

L'analyse de bifurcations a permis de mesurer la robustesse du système lorsqu'un paramètre est perturbé. Ce modèle tient compte des divers états de la protéine p39Mos et permet d'analyser la production théorique de la protéine indépendamment des MAPK. Xas est la variable la plus pertinente à observer dans la mesure où son état d'équilibre est influencé par deux facteurs : la concentration du MPF et de Z3. Aussi, le MPF a été intégré dans le modèle de manière à analyser son rôle dans l'accumulation de la forme active de p39Mos. Cette interaction est de nature identique à l'interaction entre MAPK et Xa, la forme active instable de p39Mos.

ARNm	Quantité	Polyadénylation
mos	5 ng/ovocyte	En 90 minutes (de Moor and Richter, 1997) ou en 2 heures (Charlesworth *et al.*, 2004). ARNm présent jusque la gastrulation (stage 10, 12½ ; Sagata *et al.*, 1988)
mos polyA	Ratio non déterminé	Immédiatement suivie par la synthèse protéique (De Moor and Richter, 1997).
Autres	*Actine* = 1 ng ; HSP70 = 4 pg ; *wee*1 = 20 pg ; *myt1* = 1 pg ; *chk1* = 4 pg (Furuno *et al.*, 2003)	Précoce ou tardive selon la classe des ARNm

Tableau°7 : Résumé bibliographique des paramètres relatifs aux divers ARNm

Protéine	Concentration	Demi-vie / Dégradation	Activité enzymatique
p39Mos	0.6-15 nM (Huang et Ferrell, 1996), 10^9 molécules/ovocyte 3 nM (Ferrell, 1996)	Xe-Mos : 30 minutes dans les cellules NIH3T3 ; Pro-Ser-(MOS) : demi-vie courte Pro-Ser-PO_3^--(MOS) : demi-vie longue (plusieurs heures) (Sheng et al., 2002)	Phosphoryle MEK sur 2 sites. Pas de délai observé entre la détection de p39Mos et la phosphorylation de MEK.
MEK1	0.24-6 µM (Huang et Ferrell, 1996), $350x10^9$ molécules/ovocyte 1200 nM (Ferrell, 1996)	Pas de dégradation	Phosphoryle MAPK sur 2 sites. La bi-phosphorylation se produit en moins de 5 minutes si la concentration est entre 0.1 et 1 µM *in vitro*.
MAPK	0.24-6 µM (Huang et Ferrell, 1996), $100x10^9$ molécules/ovocyte 300 nM (Ferrell, 1996)	Pas de dégradation	Phosphoryle p90Rsk sur 2 sites. Pas de délai observé entre la détection de MAPK et la phosphorylation de p90Rsk.
PPases	24-600 nM (Huang et Ferrell, 1996)	n.d.	Déphosphoryle MAPK sur un ou deux sites (Angeli *et al.*, 2004 ; Sohaskey et Ferrell, 1999)

Tableau°8 : Résumé bibliographique des paramètres relatifs aux protéines de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et des phosphatases (PPases).

L'influence du MPF et des MAPK sur le comportement du système a été analysée. La variation de l'ensemble des paramètres, un à un, nous a indiqué que le système est bistable avec hystérèse : la valeur seuil du stimulus pour activer la cascade et rejoindre l'état stable actif est différent de la valeur seuil en dessous de laquelle la cascade se retrouve dans son état d'équilibre inactif **(Figure 37)**. La variation simultanée des paramètres k3 et k4 nous indique également que la valeur de la constante k4 est déterminante pour discriminer trois comportements du système. Lorsqu'il est soumis à des valeurs croissantes de k4, le système se comporte de manière soit monostable, soit bistable avec réversibilité, soit bistable avec une transition irréversible. Un système est bistable lorsqu'il a la possibilité de se trouver dans un de ses deux états d'équilibre stable. La bistabilité peut être comparée à une balance à bascule symétrique. Celle-ci indique deux états stables qui sont atteints en fonction d'une différence de poids de chaque côté de la bascule. Lorsqu'il y a une égalité parfaite des poids, la bascule se trouve dans un état d'équilibre instable puisqu'un petit surplus d'un côté conduit le système vers l'état stable de ce côté. *In fine*, l'intensité de la boucle de rétrocontrôle positif, qui définit l'influence des MAPK sur l'accumulation de p39Mos active, est importante sur le comportement de la voie de signalisation.

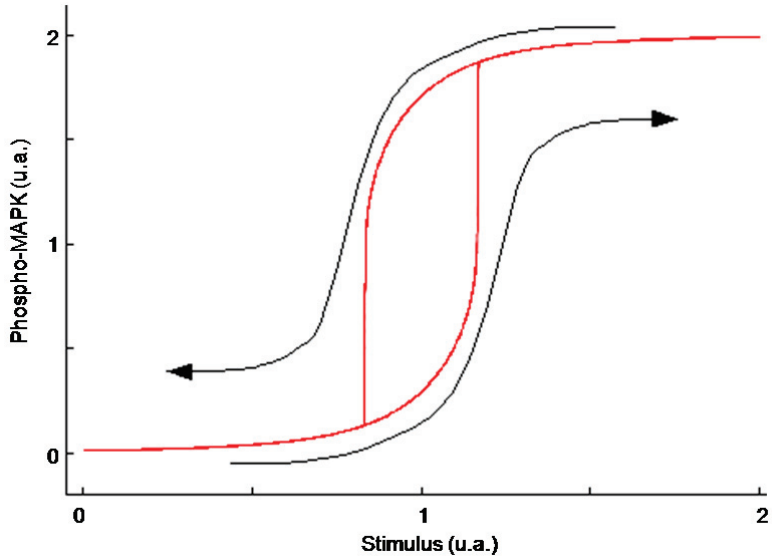


Figure 37 : Illustration du phénomène d'hystérèse. L'hystérèse se définie comme la propriété non-linéaire d'un système qui tend à conserver un état après avoir subi une stimulation. La phosphorylation et la déphosphorylation des MAPK se produisent avec des valeurs de stimulus différentes.

2. Confrontation entre le modèle prédictif et l'analyse expérimentale

La pertinence du modèle de prédiction a été évaluée. Une confrontation entre le comportement *in vivo* et *in silico* du réseau, et des termes qui le composent, est indispensable tant sur le plan mathématique que biologique. Une telle confrontation permet de s'assurer de l'accord entre les résultats issus de la simulation et ceux issus des observations expérimentales et physiologiques.

Un modèle de prédiction est en constante évolution. L'obtention de résultats expérimentaux inédits nous incite à le rendre toujours plus complexe et représentatif de la réalité biologique. À condition que le modèle soit fiable, ses conditions initiales et/ou valeurs des paramètres pourront ensuite être modifiées de manière à obtenir des résultats théoriques innovants qui, en retour, seront validés expérimentalement. Il est à noter que l'approche semi-quantitative utilisée dans ce travail ne fournit pas de valeurs absolues des concentrations des espèces étudiées. Cependant, les mesures de densités optiques (D.O.) issues de western blot sont considérées proportionnelles aux concentrations. Elles nous permettent d'analyser une tendance qui sera comparée aux conditions contrôles.

2.1. Résumé de la PUBLICATION 1

Les interactions potentielles au sein de la topologie du réseau ont été brisées de façon expérimentale, puis contrôlées pour estimer le degré des interactions existantes. Les expériences ont été de type 'extinction sélective d'activité'. L'entrée en phase M des ovocytes de Xénope a été stimulée par la progestérone ou l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures contenant du MPF actif. Ces stimulations ont été réalisées en présence ou non d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. Des analyses semi-quantificatives ont finalement permis d'évaluer les cinétiques d'accumulation de p39Mos et de phosphorylation des MAPK et de la Cycline B2.

Nous avons préalablement mentionné que p39Mos s'accumule en absence d'activité MAPK. Dans cette condition, le MPF est actif et exerce une influence non négligeable sur l'accumulation de la MAP3K (Fig. 3). Dans la mesure où le MPF suffit à l'accumulation de p39Mos, un modèle a été affiné et confronté à la réalité expérimentale. Aux côtés de la boucle de rétroaction exercée par les MAPK, l'interaction entre Xa et le MPF, qui la stabilise, a été considérée *in silico*. *In vivo*, l'injection de cytoplasme contenant du MPF actif provoque l'entrée en phase M des ovocytes et l'accumulation de p39Mos (Fig. 4). Cette dernière accumulation semble constante et atteint un plateau environ 5 heures après l'injection. Au cours de cette cinétique, l'activité du MPF est considérée comme stable puisque la Cycline B2 est toujours phosphorylée et jamais dégradée. Lorsque le cytoplasme est injecté et que la boucle de rétroaction exercée par les MAPK est rompue par l'U0126, le profil d'accumulation de p39Mos ne présente pas de plateau et aucune tendance stable ne se dégage (Fig. 5). La synthèse de p39Mos s'est également avérée transitoire puisque la protéine n'est plus détectée 8 heures après l'injection. Ces variations du taux de p39Mos sont sans doute connectées aux variations de l'activité MPF, suggérées par le profil de phosphorylation discontinu de la Cycline B2. L'accumulation de p39Mos semble donc dépendre du profil d'activation du MPF. Cette observation a été confirmée *in silico*, lorsque l'activation du MPF est restreinte à un pic (Fig. 5).

Les profils d'accumulation de p39Mos et de phosphorylation de la Cycline B2 ont ensuite été analysés en présence d'U0126 après stimulation des ovocytes par la progestérone (Fig. 6). Dans cette condition, nous avons observé que l'accumulation de p39Mos et la phosphorylation de la Cycline B2 sont transitoires. *In silico*, un profil d'accumulation de p39Mos similaire a été prédit après qu'une activation transitoire du MPF ait été simulée.

Ainsi, les résultats expérimentaux et théoriques présentent une bonne corrélation dans une optique qualitative (Fig. 6). Cette corrélation n'est cependant pas parfaite puisque 12 heures après stimulation des ovocytes par la progestérone, une chute brutale du taux de p39Mos est mesurée *in vivo.* Le profil expérimental d'accumulation de p39Mos pourrait s'expliquer par une activité du MPF moins lisse que celle simulée *in silico*. En effet, dans notre modèle, la simulation d'un profil complexe d'activité du MPF prédit une accumulation de p39Mos biphasique, comparable à celle observée *in vivo* (Fig. 7).

L'ensemble de ces données ont fait l'objet d'une publication en 2009, co-signée en premier auteur dans le journal interdisciplinaire Human Frontier Science Program (HFSP) : **Russo C*, Beaujois R*, Bodart J-F, Blossey R (2009) Kicked by Mos and tuned by MPF—the initiation of the MAPK cascade in Xenopus oocytes. HFSP Journal 3: pp. 428-440.**

2.3. Résultats complémentaires

Le rétrocontrôle exercé par le MPF sur la synthèse de p39Mos a un rôle majeur dans la régulation de la cascade. L'activation des MAPK est quant à elle nécessaire afin de maintenir l'activité du MPF constante et de stabiliser l'accumulation de p39Mos. L'influence de ces rétrocontrôles a été évaluée sur la synthèse tardive de Cdc6. Parmi les composants des complexes d'initiation de la réplication et de pré-réplication, seule la protéine Cdc6 est absente des ovocytes immatures de Xénope. La synthèse de cette protéine est donc requise pour permettre aux ovocytes de retrouver leur capacité à répliquer l'ADN (Whitmire *et al.*, 2002). Cette dernière est synthétisée tardivement au cours de la maturation. Elle constitue un bon marqueur de synthèse protéique tardive (Pascreau *et al.*, 2005) et de passage en seconde division de méiose (Lemaitre *et al.*, 2002).

Nous avons étudié la cinétique d'accumulation de Cdc6 par western blot au cours de la maturation stimulée par la progestérone **(Figure 38A)**. La protéine Cdc6 s'accumule 12 heures après stimulation hormonale, simultanément à la GVBD50, le temps nécessaire pour que 50% des ovocytes présentent une tache de maturation. La phosphorylation des MAPK et de p90Rsk démarre 8 heures après stimulation des ovocytes et, à GVBD50, le MPF est actif : la forme phosphorylée de la Cycline B2 est majoritairement détectée tandis que le résidu tyrosine 15 de Cdc2 présente une forte déphosphorylation en comparaison aux échantillons PI. La synthèse de Cdc6 a ensuite été évaluée par western blot en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur de MEK **(Figure 38B)**. L'U0126 diminue sévèrement la synthèse de Cdc6 sans pour autant l'inhiber complètement. Ce résultat suggère que l'activité des MAPK n'est pas indispensable mais qu'elle influence l'accumulation de la protéine. Dans ces conditions, le MPF semble être un bon candidat pour maintenir la synthèse protéique en absence d'activité MAPK, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle le MPF joue un rôle important dans l'accumulation de p39Mos (Publication 1). Par ailleurs, l'analyse théorique et expérimentale de la synthèse protéique tardive constitue une approche adaptée à l'étude des rétrocontrôles stimulés par les MAPK et le MPF sur les événements situés en amont de la voie p39Mos-MEK1-MAPK.

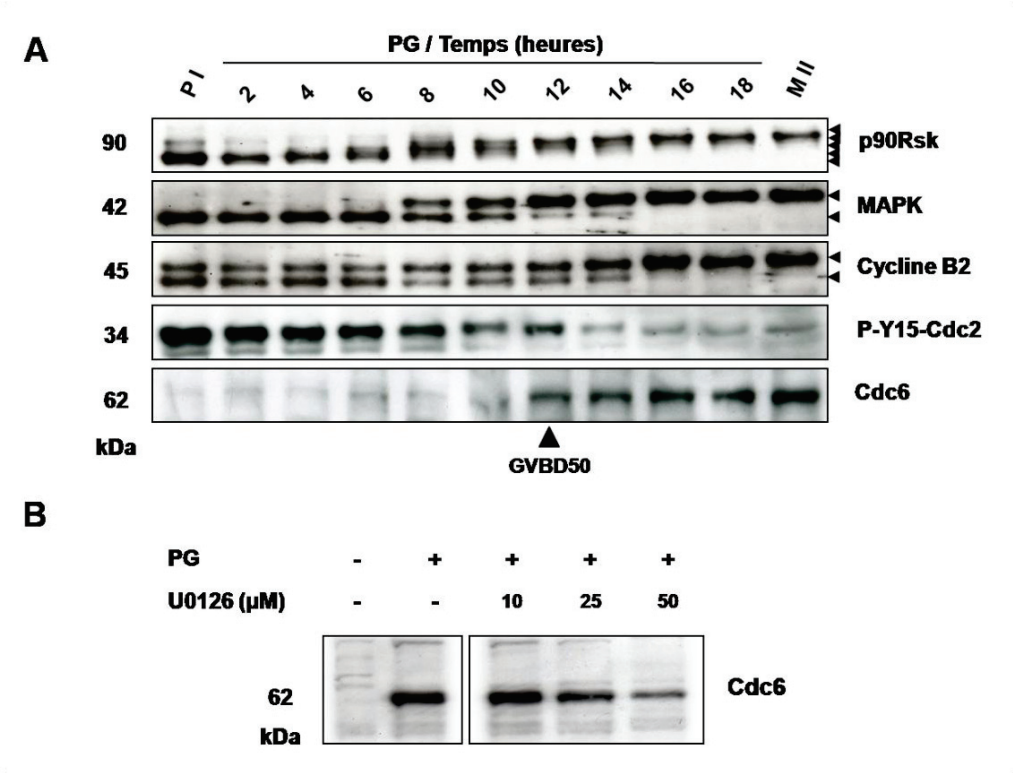


Figure 38 : Les MAPK régulent la synthèse protéique tardive. (A) L'analyse par western blot des protéines p90Rsk, MAPK, Cycline B2, P-Y15-Cdc2 et Cdc6 a été réalisée sur une cinétique de maturation ovocytaire stimulée par la progestérone. **(B)** Accumulation de Cdc6 après inhibition de MEK par des concentrations croissantes d'U0126. **PI**, ovocytes immatures arrêtés en prophase I ; **MII**, ovocytes matures arrêtés en métaphase II ; **PG**, progestérone et **U0126**, inhibiteur de MEK.

3. Limites temporelles du modèle de prédiction mathématique

Les modèles d'étude de la voie p39Mos-MEK1-MAPK actuellement développés n'étudient le réseau que sur de brèves périodes de culture ovocytaire (15 à 20 heures). Afin de développer des approches théoriques sur de plus longues périodes, l'évolution des différents acteurs du réseau a été examinée sur des temps supérieurs à 48 heures suivant l'entrée en phase M.

3.1. Cinétique de rupture du réseau p39Mos-MEK1-MAPK

Des ovocytes stimulés par la progestérone ont été récoltés au moment de l'apparition de la tache de maturation (à tGVBD, ou t0=GVBD), puis suivis jusqu'à 56 heures d'incubation suivant la GVBD (post-GVBD). Le choix du type de cinétique s'est basé sur différents constats. D'une part, le temps nécessaire à plusieurs ovocytes de stade VI pour atteindre la GVBD peut présenter une dizaine d'heures de décalage. Ceci s'explique par l'hétérogénéité de réponse entre les ovocytes d'un même ovaire et selon les individus. D'autre part, lors d'une cinétique classique réalisée suite à la stimulation par la progestérone, il est rare d'observer un score de 100% de GVBD. La cinétique post-GVBD nous permet donc de synchroniser les ovocytes en pro-métaphase I de division méiotique, à un stade où le MPF et la voie p39Mos-MEK1-MAPK sont actifs.

Trois conditions ont été mises en place : ovocytes non traités (NT), ovocytes stimulés par la progestérone (PG) en absence ou présence d'U0126 **(Figure 39)**. Dans les témoins négatifs (NT), les protéines p90Rsk, MAPK et Cycline B2 restent stablent tout au long de la cinétique, voire même 6 jours après défolliculation (non montré). Dans ces conditions, le MPF et les MAPK ne sont pas actifs **(Figure 39A)**. Lorsque les ovocytes sont stimulés par de la progestérone puis prélevés à des intervalles de 12 heures après la GVBD, p39Mos est accumulée et les protéines MAPK, p90Rsk et Cycline B2 sont phosphorylées. Néanmoins, 36 heures post-GVBD, la concentration de p39Mos et les taux de phosphorylation des MAPK, p90Rsk et Cycline B2 diminuent **(Figure 39B)**. De manière surprenante, une dégradation de p90Rsk est observée 48 heures suivant l'entrée en phase M des ovocytes, précédant celle de la Cycline B2. Cette observation est confirmée par la mesure de D.O. sur les western blots **(Figure 39D)**. Toutes les séries d'expériences réalisées dans ces conditions suivent les mêmes cinétiques de dégradation de p90Rsk, et d'inactivation des MAPK et de la Cycline B2. Ce synchronisme est observé quelque soit le pourcentage final de maturation.

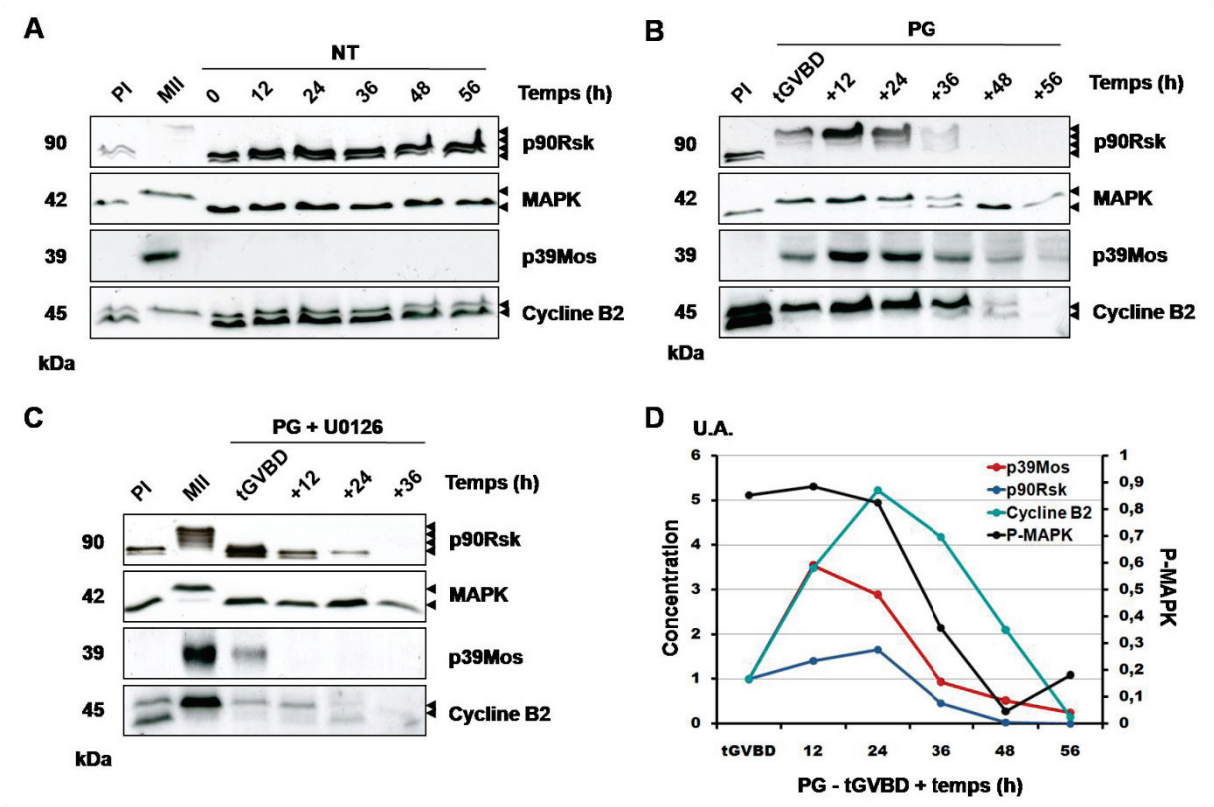


Figure 39 : Rupture de la voie p39Mos-MEK1-MAPK. L'analyse par western blot du comportement des protéines p90Rsk, MAPK, p39Mos et Cycline B2 a été réalisée lors de cinétiques post-GVBD. Trois conditions ont été considérées : (**A** ; NT) ovocytes non traités, (**B** ; PG) stimulés par la progestérone, (**C** ; PG + U0126) traités par la progestérone et un inhibiteur de MEK. **(D)** Semi-quantification des taux de p39Mos, p90Rsk, Cycline B2 et du pourcentage de phosphorylation des MAPK (P-MAPK) par mesure de D.O. sur western blot. Les mesures ont été moyennées ($n \geq 3$ femelles) puis comparées aux mesures obtenues à tGVBD. **PI**, ovocytes immatures arrêtés en prophase I ; **MII**, ovocytes matures arrêtés en métaphase II après 24 heures d'incubation en progestérone ; **tGVBD**, ovocytes prélevés lors de l'apparition de la tache de maturation ; **NT**, ovocytes non traités ; **PG**, progestérone ; **U0126**, inhibiteur de MEK et **U.A.**, unités arbitraires.

Lorsque les ovocytes sont traités par l'U0126 puis exposés à la progestérone, p39Mos s'accumule transitoirement (voir la Publication 1). Si les MAPK et p90Rsk ne sont jamais phosphorylées à cause de l'inhibition de MEK1, le profil de phosphorylation de la Cycline B2 atteste de l'activation transitoire du MPF. En absence d'activité MAPK et de p39Mos (dès 12 heures post-GVBD), la dégradation de la Cycline B2 et de p90Rsk est plus précoce (24~36 heures post-GVBD) mais tout aussi reproductible **(Figure 39C)**.

3.2. Identification d'un résidu de dégradation de p90Rsk

De façon inédite, les expériences de culture d'ovocytes sur des temps longs nous ont permis de caractériser la dégradation de p90Rsk. L'identification d'un éventuel produit de dégradation de cette protéine a donc été entrepris. Pour y parvenir, p90Rsk a d'abord été immunodétectée sur membrane entière **(Figure 40A)**. 48 heures après l'entrée en phase M des ovocytes, la kinase est dégradée et n'est plus détectée au niveau du marqueur 90 kDa. Simultanément, une bande de forte intensité, non détectée jusque là, apparaît au poids moléculaire apparent de 37 kDa.

Nous avons ensuite voulu déterminer si cette bande correspond au produit de dégradation de p90Rsk. Dans ce but, l'ensemble des échantillons de la cinétique a été soumis à un protocole d'immunoprécipitation : les protéines ont été recrutées par l'intermédiaire de billes de protéines A magnétiques et d'un anticorps polyclonal reconnaissant la région C-terminale de la Rsk1 humaine **(Figure 40B)**. Après analyse par western blot, la quasi-totalité des échantillons présentent deux bandes, de 90 et 50kDa, qui correspondent respectivement à la protéine p90Rsk immunoprécipitée et aux chaines lourdes d'IgG. La bande de 37 kDa est uniquement detectée 48 heures après la GVBD, ce qui suggère que l'anticorps anti-Rsk a recruté une protéine inconnue. Il est à souligner que les conditions d'électrophorèse ne permettent pas de détecter les chaînes légères des anticorps.

Sur la **Figure 40C**, deux populations d'ovocytes ont été comparées : des ovocytes prélevés avant la dégradation (tGVBD) et des ovocytes prélevés après la dégradation de p90Rsk (tGVBD + 48h). Pour chacune de ces deux conditions, trois dépôts ont été analysés par western blot anti-Rsk : les échantillons totaux (T), le surnageant immunodepleté de p90Rsk (SN), et l'immunoprécipitat (IP). Les chaines lourdes d'IgG sont détectées dans les différents immunoprécipitats et non dans les surnageants immunodeplétés, ce qui atteste du bon recrutement des anticorps par les billes. À tGVBD, la forme phosphorylée de p90Rsk est detectée dans le surnageant et l'immunoprécipitat. Le recrutement de la protéine par les anticorps est donc incomplet. Une légère déphosphorylation de p90Rsk est également observée entre le prélevement initial (T) et la fin du protocole (SN et IP). La présence de phosphatases dans ces échantillons pourrait expliquer cette déphosphorylation *ex vivo*. À tGVBD + 48h, p90Rsk est dégradée et la bande de 37 kDa est detectée dans le surnageant et l'immunoprécipitat. En absence d'anticorps ou de billes, p90Rsk et cette protéine inconnue ne sont pas immunoprécipités (non montré), appuyant l'hypothèse que cette bande de 37 kDa correspond à un fragment de dégradation de la protéine p90Rsk. Ce fragment est finalement nommé Ct-ΔRsk.

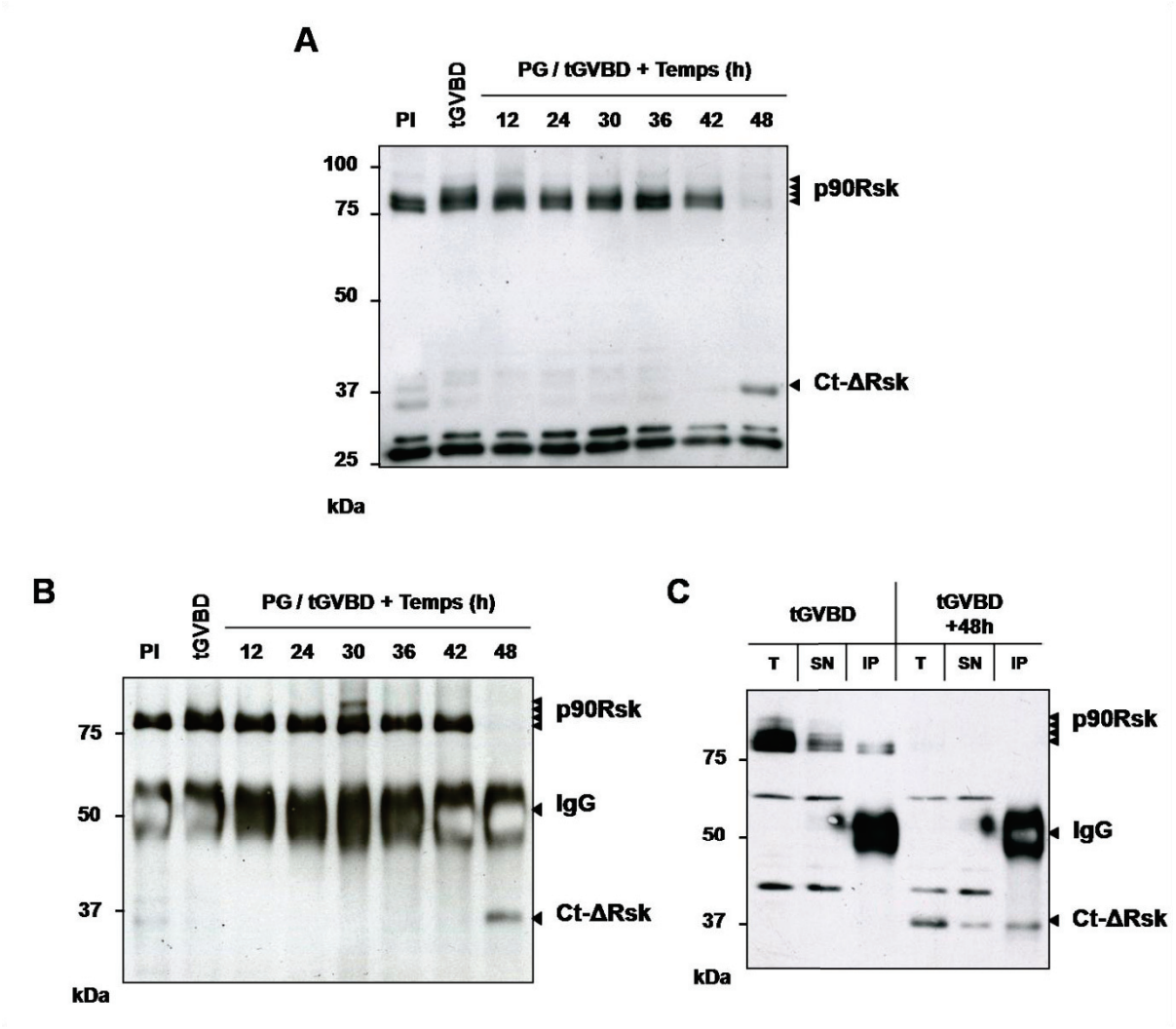


Figure 40 : Identification d'un fragment de dégradation de la MAPKAPK/p90Rsk. La protéine p90Rsk a été détectée par western blot **(A)** sur membrane entière, **(B)** après immunoprécipitation au cours d'une cinétique post-GVBD, et **(C)** dans deux conditions différentes (à tGVBD et tGVBD + 48 heures). **PI**, ovocytes immatures arrêtés en prophase I ; **PG**, progestérone ; **tGVBD**, ovocytes prélevés au moment de l'apparition de la tache de maturation ; **T**, échantillons totaux avant application du protocole ; **SN**, surnageant après immunoprécipitation et **IP**, immunoprécipitat.

3.3. Tentative de purification de Ct-ΔRsk

Afin de s'assurer que Ct-ΔRsk est un fragment de dégradation de p90Rsk, nous avons tenté d'isoler la bande de 37 kDa des protéines totales pour le soumettre à une analyse par spectrométrie de masse et/ou séquençage. Afin de purifier le fragment Ct-ΔRsk, une copie identique du gel « **Figure 40B** » a été soumise à une coloration des protéines totales par le SYPRO®Ruby (Invitrogen). En comparaison avec le bleu colloïdal et le nitrate d'argent, cette technique de luminescence présente la particularité : (1) d'être sensible à de très faibles quantités de protéines (0,25~1 ng contre respectivement 10 ng et 1~5 µg de protéines pour le nitrate d'argent et le bleu colloïdal), (2) de présenter une faible variabilité de marquage entre les protéines et (3) d'être compatible avec la spectromètrie de masse et le séquencage.

La coloration au SYPRO®Ruby a révélé une concentration homogène de protéines dans les échantillons complets (non montré). Par conséquent, même après de longs temps de culture, la dégradation de p90Rsk ne s'explique pas par une protéolyse généralisée. Par ailleurs, en dépit du « pre-clearing » des échantillons, la coloration des immunoprécipitats n'a pas permis pas de discriminer les protéines d'intérêt des autres protéines dans le gel. Ceci s'explique par (1) un important bruit de fond et un recrutement incomplet de p90Rsk (et de Ct-ΔRsk) en raison d'un défaut de spécifité de l'anticorps ; et (2) une concentration en p90Rsk (et Ct-ΔRsk) insuffisante pour reconnaitre ces protéines du bruit parasite. *In fine*, Ct-ΔRsk n'a pas été purifiée par cette approche.

4. Matériel et méthodes complémentaires

L'essentiel du matériel et méthodes relatif à cette première partie de résultats est disponible dans la publication 1. Les informations techniques non compilées dans l'article sont présentées ci-après.

4.1. Anticorps anti-Cdc6

La protéine Cdc6 est détectée par incubation des membranes de nitrocellulose sous agitation douce dans une solution contant un anticorps polyclonal de lapin anti-Cdc6 dilué au 1/500 (don du Pr. Méchali, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, Montpellier, France).

4.2. Immunoprécipitation anti-Rsk

Homogénéisation : Les ovocytes sont lysés dans le tampon d'homogénéisation IPH (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40/Igepal, pH8) puis centrifugés pour éliminer les réserves vitellines et les débris membranaires (10000 g, 15 min, 4°C). Un volume de surnageant est mélangé à un volume de tampon Laëmmli 1X (Laëmmli + 4% β-mercapto-ethanol ; BioRad), puis chauffé (100°C, 5 min). Cet échantillon constitue le contrôle T (protéines totales avant immunoprécipitation). *Lavage des billes* : Parallèlement, la résine (billes de protéines A) est lavée 3 fois dans un volume de 500 µl de tampon IPH, puis centrifugée (2000 g, 2 min, 4°C). *Pre-clearing* : 50 µl de résine propre est ajoutée au surnageant. Le tout est placé sous agitation douce (1 h, 4°C), puis centrifugé (2000 g, 2 min, 4°C). Les billes sont ensuite éliminées. *Immunorecrutement* : 0,02 µg/ovocyte d'IgG anti-Rsk (Santa Cruz Biotechnology) est ajouté au surnageant placé sous agitation douce (12 h, 4°C). *Immunoprécipitation* : 50 µl de résine propre est ajoutée au mélange surnageant/anticorps, placé sous agitation douce (1 h, 4°C), puis centrifugé (2000 g, 2 min, 4°C). Le surnageant est récupéré, mélangé à un volume de tampon Laëmmli 1X (Laëmmli + 4% β-mercaptoethanol ; BioRad), puis chauffé (100°C, 5 min). Il constitue l'échantillon SN (surnageant après immunoprécipitation). *Lavage du culot* : Après immunoprécipiation, le culot de résine/anticorps/protéines est lavé 3 fois par le tampon IPH dans un volume final de 500 µl, puis centrifugé (2000 g, 2 min, 4°C). *Dénaturation* : Le culot lavé est finalement suspendu dans un volume de 3 µl/ovocyte de tampon Laëmmli 1X (Laëmmli + 4% β-mercaptoethanol ;

BioRad), puis chauffé (10 min, 100°C). Il constitue l'échantillon IP contenant les protéines immunoprécipitées. Dans ce protocole, les billes de protéines A classiques qui constituent la résine ont été remplacées par des billes de protéines A enveloppées d'une pellicule métallique (Millipore). Les étapes de centrifugation de la résine sont supprimées puisque la résine est précipitée par un système magnétique. Cette technique permet une séparation complète des phases. Elle ajoute un confort et une précision supplémentaire à la manipulation

4.3. Coloration des protéines totales

Après SDS-PAGE, le gel est fixé (2x30 min) dans une solution composée de 50% méthanol et 7% acide acétique ; puis coloré toute la nuit dans la solution de SYPRO®Ruby (Invitrogen). Le gel est ensuite lavé (30 min, puis 2x5 min) respectivement dans une solution composée de 10% méthanol et 7% acide acétique, puis dans de l'eau distillée. Le gel est enfin observé et photographié sous lumière UV (Ex/Em : 280, 450/610 nm).

PUBLICATION 1

Russo C*, Beaujois R*, Bodart J-F, Blossey R (2009) Kicked by Mos and tuned by MPF—the initiation of the MAPK cascade in Xenopus oocytes. HFSP Journal 3: pp. 428-440.

HFSP Journal

ARTICLE

Kicked by Mos and tuned by MPF—the initiation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes

C. Russo,[1,2] R. Beaujois,[2] J.-F. Bodart,[2] and R. Blossey[1]

[1]Biological Nanosystems, Interdisciplinary Research Institute, University of Sciences and Technology Lille, USR3078 CNRS, 50 Avenue Halley, F-59658 Villeneuve d'Ascq, France
[2]Laboratory of Division Signal Regulation, EA 4020, Building SN-3, University of Sciences and Technology Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

(Received 6 July 2009; accepted 24 September 2009; published online 18 December 2009)

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a paradigmatic signaling cascade, which plays a crucial role in many aspects of cellular events. The main initiator of the cascade in *Xenopus* oocytes is the oncoprotein Mos. After activation of the cascade, Mos activity is stabilized by MAPK via a feedback loop. Mos concentration levels are, however, not controlled by MAPK alone. In this paper we show, by imposing either a sustained or a peaked activity of M-phase promoting factor (MPF) (Cdc2-cyclin B), how the latter regulates the dynamics of Mos. Our experiments are supported by a detailed kinetic model for the Mos-MPF-MAPK network, which takes into account the three different phosphorylation states of Mos and, as a consequence, allows us to determine the time evolution of Mos under control of MPF. Our work opens a path toward a more complete and biologically realistic quantitative understanding of the dynamic interdependence of Mos and MPF in *Xenopus* oocytes. [DOI: 10.2976/1.3265771]

CORRESPONDENCE
R. Blossey:
ralf.blossey@iri.univ-lille1.fr

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a paradigmatic signaling cascade, which plays a crucial role in many aspects of cellular events. Relaying extracellular stimuli at the plasma membrane to targets in the cytoplasm and the nucleus, the MAPK cascade consists of several levels in which the activated kinase at each level phosphorylates the kinase at the downstream level in the cascade. The MAPKK kinase—the activator at cascade entry—is either the protein Raf in somatic cells or the oncoprotein Mos in female gametes such as those of vertebrates like *Xenopus*, which underlies our present work.

In frog female gametes, the protein-protein interaction network organization drives an ultrasensitive and all-or-none response of MAPK. The functional organization of the MAPK signal transduction pathway greatly enhances the sensitivity of cellular targets to external stimuli such as hormones and leads to ultrasensitivity of MAPK to the input signal. The basis of the topological representation of the pathway was laid in (Huang and Ferrell, 1996). All MAPKs are recruited upon progesterone stimulation in *Xenopus* oocytes (Ferrell and Machleder, 1998) and this pathway has been demonstrated to be involved in at least three aspects of meiosis progression: (1) meiotic spindle formation (Bodart *et al.*, 2002, 2005; Horne and Guadagno, 2003); (2) DNA replication inhibition (Gross *et al.*, 2001; Dupré *et al.*, 2002); and (3) establishment of the cytostatic activity in metaphase II-arrested oocytes (Dupré *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2007).

Above a threshold value progesterone stimulates oocytes to resume meiosis in an irreversible manner (Xiong and Ferrell, 2003), dependent upon a burst of protein-kinase activities involving Cdk and MAPK. The key protein in the initiation module of the MAPK cascade is the oncoprotein Mos, a MAPK kinase whose function appears to be conserved from echinoderm models to vertebrates (echinoderms: Amiel *et al.*, 2009; mammals: Colledge *et al.*, 1994, Hashimoto *et al.*, 1994; goldfish: Kajiura-Kobayashi *et al.*, 2000; amphibians: Sagata *et al.*, 1988, 1989). In immature amphibian oocytes, Mos mRNA is stored but not translated. Upon hormonal

HFSP Journal © HFSP Publishing $25.00

http://hfspj.aip.org/doi/10.2976/1.3265771

stimulation, Mos mRNA is polyadenylated and translated. In response to the activation of the polyadenylation and protein synthesis machineries, Mos level dramatically increases, leading to MEK1 phoshorylation and MAPK activation.

Mos is not the only molecule implied in the activation of the MAPK cascade. Another important actor is the M-phase promoting factor (MPF), which is activated simultaneously to MAPK at meiotic resumption. In their pioneering experiments (Masui and Markert, 1971) demonstrated that cytoplasm from an egg or metaphase II arrested oocyte was capable of inducing meiosis or M-phase entry. The biochemical nature of the meiotic promoting activity detected in egg-cytoplasm was later determined to be a heterodimer complex of Cdc2 and cyclin B; for a review, see Masui (2001). The MPF was found to be the universal factor responsible for the G2/M cell cycle transition, regardless of the species considered.

Both Mos and MPF activities are interrelated and MPF plays a non-negligible role in the activation of the MAPK module. In *Xenopus* oocytes, Mos had appeared as the best candidate for a MPF-regulated stimulator of the MAPK activation during meiosis, although Mos-independent mechanisms cannot be excluded. Indeed, if the first MPF activation burst at metaphase I is impaired by chemical inhibitors such as roscovitine and olomoucine (Flament *et al.*, 2000) or through the use of Cdc2 negative mutants or Cdc2 inactivating antibodies (Nebreda *et al.*, 1995), no MAPK activation is observed in *Xenopus* oocytes. Oligonucleotide strategies targeting cyclin B have also been employed to address the role of MPF during meiosis, but failed to prevent the activation peak at meiosis I because the latter relies on cyclins associated to Cdc2 under an inactive stored stock of MPF (called pre-MPF) and is not dependent upon cyclin B synthesis. Such studies stressed the role of MPF reactivation and cyclin B synthesis in division spindle morphogenesis but also underlined the role of MPF activity in Mos maintenance (Hochegger *et al.*, 2001, Haccard and Jessus, 2006). Consistent with this view, injection of nondegradable cyclin B in these conditions prevented the loss of Mos (Hochegger *et al.*, 2001). The MPF activity inhibition can also be achieved at metaphase II arrest, a stage at which most vertebrates stop in anticipation for fertilization. When the metaphase II-block release occurs upon calcium release at fertilization, the physiological drop in MPF activity is followed by Mos degradation within 30 min (Watanabe *et al.*, 1989; Bodart *et al.*, 1999). Similarly, when chemical kinase inhibitors such as six dimethyl amino purine impair MPF activity, Mos disappears 30 min after inactivation of MPF (Bodart *et al.*, 1999), suggesting that Mos maintenance is under the control of MPF. Metaphase II arrest has further been proposed to be set by the equilibrium between Mos and MPF activities at metaphase II: Mos prevents MPF inactivation through the inhibition of cyclin B proteolysis by modulating the activity of the anaphase promoting complex (Wu and Kornbluth, 2008) while MPF promotes Mos stability through its phosphorylation (Castro *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2002). Taken together, these observations lead to the conclusion that MPF is a major component of both Mos activation and maintenance.

In this work, we address the roles of both Mos and MPF in the initiation steps of the MAPK cascade. We make explicit, by both experiment and a modeling approach, how Mos dynamics is driven by MPF. In order to achieve this we develop a detailed model for MAPK cascade activation in the presence of MPF. The key feature of the model is, aside from the inclusion of MPF, the distinction between the different states of stability and activity of the oncoprotein Mos, which, to our knowledge, is developed here for the first time into a mathematical model for the kinetics of the MAPK cascade. The model is confronted with experiments in which the MPF activity is turned on by hormonal stimulation or through the activation of the MPF auto-amplification loop either in presence or absence of the MAPK feedback loop.

The paper is organized as follows. After the introduction, a detailed description is given of the three phosphorylation states of Mos and how they can be built into a kinetic model represented by ordinary differential equations (ODEs) for the concentrations of the molecules. Subsequently, the model is parameterized and its equilibrium states are obtained from a bifurcation analysis. Finally, we describe our experiments on the time evolution of Mos under a number of different conditions and their comparison with the results obtained from numerical simulations from our model. We conclude and provide an outlook on future work based on our results.

RESULTS

A model for Mos-MPF-driven activation of the MAPK cascade

The essential feature of our model for the initiation steps of the MAPK cascade network is that it takes into account three different forms of Mos, which differ among each other in their phosphorylation state, see Fig. 1(A).

First, a distinction between active versus nonactive Mos is made. Mos activation can be conceived as a double-hit process in which dephosphorylation of Ser-105 and folding proteins such as chaperones free Mos from an inactive status while phosphorylation of Ser-3 enables Mos to exert its full catalytic activity on MEK1. Indeed, when not phosphorylated on the Ser-3 residue, Mos appears to exhibit little or no catalytic activity. In accord with (Chen and Cooper, 1995) who proposed that the phosphorylation of Ser-3 promotes the interaction of Mos with MEK1 and promotes the activation of MEK1 by Mos, it was observed that Ser-3A mutation decreased Mos activity and ability to promote meiosis resumption (Yue and Ferrell, 2006). Other studies are consistent with this view (Matten *et al.*, 1996), although Ser-3 mutations were initially not reported to impair Mos activity because Mos phosphorylation could be observed even in absence of catalytic activity of the protein (Freeman *et al.*,

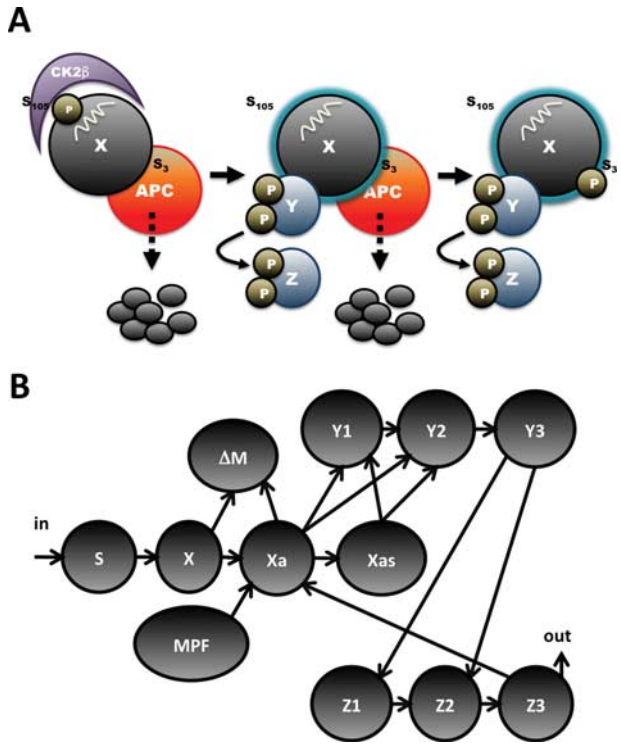


Figure 1. (**A**) **Mos phosphorylations states.** Folded Mos (X) is at first inhibited by phosphorylation of residue Ser-105, located in a α-helix domain and promoting its association with CK2β. Phosphorylated on Ser-3, X, as well as X_a, are targeted for proteasomal degradation, presumably through their association with the anaphase promoting complex. Beside its role in protein stabilization, Ser-3 phosphorylation enhances catalytic activity of X_{as} toward Y/MEK. (See text for further discussion.) (B) Network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes as studied in the present work. Molecules are indicated by their abbreviating symbols in the kinetic model, whereby X, Y, Z with their indices standing for the three corresponding phosphorylation states of Mos, MEK, and MAPK, respectively.

1992; Nishizawa *et al.*, 1992). In contrast to active Mos, inactive Mos is characterized by phosphorylation of Ser-105 in the kinase domain of Mos and an unfolded structure (Yue and Ferrell, 2006): (i) dephosphorylation of Ser-105 has been proposed to drive the structural rearrangement of helix alpha-C and (ii) inhibition of chaperone Hsp90 by geldanamycine leads to accumulation of inactive Mos (Fisher *et al.*, 1999). Active Mos appears as a folded protein dephosphorylated on Ser-105 but phosphorylated on Ser-3. The specificity constant for dephosphorylated Ser-105/folded Mos toward MEK is expected to be generally inferior to the specificity constant of dephosphorylated Ser-105/folded/phosphorylated Ser-3.

Second, a distinction between stable versus nonstable Mos is made. The main residue involved in Mos stability appears to be Ser-3, although Ser-16 phosphorylation prevents Mos degradation in Cos-cells (Pham *et al.*, 1999). A second-codon rule-based ubiquitin pathway was first hypothesized, where Ser-3 phosphorylation prevented the recognition of Mos by the ubiquitin-ligase driving its degradation (Freeman *et al.*, 1992; Nishizawa *et al.*, 1993, 1992). Replacement of the Ser-3 residue by Asp3 impairs Mos degradation by the proteasome (Ishida *et al.*, 1993). More recently, unphosphorylated X-Ser-Mos was shown to be short-lived in immature stage VI oocytes, irrespective of the nature of the *N*-terminal residue, whereas phosphorylated X-Ser-Mos is metabolically stable (Sheng *et al.*, 2002).

Figure 1(B) shows how this "Mos-module" integrates into the MAPK cascade. We denote by S the source for Mos, which stands for the stock of mRNA whose translation is regulated by polyadenylation mechanisms, details of which are neglected in our model. The latter step is a multistep-process including polyadenylation machinery from S to X; several actors have been identified, among them are the CPEB, its regulators, PAP machinery (Charlesworth *et al.*, 2002; De Moor and Richter, 1997; Gebauer and Richter, 1997; Mendez *et al.*, 2000; Sheets *et al.*, 1995). This is also to note that the potential roles of feedback loops at this level are not considered here.

X stands for the unfolded, Ser-105 phosphorylated form of Mos. Because this form is not phosphorylated on Ser-3, it may be targeted by the degradation machinery and is assumed to have a short lifetime. This form is not expected to have any catalytic activity toward MEK (Y_1, Y_2).

X_a stands for a folded, Ser-3 and Ser-105 dephosphorylated form of Mos. This short-lived protein exhibits a low level of catalytic activity on MEK (Y_1, Y_2). Both X and X_a half-lives have been estimated to be about 30 min (Sagata *et al.*, 1989; Sheng *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1989).

X_{as} stands for a folded, Ser-3 phosphorylated form of Mos. Shielded against degradation, this protein exerts its kinase activity in a fully efficient way. Among the kinases that prevent such degradation mechanism and stabilize Mos into a long-lived protein is the MPF [from MPF to X_a (Castro *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1990; Nebreda *et al.*, 1995)]. Then, Mos phosphorylates MEK from X_a/X_{as} to (Y_1, Y_2), which in turn activates MAPK from Y_3 to Z_1, Z_2 by dual phosphorylation of a TEY motif (Ferrell and Bhatt, 1997; Nebreda and Hunt, 1993; Posada *et al.*, 1993; Sagata *et al.*, 1988). MAPK/Erk are the main identified targets of MEK (Cowley *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994). Finally, this interaction network is embedded in a feedback loop, which enables MAPK to enhance Mos stability/accumulation [from Z_3 to X_a, (Matten *et al.*, 1996)].

The kinetic model of the Mos-MPF-MAPK cascade

The initiation of the MAPK cascade by Mos has been modeled mathematically in several publications, most notably by the Ferrell group (Huang and Ferrell, 1996; Ferrell and Bhatt, 1997; Ferrell and Machleder, 1998; Xiong and Ferrell, 2003; Brandman *et al.*, 2005; Angeli *et al.*, 2004; Yue and Ferrell, 2006; Justman *et al.*, 2009). Models for the MAPK

cascade triggered by Mos generally do not distinguish as explicitly between the different phosphorylation states of Mos as we do here. As indicated in Figs. 1(A) and 1(B), in our model each molecule of the cascade Mos-MEK-MAPK is considered in each of its three phosphorylation states. For Mos, we call these states X, X_a, and X_{as}, respectively. In our model, the upstream kinases X_a and X_{as} are effective activators of the downstream kinase $Y_{1,2}$ by phosphorylation. Then, the active form Y_3 phosphorylates $Z_{1,2}$ and therefore produces Z_3. Note that even in the presence of basal concentrations of active X (X_a, X_{as}) and Z_3 is present at low concentration when the cascade is in its low concentration state. The symbols $Y_{1,2,3}$ and $Z_{1,2,3}$ account for the three phosphorylation states of the kinases MEK and MAPK. The subscript numbers represent in increasing order the nonphosphorylated form of the kinase, the singly phosphorylated form of the kinase and the doubly phosphorylated form of the kinase, the latter of which is the only active one. The symbols P_x, P_y, and P_z represent, respectively, the phosphatases of the Mos protein and the proteins $Y_{2,3}$ and $Z_{2,3}$.

The mathematical model representing the Mos-MPF-MAPK cascade kinetics is given by the following system of ODEs:

$$[\dot{X}] = k_1 - (k_2[X] + k_7[X]), \tag{1}$$

$$[\dot{X}_a] = (k_2[X] + k_5[P_x][X_{as}]) - ([X_a](k_3[\mathrm{MPF}] + k_4[Z_3]) + k_6[X_a]), \tag{2}$$

$$[\dot{X}_{as}] = [X_a](k_3[\mathrm{MPF}] + k_4[Z_3]) - k_5[P_x][X_{as}], \tag{3}$$

$$[\dot{Y}_1] = k_{11}[Y_2][P_y] - k_8[Y_1]([X_a] + [X_{as}]), \tag{4}$$

$$[\dot{Y}_2] = (k_8[Y_1]([X_a] + [X_{as}]) + k_{10}[Y_3][P_y]) - (k_{11}[Y_2][P_y] + k_9[Y_2]([X_a] + [X_{as}])), \tag{5}$$

$$[\dot{Y}_3] = k_9[Y_2]([X_a] + [X_{as}]) - k_{10}[Y_3][P_y], \tag{6}$$

$$[\dot{Z}_1] = k_{15}[Z_2][P_z] - k_{12}[Z_1][Y_3], \tag{7}$$

$$[\dot{Z}_2] = (k_{12}[Z_1][Y_3] - k_{15}[Z_2][P_z]) - (k_{13}[Z_2][Y_3] - k_{14}[Z_3][P_z]), \tag{8}$$

$$[\dot{Z}_3] = k_{13}[Z_2][Y_3] - k_{14}[Z_3][P_z], \tag{9}$$

For this set of equations two relations of mass conservation exist [see Eqs. (4) and (7)–(9)]:

$$[Y_1] + [Y_2] + [Y_3] = [Y_T], \tag{10}$$

$$[Z_1] + [Z_2] + [Z_3] = [Z_T], \tag{11}$$

In our discussion the concentration of phosphatases are constants.

Tables I and II contain the parameter values of the ODE model. Table I lists the paramerization of the cascade itself for which previous data exist in the literature. The papers by (Huang and Ferrell, 1996) and (Angeli *et al.*, 2004) provided estimates of the concentrations of the studied proteins. The total concentration of $[Y_T]$ and $[Z_T]$ is taken from Angeli's study. The concentrations of phosphatases $P_{x,y,z}$ are identical to those used by Huang and Ferrell for their numerical simulation. Moreover, Angeli provides in the supplementary material the values of the catalytic constants of MEK phosphorylation by Mos (k_{cat}=0.064 s^{-1}) and MAPK phosphorylation by MEK (k_{cat}=0.06 s^{-1}), and the Michaelis–Menten constants associated with the affinity of the complex Mos/MEK (K_M=1,200 nM) and the complex MEK/MAPK (K_M=300 nM). We note that these K_M values are high and equal to the total concentration of substrate, so the linear approximation of the dynamics is possible because by definition K_M corresponds to the value of concentration of the substrate at which the reaction speed is at its midlevel. We further obtain from the Supplement of Angeli's paper the experimental values related to the speed of dephosphorylation of MEK (5 nM s^{-1}). For the dephosphorylation of MAPK, we used the reference proposed by Angeli in the Supplement to his paper. Within this

Table I. Parameters related to the $Y_{1,2,3}/Z_{1,2,3}$ cascade.

Name	Value	Unit	Reference
k_8, k_9	0.0000533	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$	Angeli *et al.* (2004)
k_{10}, k_{11}	0.0139	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$	Angeli *et al.* (2004)
k_{12}, k_{13}	0.0002	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$	Angeli *et al.* (2004)
k_{14}, k_{15}	0.0000139	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$	Angeli *et al.* (2004)
$[Y_T]$	1200	nM	Huang and Ferrell (1996); Angeli *et al.* (2004)
$[Z_T]$	300	nM	Angeli *et al.* (2004)
$[P_x]$	0.3	nM	Huang and Ferrell (1996)
$[P_y]$	0.3	nM	Huang and Ferrell (1996)
$[P_z]$	120	nM	Huang and Ferrell (1996)

Table II. Parameters related to the X, X_a, and X_{as} regulation.

Name	Value	Unit
k_1	0.00025	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$
k_2	1000	s^{-1}
k_3	0.062	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$
k_4	0.001	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$
k_5	0.001	$\mathrm{nM}^{-1}\ \mathrm{s}^{-1}$
k_6, k_7	0.02	s^{-1}

reference, we find an experimental measurement of the dephosphorylation rate of about 0.1 phosphate groups removed per minute per molecule of MAPK.

With the experimental values taken from Angeli's paper it is possible to infer the value of the $k_{8,\ldots,15}$ constants. We remark that $k_8=k_9$, $k_{10}=k_{11}$, $k_{12}=k_{13}$, and $k_{14}=k_{15}$ in his simulation and thus also in our numerical solutions. To determine the phosphorylation specificity constants (k_8,k_9,k_{12},k_{13}), we use their definition: k_{cat}/K_M with the values given above for MEK and MAPK, e.g., for k_8, we obtain a value of 0.0000533 $\text{nM}^{-1}\ \text{s}^{-1}$. To determine the dephosphorylation specificity constants (k_{10},k_{11}) we identify the relation (e.g., $k_{10}[Y_3][P_y]$, which has the dimension of a reaction speed) with the experimentally measured reaction speed (here equal to 5 $\text{nM}\ \text{s}^{-1}$). We fixed $[P_y]=0.3$ nM and $[Y_3]$ has a maximum value of 1200 nM, therefore we extract a value of k_{10} as $k_{10}=0.0139\ \text{nM}^{-1}\ \text{s}^{-1}$. A different procedure is used for the other specificity constants of dephosphorylation (k_{14},k_{15}). With the estimated number of phosphate groups removed cited above, we convert its unit to obtain a dimension of per second per molecule of MAPK. We find the value of 0.00167 phosphate groups removed per seconds per molecule of MAPK. Then, since we fixed $[P_z]=120$ nM, we can extract the value of $k_{14}=0.00167/120=0.0000139\ \text{nM}^{-1}\ \text{s}^{-1}$.

While we determined the values related to the cascade $Y_{1,2,3}$ and $Z_{1,2,3}$ from experimental estimates, for Mos the parameters are not known experimentally. The value of the parameter k_1 on the behavior of the system is chosen in order to obtain a bistable response of the X_{as}. The catalytic constant k_2 related to the folding of the protein X is not known experimentally, but since this protein has a standard size, we can use a value of folding time of 1 ms, which is a common mean time (Zeeb and Balbach, 2005). For the parameters k_3, k_4, and k_5, so far no study gives values for these specificity constants. We therefore chose values consistent with the experimentally observed bistable behavior of the cascade. The k_6 and k_7 parameters have an identical (arbitrary) value because we supposed that the proteasome machinery processes and degrades the two proteins in an identical manner. The value chosen corresponds to a degradation time such that the concentration of X_{as} is at 3 nM when the cascade is off. This concentration value had been used as total concentration of Mos by (Huang and Ferrell, 1996) in their simulation.

Bifurcation analysis of the ODE model

In a first step we have studied the behavior of the model under the assumption of a fixed (time constant) value of the concentration of MPF. The results of our calculations for constant MPF are summarized in Figs. 2(A)–2(C).

Figure 2(A) shows the state diagram in the kinetic parameters k_3 and k_4, which correspond to the interactions between active Mos (X_a) and MPF and X_a and MAPK (Z_3), respectively. Two curves are shown for two different fixed values of MPF-concentration. The area enclosed by the red and blue

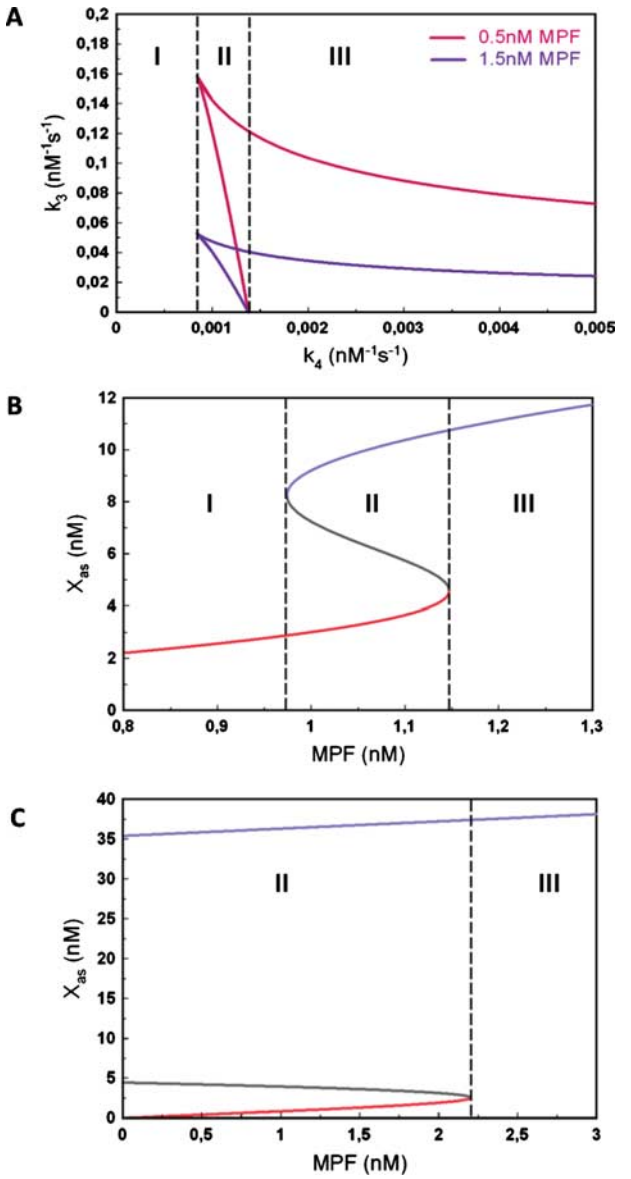


Figure 2. Bifurcation analysis of the Mos-MPF-MAPK ODE model. (A) State diagram in the space of the kinetic parameters k_3, (Mos-MPF) and k_4 (Mos-MAPK). (B) State diagram in the space of variables [X_{as}; (MPF)] for the case of a bistable transition [region II in (B)]. (C) As (B) but for the irreversible case [region III in (B)].

curves corresponds to the bistability regime. Three regions can be identified depending on the value k_4. In region I, the system is always monostable. There is a minimal value $k_4^{\min}$ at which bistability arises and region II begins. It is noteworthy that this value does not depend on MPF-concentration. Region II is limited by the value $k_4^{\max}$, which also does not depend on MPF-concentration. Therefore, region II in which the system can undergo a reversible, hysteretic transition, can only occur in a fixed interval of values $(k_4^{\min},k_4^{\max})$. Beyond region II, in region III, the system is also bistable but it displays an irreversible transition of type I according to the nomenclature of (Giudi and Goldbeter, 1997).

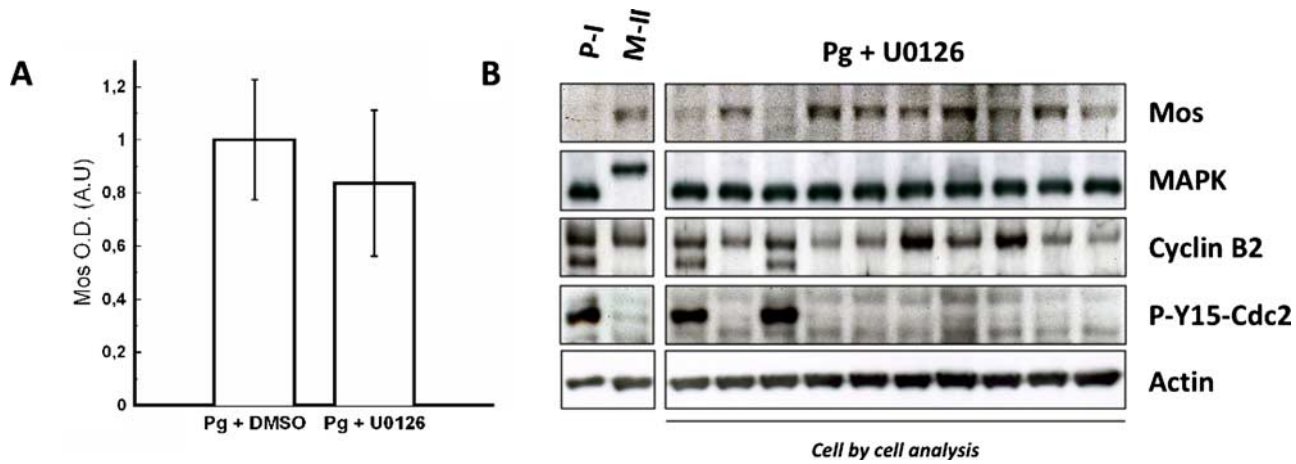


Figure 3. Mos accumulates in the absence of MAPK following progesterone addition. (A) Histogram depicts normalized values of Mos concentration at GVBD time in control oocytes treated with DMSO vehicle (0%,1%) and in U0126-treated oocytes (50 μM). Mos levels are, respectively, 1±0.22 and 0.83±0.27. (B) Cell by cell analysis by western blot for contents in Mos, MAPK, cyclin B2, phospho-tyrosine 15 Cdc2, and actin. Oocytes were taken at GVBD time for biochemical analysis.

The behaviors in regions II and III are further illustrated in Figs. 2(B) and 2(C). Figures 2(B) and 2(C) show the state diagram in the space of concentrations of Mos in its active and stable form, X_{as} and MPF with all other parameters kept fixed. The diagram indeed has the classic shape of a reversible, bistable diagram. Figure 2(C), by contrast, displays the form of the irreversible transition of type I. In this part of the analysis, we have considered MPF as a constant parameter and obtained a state diagram whose shape is a function of MPF-concentration. Since MPF in general varies in time, this diagram itself will be varying. However, irrespective of the MPF value, we can conclude from this analysis that (i) there is always a monostable region if either the MAPK feedback loop is suppressed or below threshold; (ii) depending in the strength of the feedback loop above threshold, there is reversible or irreversible bistability. In the following section, we pass on to study the time evolution of Mos by both experiment and numerical simulation.

The time evolution of Mos: experiment and modeling

Mos concentration in oocytes was assessed by western blot analysis when the MAPK feedback loop driven by MAPK is active or not (shown in Fig. 3). In our experiments, Mos accumulation is observed in the absence of MAPK activity in accord with our assumption that, while contributing to Mos accumulation through a feedback loop, MAPK is not the main primer of the cascade. Mos accumulation can be determined by optical density measurement. Progesterone-stimulated oocyte data were used as a control for semiquantification and normalization and no significant differences were observed in Mos levels between U0126-treated oocytes and control oocytes treated with DMSO vehicle [Fig. 3(A), $n=6$ females]. This analysis, performed on population, was also done cell-by-cell, which revealed that the oocytes exhibited a clear response, i.e., Mos production is "on" in each cell, in accord with data obtained on population shown in Fig. 3(B). Nevertheless, the cells exhibit individual concentration variation (as we will also see below). These data are consistent with previous works reporting Mos detection in MAPK inhibiting conditions such as HSP-90-inhibitor geldanamycin incubation (Fisher *et al.*, 2000) or U0126 treatment of oocytes stimulated by insulin through a Ras-dependent pathway (Baert *et al.*, 2003). Considering that no significant differences in Mos levels appear in presence or in absence of MAPK activity, MAPK obviously does not contribute as a major component in the initiation of the cascade.

Another source than MAPK has to be considered to build up a biologically realistic model, in contrast to initial and previous works, which proposed MAPK itself as the trigger of the cascade. As argued earlier, MPF appears as the best candidate. Thus, the physiological mechanism of cytoplasm injection was used to turn on MPF activity in absence of hormonal stimulation ["in" in Fig. 1(B)] and the dynamic of Mos accumulation was monitored [Figs. 4(A) and 5(A)]. The cytoplasm injection was performed in oocytes treated with or without U0126. In our hands, GVBD50 [the time at which 50% of treated oocytes exhibited germinal vesicle breakdown (GVBD)] was about 4 h postinjection in control oocytes whereas it was approximately doubled in U0126-treated oocytes. Activation of MPF, as reported by cyclin B2 shift was, respectively, observed 2 h and 3 h postcytoplasm-injection in control and U0126-treated oocytes. Activity of MPF was sustained in control oocyte whereas it is observed to faint 7–8 h postinjection as attested by both rephosphorylation of cyclin B2 and decrease in cyclin B2 levels [Fig. 5(A)]. Such observation is in accord with loss of MPF activity in U0126-treated oocytes stimulated by progesterone (Fig. 6) and is explained by MAPK involvement in cyclin B synthesis and MPF upregulation (Palmer *et al.*, 1998; Abrieu *et al.*, 2001).

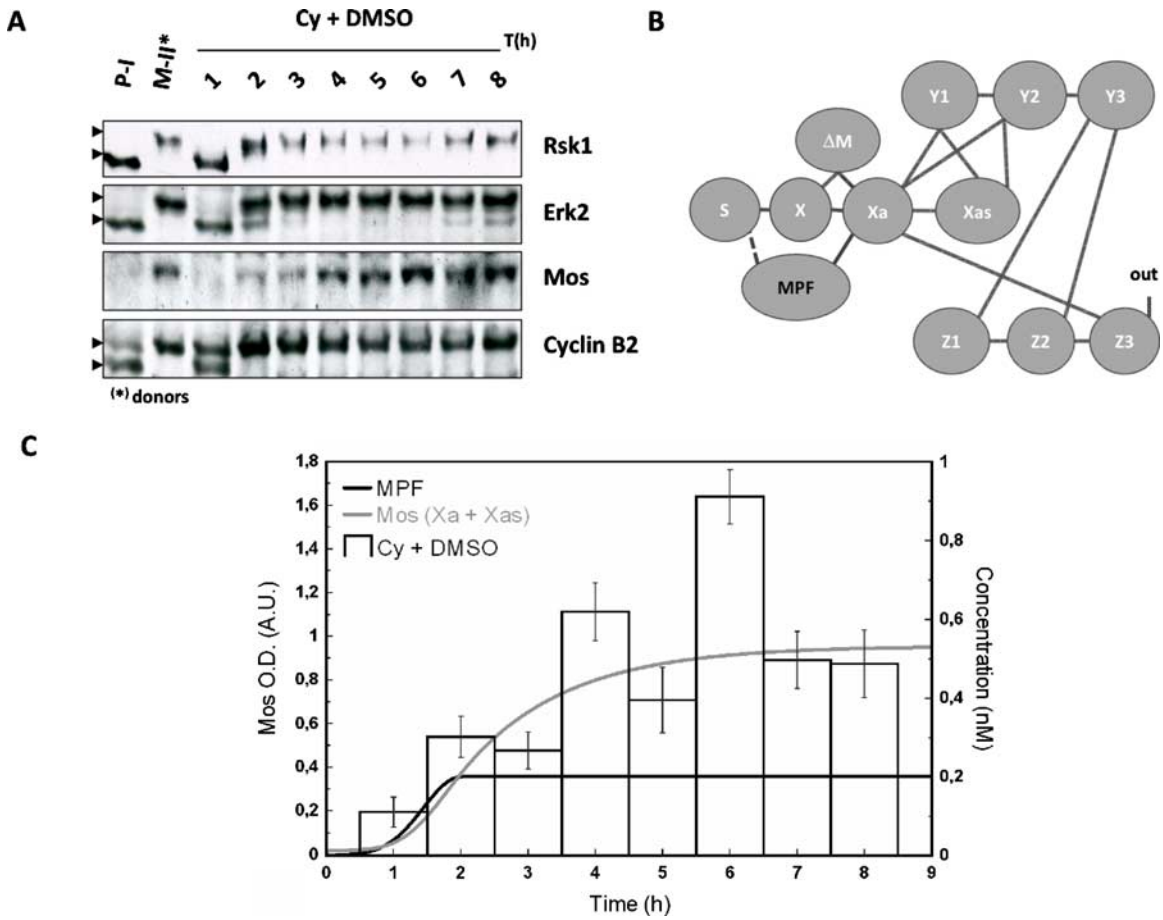


Figure 4. Sustained accumulation of Mos follows egg-cytoplasm injection. Donors and recipient were subjected to western blot analysis (A). (B) Network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes: MPF is proposed to interact with *S* (dashed line); (C) normalized values for Mos from western blots, theoretical time evolution of the concentration of MPF (bold) and total active form of Mos (X_a+X_{as}). The concentration of MPF has been chosen in order to reach a constant maximal value of Mos as in the experiment. For further discussion see text.

Absence of MAPK activity in U0126-treated oocytes was confirmed by the absence of phosphorylation of its downstream effector, Rsk1. Noticeable levels of Mos were detected in absence of MAPK activity. Nontreated cytoplasm injected oocytes exhibited a level of Mos slightly inferior at 4 h and slightly superior at 6 h to the level of progesterone-treated oocytes at GVBD (respectively, 0.80±0.12 and 1.17±0.11). Average values for U0126-treated MII cytoplasm injected oocytes were lower to those of progesterone-treated oocytes at GVBD and peaked at 0.69±0.13 at 7 h. Thus, MPF appears as a major trigger for Mos accumulation and maintenance, independently of MAPK.

Parallel to our experiments we have calculated the time variation for Mos from our model. Panels B in Figs. 4 and 5 represent the network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes. The line between *S* and *X* represents the translation of Mos from a pool of maternal mRNA stock. According to our model hypothesis the production velocity of Mos is identical for progesterone-stimulated oocytes and MPF-injected oocytes. In absence of progesterone stimulation, the dashed line corresponds to the influence of injected MPF to the protein synthesis, which has to be introduced in order to have a biologically realistic model. Indeed, injection of MPF causes activation of Aurora-A (Ma *et al.*, 2003); the latter phosphorylates CPEB, causing Mos polyadenylation and its subsequent translation (Mendez *et al.*, 2000).

Panels C in Figs. 4 and 5 illustrate the time evolution of the total active form of Mos (X_a+X_{as}) calculated with two time-dependent variations in MPF-concentration. In our ODE system, MPF is a variable parameter (no differential equation has been defined to estimate the dynamics of MPF). Therefore, according to the experimentally observed qualitative state of MPF (active vs nonactive), a corresponding concentration function was defined and applied to solve the ODE system with the tool SBML ODE solver implemented in CELLDESIGNER (see Materials and Methods). From Fig. 4(A), we note that 2 h after injection, MPF-concentration reaches a plateau at its maximal value. As a consequence, a sigmoidal curve has been designed to correspond to the behavior of the observed values of MPF-

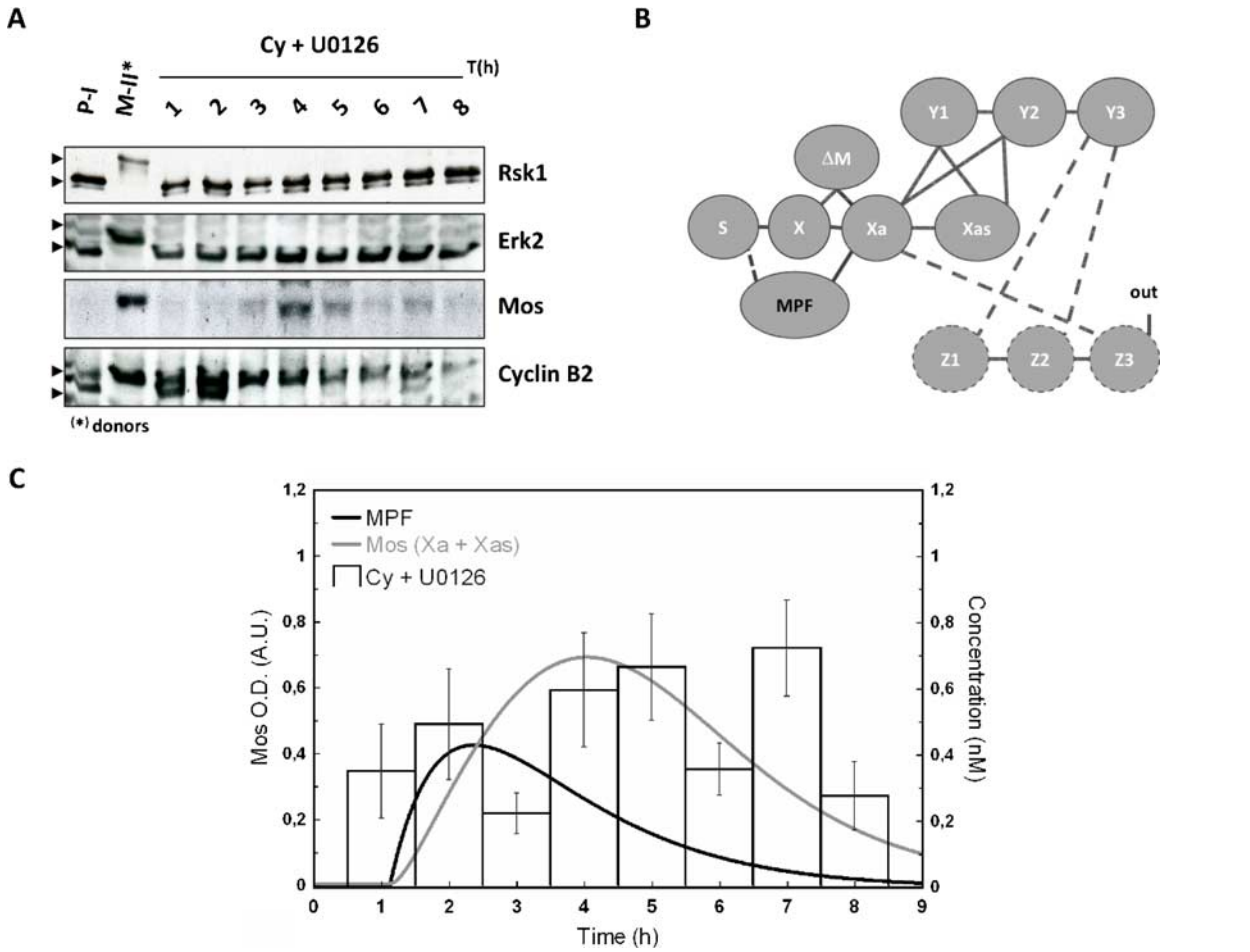


Figure 5. Mos accumulation dynamics in the absence of the MAPK-driven feedback loop. In the absence of MAPK activity, Mos transiently accumulates following metaphase II egg (donor) cytoplasm injection. Meiotic resumption was stimulated in presence of U0126 by 50 nl injection of metaphase arrested oocytes, rinsed of progesterone. Donors and recipient oocytes were subjected to western blot analysis (A) for their contents in Mos, Erk2, Rsk1, and cyclin B2. Neither Erk nor Rsk exhibits active profiles; PI, prophase I arrested oocytes; MII, Metaphase II arrested oocytes; Pg, progesterone; Cy, MPF-containing cytoplasm from MII oocytes. (B) Network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes: the interaction of Z_3 with X_a is broken by U0126, a chemical inhibitor of MEK/Y (dashed lines). MPF activation is achieved in the absence of input as described in (A) and MPF is proposed to interact with S (dashed line). (C) Normalized values for Mos level are depicted for control and U0126-treated oocytes injected with MPF-containing cytoplasm. Numerically calculated time evolution of the concentration of MPF (bold), and total active form of Mos (X_a+X_{as}). The concentration of MPF follows an assumed χ^2-shape leading to a profile of Mos qualitatively consistent with experiment. For further discussion see text.

concentration (gray curve). The same procedure has been applied to design a χ^2-type function used to evaluate the numerical calculation of Mos concentration shown in Fig. 5(C). In this set of experiments the variability of the experimental signal over a time scale of few hours, obtained over a population of ten oocytes per female (three in total), cannot be properly captured by a simple curve since no clear average signal emerges. Our numerical result in this case should be taken as indicative only; see the discussion in the conclusions.

Taken together, in control oocytes [Cy+DMSO, Fig. 4(C)], we found a good correlation between the quantified Mos amount and the expected one: both exhibit accumulation of the oncoprotein Mos. In the presence of the feedback loop, Mos appears thus to reach a stable concentration level. By contrast, in absence of the feedback loop no clear sustained accumulation of Mos is observed.

The Mos accumulation pattern following progesterone stimulation in the presence of MEK-inhibitor U0126 (50 μM) is depicted in Figs. 6(A)–6(C). This experimental condition allows turning MPF activation into a single peak: MPF activity had been reported to peak around GVBD time and drop 1 to 2 h after GVBD (Gross *et al.*, 2001). In our hands, when oocytes were stimulated by progesterone in presence of U0126, fully phosphorylated cyclin B2 was observed at 0.718 GVBD50±0.046, attesting MPF activation. A decrease in the amount of cyclin B2 detected by western blot, due to its degradation, was observed at about 1.14 GVBD50±0.04.

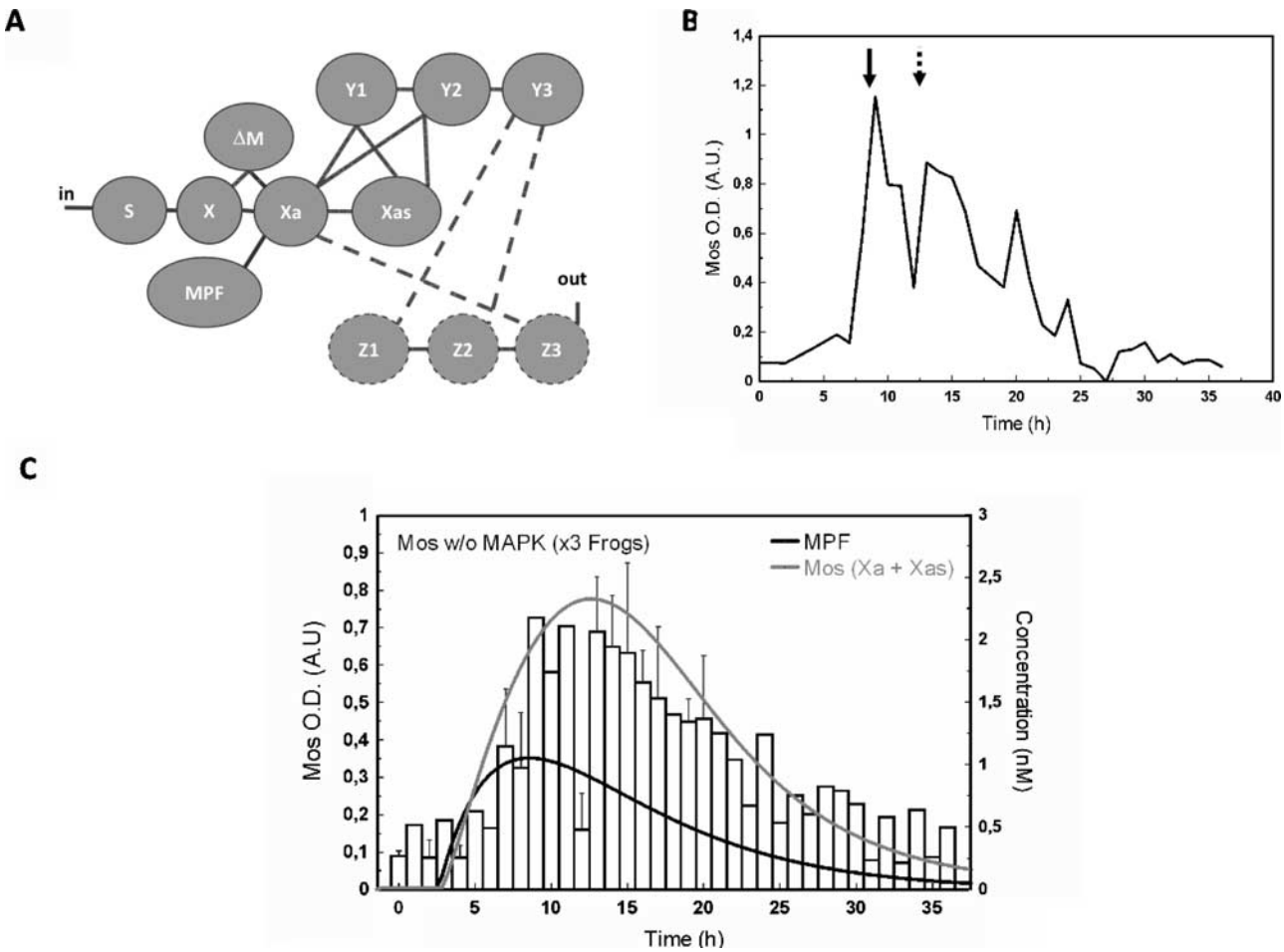


Figure 6. Mos accumulation pattern following progesterone stimulation in presence of MEK-inhibitor U0216. (A) Network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes: Z_3-interaction with X_a is broken by U0126, chemical inhibitor of MEK/ *Y* (dashed lines). MPF activation and in are brought by hormonal stimulation. (B) Representative experiment (n=3 females). Dashed arrow: GVBD50, arrow: MPK activity peak. (C) Normalized values for Mos and numerically calculated time evolution of the concentration of MPF (bold) and total active form of Mos (X_a+X_{as}).

Mos accumulation was assessed as previously described and progesterone-stimulated oocytes at GVBD were used as a control for semiquantification and normalization. Mos semiquantification data exhibit a single-peak curve with asymmetric flanks. The latter agrees with computed Mos (X_a+X_{as}) from a simulation assuming MPF time evolution to be given by a single peak [Fig. 6(C)]. We note that on the extended time-scale of this experiment (ranging over 35 h rather than 9 h) we find a very satisfactory agreement between experiment and the numerical result for Mos concentration, starting from a χ^2-type input signal of MPF.

The excellent quantitative agreement between experimental data and the numerical result in Fig. 6(C) is a consequence of the better statistics obtained over the time course, since the size of the oocyte population in Figs. 4(C), 5(C), and 6(C) is identical. However, as shown by way of example in Fig. 6(B), data on individual animals still show a marked variation in which typically two peaks were observed for Mos accumulation: the first one occurs at 0.728 GVBD50±0.09, almost simultaneously to detection of MPF under its active state, while the second peak is observed at 1.039 GVBD50±0.085, 4.5 h later. Initial Mos mRNA translation is induced in a MAPK-independent manner (Gross *et al.*, 2001; Bodart *et al.*, 2005), downstream of progesterone-mediated inhibition of PKA. If the polyadenylation machinery activity may be tuned by MPF, this machinery is initially activated through MPF-independent mechanisms, e.g., upon activity of PRE binding protein like Musashi (Charlesworth *et al.*, 2006). Then, the second peak of Mos may arise from MPF activity peak whereas the first may arise from the early initiation events driven by progesterone, independently of MPF.

CONCLUSIONS

In this paper we have studied the role of MPF and Mos in the initiation of the MAPK cascade in a combined experimental and modeling approach. In our experiments we have looked

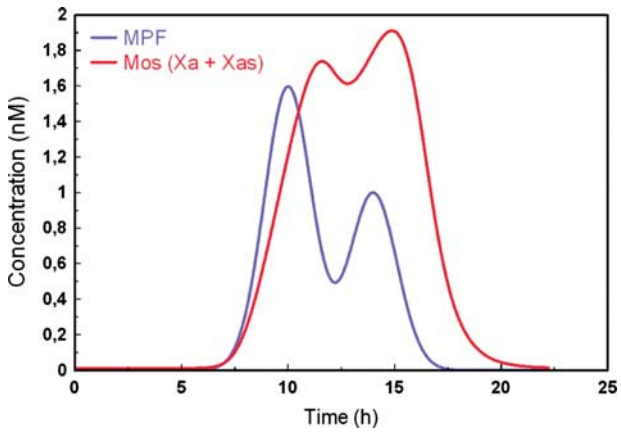


Figure 7. Supposed bimodal time evolution of the concentration of MPF and resulting total active form of Mos ***(X_a+X_{as})***. The resulting curve for Mos clearly shows a complex nonlinear variation with the input signal.

at the dynamics of Mos by provoking a sustained activity of MPF, or by stimulating a single peak of MPF activity. Our experiments show that the dynamics is clearly different in the presence or absence of the MAPK feedback loop. Mos does not depend on MAPK for its initiation and accumulation as long as MPF is active. The peak of Mos activity follows the peak of MPF activity in time. Our rate equation model takes into account the coupling of MPF to Mos, by explicitly describing the three different phosphorylation states of Mos, to our knowledge, for the first time. From the comparisons of experiments and numerical solutions of our model, we can conclude that the model is capable to not only qualitatively but also quantitatively capture well the average features observed over a population of oocytes.

We have not tried to advance further on the individual features of the Mos concentration signals, but a simple test of our model nevertheless reveals a behavior potentially important for the explanation of such features. Going back to the case of hormonal stimulation shown in Fig. 6, while we observe an excellent agreement of the overall behavior of Mos over an extended time scale shown in Fig. 6(C), still a significant variability on the level of individual animals persists, as exemplified in Fig. 6(B). Figure 7 illustrates a possible reason contributing to this variability suggested from our model. If MPF-concentration is assumed to change strongly over time, as shown by the blue curve in Fig. 7, the resulting time course of Mos concentration shown in red appears to be a strongly modulated function of its input signal. The model, and we believe therefore the real network, appears to be highly sensitive to MPF variation.

In sum, we have presented a study in which we have elucidated the interplay between MAPK and MPF at the entry of the MAPK cascade by combining experiment, literature-guided model building and numerical simulations. We believe that our model lays the basis for more detailed investigations of the initiation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes, both at the entry level and for the intertwined feedback loops that it is subjected to. In future work we will aim at elucidating further the interplay of Mos and MPF. So far, the influence of MAPK on MPF dynamics has not been considered explicitly in our model since we impose only a hypothesized time evolution of MPF. The next step therefore is to couple our model to an explicit model for the kinetics of MPF (see, e.g., Tyson, 1991). It remains to be seen how far a detailed kinetics of Mos will allow to capture more of the details of the experimental signals. In parallel, we aim at measuring MPF activity at the single-cell level.

Materials and methods

Animals, chemicals, and bioreagents: Adult *Xenopus* females were purchased from the University of Rennes I (France). Tricaine methane sulfonate was purchased from Sandoz (Levallois–Perret, France). Collagenase A and protease inhibitors were purchased from Roche Applied Science (Meylan, France). Mouse monoclonal anti-Erk2 (D-2) and rabbit polyclonal anti-Mos(xe) (C237), anti-Rsk1 (C-21), and anti-actin (I-19) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal antiphospho-Tyr15-Cdc2 antibody was purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology™, USA) and rabbit polyclonal anticyclin B2 antibody JG103 is a gift of Dr. J. Gannon (ICRF, South Mimms, United Kingdom). MEK inhibitor U0126 ethanolate was obtained from sigma.

Handling of oocytes: After anesthetizing *Xenopus* females by immersion in 1 gal of 1 MS222 solution (tricaine methane sulfonate), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes according to Dumont's classification, were isolated and follicle cells were partially removed by a collagenase treatment for 30 min (1 mg ml of 1 collagenase A) followed by a manual microdissection with forceps. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments.

Ovariectomies were performed in accordance with guidelines and regulations regarding living animals. Protocols have accepted by Veterinary Departments and J.F. Bodart is authorized for husbandry and amphibian experimentation procedures (authorization number 59-009117; Arrêté préfectoral 05/04/2006).

Xenopus oocytes treatment, stimulation, and analysis of G2/M transition (meiotic resumption): Meiotic resumption (M-phase entry) was induced by incubating G2-arrested oocytes in ND96 medium containing 10 μM of progesterone. Alternatively to hormonal stimulation, meiotic resumption was stimulated by crude cytoplasm injection from mature oocyte (50 nl per cell). Cytoplasm from mature metaphase II-stage oocytes present MPF activated complex able to activate pool of pre-MPF inactive complex of immature oocyte (Masui, 2001). U0126 was prepared in DMSO and used at a final concentration

of 50 μM. Treatments began overnight before progesterone addition or cytoplasm injection. Control oocytes were treated with an identical amount of DMSO (1‰). Kinetic of GVBD achievement, witness of the M-phase entry, was scored by the appearance of a white spot (WS) at the animal pole of the oocyte. Every hour, the representative of the WS score, ten oocytes were frozen at −20 °C for later biochemical analysis.

SDS-PAGE and western blotting: Proteins (the equivalent of a third of an oocyte was loaded per lane) were run on a 12,5% or a 15% modified SDS-PAGE (Baert *et al.*, 2003, Chesnel *et al.*, 1997) for Erk2, Rsk1, cyclin B2, and electroblotted onto nitrocellulose sheet. While the quantity of proteins remains rather constant in the *Xenopus* oocyte, equal loading and transfer efficiency were checked using the Ponceau red staining. Blots were saturated with 5% (w/v) nonfat milk in tris-buffered saline (TBS)-tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min. Rabbit polyclonal anti-Mos(xe) (1/500), antiphospho-Tyr15-Cdc2 (1/5000) (not shown), antitubulin (1/5000) primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Mouse monoclonal anti-Erk2 (1/500), Rabbit polyclonal anti-Rsk1 (1/500) and anticyclin B2 (1/1250) antibodies were incubated 2 h at room temperature. Membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween and incubated 1 h with either an antimouse (IgG or IgM) horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an antirabbit IgG at a dilution of 1:2500. Detection was carried out with enhanced chemiluminescence on Amersham hyperfilms.

Western blotting analysis and data normalization: Two types of analysis were performed to distinguish the states of Mos synthesis: (i) Western blotting of a population of ten oocytes representative of the WS score and (ii) cell-by-cell western blotting analysis. Films were scanned and Mos protein semi-quantification was realized by optical density (OD) measurement using QUANTITY ONE V4.21 one—dimensional gel analysis software from BioRad. To quantify Mos, similar rectangular areas were first made to surround each Mos band of the gel. Then volume intensity is quantified in each plot. It corresponds to the intensity data (Mos OD) inside a defined boundary drawn on our image. Also, the QUANTITY ONE V4.21 software is able to determine the local background. Local background is defined as the intensity of the nondata background pixels included in the volume quantification after area drawing. The data treatment is multistep: (i) we subtracted local background from volume intensity for each plot; (ii) we subtracted global gel background from every volume intensity; and (iii) we finally normalized Mos OD = 1 relative to a standardized positive control sample (i.e., progesterone-stimulated control oocytes). We chose OD for untreated oocytes as a value for global gel background. In these oocytes, Mos protein is not detectable. We investigated total MAPK/Erk immunoblot intensity through the same process. Since degradation of MAPK does not occur during *Xenopus* oocyte maturation, we considered this protein as a representative loading control to adjust Mos semiquantification data.

The ODE model and its analysis: The ODE model described in the paper was developed in CELLDESIGNER, a process diagram editor, with the graphical notation proposed by Kitano (Kitano, 2003, Funahashi *et al.*, 2003). This software is SBML compliant. Therefore our model has been done in level 2 version 1 SBML format and can be used by other software to able to import the SBML file. Simulations were done with SBML ODE Solver implemented within CELLDESIGNER.

The bifurcation analysis of the model was done with XPPAUT (Ermentrout, 2007). This is a software used to simulate and analyze dynamical systems. There are three main steps in the analysis. The first step consists in writing down the ODE-equations and in determining the variables and the parameters with their initial values. Since we know that MPF has a time evolution of its concentration value, it is defined as a variable parameter with initial value of 1 nM. This latter value is also the value of cyclin B concentration in fully grown stage VI *Xenopus* oocytes (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2000). Therefore, when the cascade is at its highest stable steady-state, we obtain a value of X_a+X_{as} of about 9 nM similar to the estimate concentration of active Mos in mature oocytes (Yew *et al.*, 1992). During the second step, the software solves the ODE-equations system to reach a steady-state for all the variables. Then, the third step begins with a perturbation of one parameter chosen by the user. It is also possible to perform a bifurcation analysis with two parameters. As a function of the perturbed parameter value, the software supplies the steady-state values for the variables. We chose to study the variable X_{as} as its concentration values are dependent of MPF and Z_3.

The numerical solution of system of ODE equations has been performed with the parameters values described in the supplementary material. We chose as initial conditions: $[Y_1]=1200$ nM, $[Y_2]=[Y_3]=0$ nM, $[Z_1]=300$ nM, $[Z_2]=[Z_3]=0$ nM, and $[X]=[X_a]=[X_{as}]=0$ nM. This choice corresponds to an initiation of the cascade in absence of Mos protein and without phosphorylated forms of MEK and MAPK.

ACKNOWLEDGMENTS

The work by C. Russo was supported by a doctoral grant from the French National Cancer Institute (INCa). R. Beaujois is a recipient of a fellowship from the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement." We thank Arlette Rousseau-Lescuyer for technical assistance. This work was supported by a CNRS grant from the PEPS program 2008. C. Russo and R. Beaujois contributed equally to the work.

DISCLAIMER

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Abrieu, A, Doree, M, and Fisher, D (2001). "The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes." *J. Cell Sci.* **114**, 257–267.0021-9533

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.

Angeli, D, Ferrell, JE, Jr., and Sontag, ED (2004). "Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1822–1827.

Baert, FY, Bodart, JF, Bocquet-Muchembled, B, Lescuyer-Rousseau, A, and Vilain, JP (2003). "Xp42 (Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes." *J. Biol. Chem.* **278**, 49714–49720.

Bodart, JF, Baert, FY, Sellier, C, Duesbery, NS, Flament, S, and Vilain, JP (2005). "Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes." *Dev. Biol.* **283**, 373–383.

Bodart, JF, Bechard, D, Bertout, M, Gannon, J, Rousseau, A, Vilain, JP, and Flament, S (1999). "Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(Mos) proteolysis." *Exp. Cell Res.* **253**, 413–421.

Bodart, JF, Flament, S, and Vilain, JP (2002). "Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium." *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 570–574.

Brandman, O, Ferrell, JE, Jr., Li, R, and Meyer, T (2005). "Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions." *Science* **310**, 496–498.

Castro, A, Peter, M, Lorca, T, and Mandart, E (2001). "C-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation." *Biol. Cell* **93**, 15–25.

Charlesworth, A, Ridge, JA, King, LA, MacNicol, MC, and MacNicol, AM (2002). "A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation." *EMBO J.* **21**, 2798–2806.

Charlesworth, A, Wilczynska, A, Thampi, P, Cox, LL, and MacNicol, AM (2006). "Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during Xenopus oocyte maturation." *EMBO J.* **25**, 2792–801.

Chen, M, and Cooper, JA (1995). "Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase." *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4727–4734.

Chesnel, F, Bonnec, G, Tardivel, A, and Boujard, D (1997). "Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes." *Dev. Biol.* **188**, 122–133.

Colledge, WH, Carlton, MB, Udy, GB, and Evans, MJ (1994). "Disruption of c-Mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs." *Nature (London)* **370**, 65–68.

Cowley, S, Paterson, H, Kemp, P, and Marshall, CJ (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." *Cell* **77**, 841–852.

De Moor, CH, and Richter, JD (1997). "The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes." *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6419–6426.

Dupré, A, Jessus, 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.

Ermentrout, B (2007). "XPPAUT." *Scholarpedia J.* **2**, 1399.

Ferrell, JE, Jr., and Bhatt, RR (1997). "Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase." *J. Biol. Chem.* **272**, 19008–19016.

Ferrell, JE, Jr., and Machleder, EM (1998). "The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes." *Science* **280**, 895–898.

Fisher, DL, Brassac, T, Galas, S, and Doree, M (1999). "Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes." *Development* **126**, 4537–4546.

Fisher, DL, Mandart, E, and Doree, M (2000). "Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes." *EMBO J.* **19**, 1516–1524.

Flament, S, Bodart, JF, Bertout, M, Browaeys, E, Rousseau, A, and Vilain, JP (2000). "Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on *Xenopus* oocytes and eggs." *Zygote* **8**, 3–14.

Freeman, RS, Meyer, AN, Li, J, and Donoghue, DJ (1992). "Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor." *J. Cell Biol.* **116**, 725–735.

Funahashi, A, Tanimura, N, Morohashi, M, and Kitano, H (2003). "CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks." *BIOSILICO* **1**, 159–162.

Gebauer, F, and Richter, JD (1997). "Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis." *BioEssays* **19**, 23–28.

Giudi, GM, and Goldbeter, A (1997). "Bistability without hysteresis in chemical reaction systems: a theoretical analysis of irreversible transitions between multiple steady states." *J. Phys. Chem.* **101**, 9367–9376.

Gross, SD, Lewellyn, AL, and Maller, JL (2001). "A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes." *J. Biol. Chem.* **276**, 46099–46103.

Haccard, O, and Jessus, C (2006). "Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis." *EMBO Rep.* **7**, 321–325.

Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa, Y, and Aizawai, S (1994). "Parthenogenetic activation of oocytes in c-Mos-deficient mice." *Nature (London)* **370**, 68–71.

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.

Horne, MM, and Guadagno, TM (2003). "A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle." *J. Cell Biol.* **161**, 1021–1028.

Huang, CY, and Ferrell, JE, Jr. (1996). "Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10078–10083.

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 (London)* **446**, 1100–1104.

Ishida, N, Tanaka, K, Tamura, T, Nishizawa, M, Okazaki, K, Sagata, N, and Ichihara, A (1993). "Mos is degraded by the 26S proteasome in a ubiquitin-dependent fashion." *FEBS Lett.* **324**, 345–348.

Justman, QA, Serber, Z, Ferrell, JE, Jr., El-Samad, H, and Shokat, KM (2009). "Tuning the activation threshold of a kinase network by nested feedback loops." *Science* **324**, 509–512.

Kajiura-Kobayashi, H, Yoshida, N, Sagata, N, Yamashita, M, and Nagahama, Y (2000). "The Mos/MAPK pathway is involved in metaphase II arrest as a cytostatic factor but is neither necessary nor sufficient for initiating oocyte maturation in goldfish." *Dev. Genes Evol.* **210**, 416–425.

Kanatsu-Shinohara, M, Schultz, RM, and Kopf, GS (2000). "Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes." *Biol. Reprod.* **63**, 1610–1616.

Kitano, H (2003). "A graphical notation for biochemical networks." *BIOSILICO* **1**, 169–176.

Liu, JX, Singh, B, Wlodek, D, and Arlinghaus, RB (1990). "Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-Mos protein kinase activity." *Oncogene* **5**, 171–178.

Ma, C, Cummings, C, and Liu, XJ (2003). "Biphasic activation of Aurora-A kinase during the meiosis I—meiosis II transition in *Xenopus* oocytes." *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1703–1716.

Mansour, SJ, Resing, KA, Candi, JM, Hermann, AS, Gloor, JW, Herskind, KR, Wartmann, M, Davis, RJ, and Ahn, NG (1994). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis." *J. Biochem. (Tokyo)* **116**, 304–314.

Masui, Y (2001). "From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of maturation-promoting factor (MPF) and cytostatic factor (CSF)." *Differentiation* **69**, 1–17.

Masui, Y, and Markert, CL (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." *J. Exp. Zool.* **177**, 129–145.
Matten, WT, Copeland, TD, Ahn, NG, and Vande Woude, GF (1996). "Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation." *Dev Biol.* **179**, 485–492.
Mendez, R, Hake, LE, Andresson, T, Littlepage, LE, Ruderman, JV, and Richter, JD (2000). "Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-Mos mRNA." *Nature (London)* **404**, 302–307.
Nebreda, AR, Gannon, JV, 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.
Nebreda, AR, and Hunt, T (1993). "The c-Mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs." *EMBO J.* **12**, 1979–1986.
Nishizawa, M, Furuno, N, Okazaki, K, Tanaka, H, Ogawa, Y, and Sagata, N (1993). "Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos." *EMBO J.* **12**, 4021–4027.
Nishizawa, M, Okazaki, K, Furuno, N, Watanabe, N, and Sagata, N (1992). "The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes." *EMBO J.* **11**, 2433–2446.
Palmer, A, Gavin, AC, and Nebreda, AR (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.
Pham, CD, Vuyyuru, VB, Yang, Y, Bai, W, and Singh, B (1999). "Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos." *Oncogene* **18**, 4287–4294.
Posada, J, Yew, N, Ahn, NG, Vande Woude, GF, and Cooper, JA (1993). "Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro." *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2546–2553.
Sagata, N, Oskarsson, M, Copeland, T, Brumbaugh, J, and Vande Woude, GF (1988). "Function of c-Mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." *Nature (London)* **335**, 519–525.
Sagata, N, Watanabe, N, Vande Woude, GF, and Ikawa, Y (1989). "The c-Mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs." *Nature (London)* **342**, 512–518.
Sheets, MD, Wu, M, and Wickens, M (1995). "Polyadenylation of c-Mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation." *Nature (London)* **374**, 511–516.
Sheng, J, Kumagai, A, Dunphy, WG, and Varshavsky, A (2002). "Dissection of c-Mos degron." *EMBO J.* **21**, 6061–6071.
Tyson, JJ (1991). "Modeling the cell division cycle: cdc2 and cyclin interactions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7328–7332.
Watanabe, N, Vande Woude, GF, Ikawa, Y, and Sagata, N (1989). "Specific proteolysis of the c-Mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs." *Nature (London)* **342**, 505–511.
Wu, JQ, and Kornbluth, S (2008). "Across the meiotic divide—CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era." *J. Cell Sci.* **121**, 3509–3514.
Xiong, W, and Ferrell, JE, Jr. (2003). "A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell-fate decision." *Nature (London)* **426**, 460–465.
Yew N, Mellini ML, and Vande Woude GF (1992). "Meiotic initiation by the Mos protein in Xenopus." *Nature* **355**, 649–652.
Yue, J, and Ferrell, JE, Jr. (2006). "Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos." *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5300–5309.
Zeeb, M, and Balbach, J (2005). "NMR spectroscopic characterization of millisecond protein folding by transverse relaxation dispersion measurements." *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13207–13212.

PARTIE II : ACTIVATION DES MAPK EN ABSENCE DE P39MOS

Dans la partie précédente, nous avons montré que des boucles de rétroaction régulent la synthèse de p39Mos, responsable de l'activation des MAPK (Russo *et al.*, 2009). Afin d'étudier le rôle de la MAP3K dans la dynamique d'activation des MAPK, nous avons choisi d'activer la cascade indépendamment de la synthèse de p39Mos. Pour y parvenir, diverses méthodologies ont été testées. L'activation des MAPK par la 1,10-Phénanthroline monohydrate (ou 1,10-PA), un chélateur de zinc, a d'abord été caractérisée. Parallèlement, la protéine Raf1 a été injectée en condition antisens *mos*. Enfin, nous avons évalué la capacité d'inhibiteurs de phosphatases à activer la cascade en absence de p39Mos.

1. Activation ultrasensible des MAPK par la 1,10-Phénanthroline monohydrate

1.1. Contexte de l'étude

En 2003, les travaux de Watanabe et collaborateurs ont suggéré que la 1,10-PA provoque la phosphorylation de 30% des MAPK tout en inhibant la GVBD stimulée par la progestérone (Watanabe *et al.*, 2003). L'utilisation d'un chélateur de métaux lourds imperméable à la membrane (le DTPA), ou d'un dérivé de la 1,10-PA qui traverse la membrane mais ne présente aucune propriété de chélation (la 1,7-Phénanthroline), n'a pas d'effet sur la voie MAPK. Parallèlement, l'incubation des ovocytes en présence d'ions compétiteurs leur a permis de démontrer que l'activation des MAPK stimulée par la 1,10-PA nécessite la chélation du zinc, et non celle du magnésium ou du calcium. La phosphorylation des MAPK décrite par ces auteurs présente les caractéristiques d'être réversible, de ne pas recourir à un récepteur membranaire, d'être dépendante de l'activité des MEK et indépendante de l'AMPc, de PI3-K, de PKC, de la synthèse protéique et donc de p39Mos. Par conséquent, la 1,10-PA a été retenue comme outil d'étude de la dynamique d'activation des MAPK en absence de p39Mos. Dans ces conditions, l'efficacité et le mode de recrutement des MAPK ont été étudiés.

1.2. Résumé de la PUBLICATION 2 (en préparation)

Notre étude montre que la 1,10-PA phosphoryle les MAPK de façon dose-dépendante après 48 heures d'incubation des ovocytes. En condition 1,10-PA (1 mM), une très forte activité MAPK a été mesurée et ce, même si la totalité des MAPK n'est pas recrutée (Fig. 1). Dépendante de la chélation du zinc et de l'activation de MEK1, cette activation n'exige ni la synthèse protéique, ni la production de ROS (inhibition des Reactive Oxygen Species par la SOD et la Catalase ; non montré). Par ailleurs, l'activation de MEK1 par la 1,10-PA stimule la phosphorylation des JNK mais non celle de Raf1 (Fig. S1). En présence de 1,10-PA, l'activation du MPF n'est jamais observée et serait dûe à l'inhibition de Cdc25C par la chélation du zinc. En effet, Cdc25C est une phosphatase dont l'activité catalytique nécessite la présence de cet ion (Sun *et al.*, 2007). Dans ce contexte, la 1,10-PA ne permet pas l'entrée des ovocytes en phase M, cependant elle provoque un changement morphologique particulier qui peut être confondu avec la GVBD (Fig. S2).

L'influence de la 1,10-PA sur la synthèse protéique, qu'elle soit stimulée ou non par la progestérone, a été quantifiée à l'aide d'une sonde injectée sous la forme d'un ARNm pré-adénylés codant une protéine fluorescente membranaire (Fig. 2). Ce travail original permet de rendre compte *in vivo* et de manière quantitative du rôle exercé par la 1,10-PA sur la synthèse protéique. Par cette approche, il a été démontré que le chélateur de zinc inhibe l'expression hétérologue de notre sonde à hauteur de 79,3%. Cette inhibition peut être neutralisée par l'ajout de zinc en solution, *via* un processus de compétition (Fig. S3). Cette dernière approche a également permis de démontrer que la 1,10-PA inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone de manière dose-dépendante.

Enfin, les propriétés d'activation des MAPK ont été considérées par western blot anti-MAPK. 376 ovocytes issus de 5 femelles différentes ont été répartis dans 8 concentrations croissantes de 1,10-PA, puis analysés cellule par cellule (Fig. 3). En absence de p39Mos et des boucles de rétroaction, nous avons démontré que la 1,10-PA active les MAPK selon une réponse de type graduel et, étonnamment, de manière ultrasensible (nH > 6 ; nH étant le coefficient de Hill définit en **page 101**). Cette dynamique d'activation des MAPK en absence de p39Mos et de rétrocontrôle pourrait s'expliquer par l'inhibition d'une ou plusieurs phosphatases sensibles au zinc situées en amont de MEK1.

Les résultats relatifs à la dynamique d'activation des MAPK stimulée par la 1,10-PA ont été compilés dans l'article : **« Ultrasensitive MAPK/Erk activation in absence of protein synthesis in *Xenopus* oocytes » Beaujois Rémy, Riquet Franck, Cailliau Katia, Browaeys-Poly Edith, Russo Christophe, Blossey Ralf, Vicogne Dorothée, Marin Matthieu, Vilain Jean-Pierre and Bodart Jean-François**

1.3. Résultats complémentaires

1.3.1. p90Rsk est dégradée malgré une forte activité MAPK

Dans le cas d'une stimulation par la progestérone, nous avons préalablement rapporté que les MAPK sont déphosphorylées et que les protéines Cycline B2 et p90Rsk sont dégradées environ 48 heures après la GVBD. La 1,10-PA active les MAPK suivant une cinétique plus lente que l'hormone, avec un maximum d'activité mesuré 72 heures après l'incubation des ovocytes. Les immunoempreintes de la **Figure 41A** présentent les profils de phosphorylation ou de synthèse des protéines du réseau au cours d'une cinétique réalisée suite à l'exposition des ovocytes à une concentration en 1,10-PA de 1 mM. Dans cette condition, le chelateur du zinc bloque l'activation du MPF et inhibe la synthèse de p39Mos et de Cdc6. L'analyse nous montre également que les MAPK sont actives et qu'elles phosphorylent p90Rsk. Cette dernière protéine est néanmoins dégradée après 72 heures de traitement, malgré une phosphorylation et une activité des MAPK maximale. La dégradation de p90Rsk, qui semble finalement indépendante de l'activité des MAPK, est confirmée par la détection de Ct-ΔRsk, dès 48 heures d'incubation **(Figure 41B)**.

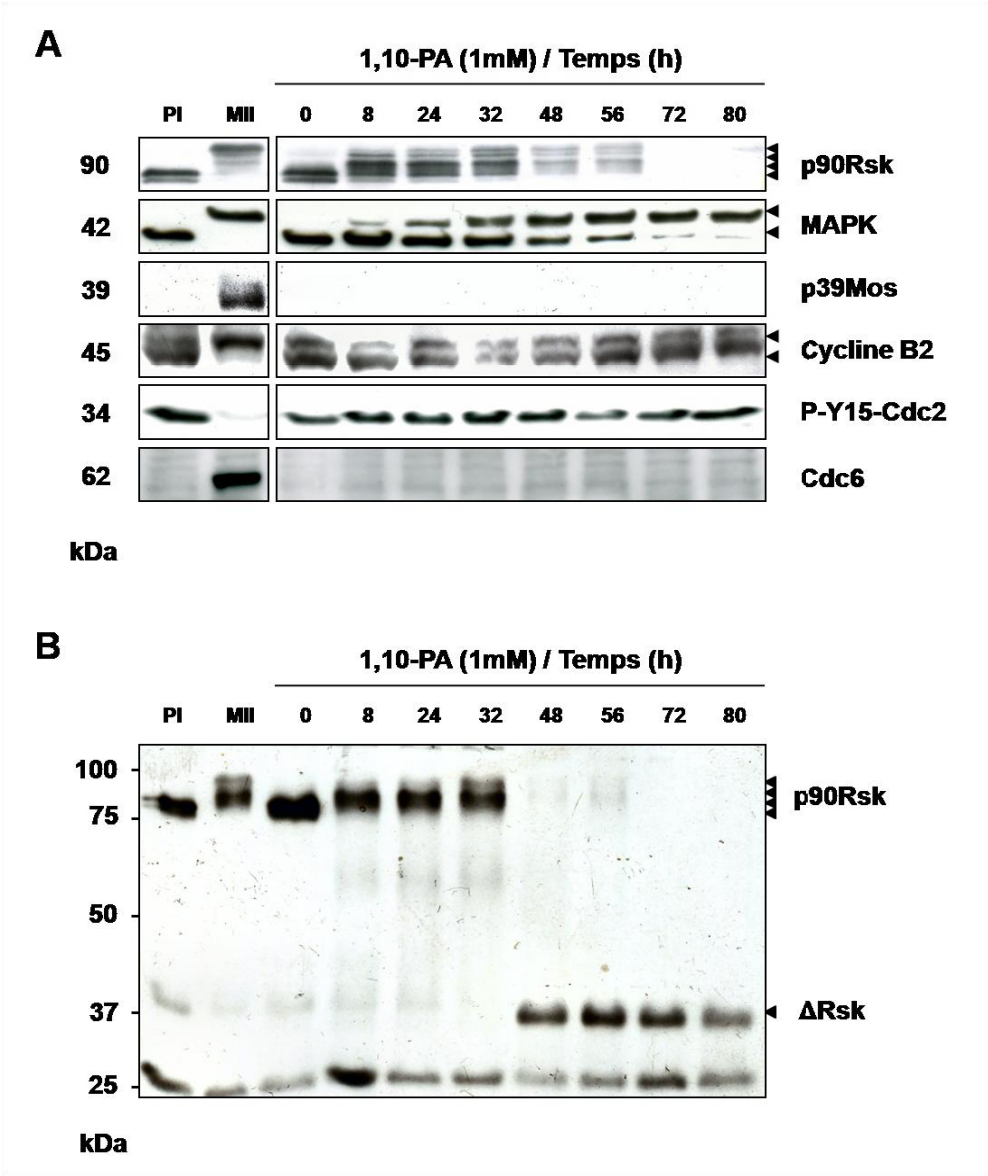


Figure 41 : p90Rsk est dégradée en condition 1,10-PA malgré une forte activité MAPK. (A) Les profils des protéines p90Rsk, MAPK, p39Mos, Cycline B2, P-Y15-Cdc2 et Cdc6 ont été analysés par western blot sur de longues périodes de culture en 1,10-PA (1 mM). **(B)** Immunodétection anti-Rsk sur membrane complète. **PI**, ovocytes immatures en prophase I et **MII**, ovocytes matures arrêtés en métaphase II après 24 heures d'incubation en progestérone.

1.3.2. Modifications morphologiques provoquées par la 1,10-PA

La 1,10-PA provoque une série de modifications morphologiques indépendantes de l'activation des MAPK (Fig. S2). Environ 48 heures après l'incubation des ovocytes, la 1,10-PA provoque l'apparition d'une tache dépigmentée dans l'hémisphère animal. Celle-ci peut être confondue avec une tache de maturation mais ne correspond pas à une GVBD. Ces modifications s'accompagnent d'une réorganisation pigmentaire et d'une fuite du nucléoplasme et du cytoplasme qui, vraisemblablement, s'accumulent entre la membrane plasmique et l'enveloppe vitelline.

Après 72 heures d'incubation, les changements morphologiques sont plus prononcés : les pigments et l'enveloppe nucléaire sont désorganisés, le nucléoplasme s'est échappé tandis que les réserves vitellines s'affaissent au pôle végétatif **(Figure 42)**. Si ce phénotype évoque une mort cellulaire, l'activité des MAPK reste élevée et la protéolyse modeste. Cette morphologie cellulaire est à corréler avec l'activation des kinases de stress, notamment JNK2 (Fig. S1). Enfin, l'ajout de zinc en solution inhibe les changements morphologiques stimulés par la 1,10-PA, sans doute par compétition avec le zinc intracellulaire.

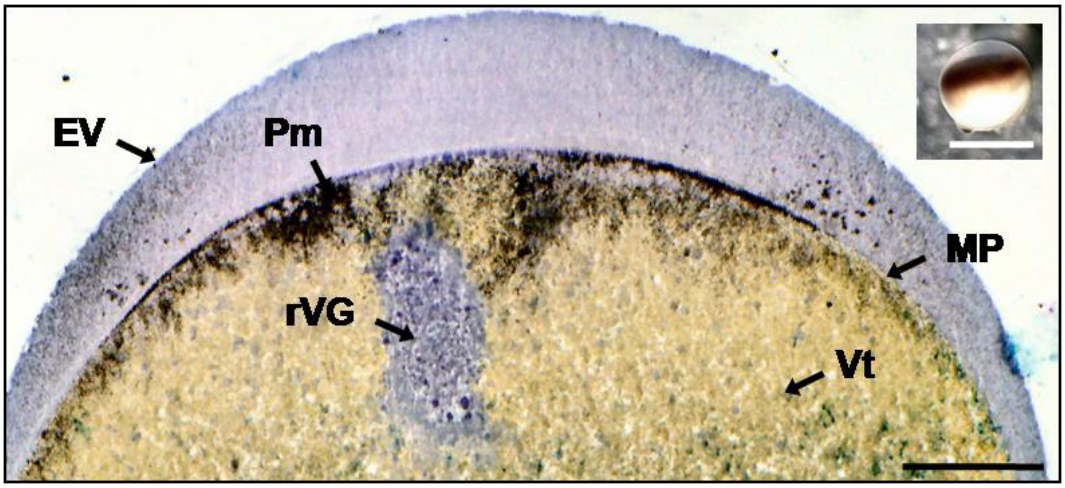


Figure 42 : Coupe histologique d'un ovocyte incubé 72 heures dans la 1,10-PA. Après 72 heures d'incubation dans la 1,10-PA (1mM), des ovocytes ont été placés dans le fixateur de Smith, puis inclus en paraffine. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été colorées par le rouge ponceau et le picroindigo-carmin qui révélent respectivement les structures nucléaires et cytoplasmiques. Une observation *in toto* de l'ovocyte est placée dans le coin haut-droit de la coupe. **EV**, enveloppe vitelline ; **Pm**, pigment ; **rVG**, reliquat de la vésicule germinative ; **MP**, membrane plasmique et **Vt**, vitellus. Barre blanche : 1,2 mm ; barre noire : 150 µm.

2. Raf1 active les MAPK selon une réponse de type graduel en absence de p39Mos

Les résultats obtenus à l'aide de la 1,10-PA montrent que les MAPK peuvent être activées indépendamment de la synthèse protéique. De manière préliminaire, nous avons évalué la capacité d'une MAP3K/Raf1 recombinante à activer les MAPK en absence de p39Mos. Une stratégie antisens a d'abord été choisie pour inhiber la synthèse de cette dernière. La **Figure 43A** correspond aux contrôles d'inhibition. Des ovocytes ont été injectés d'oligonucléotides morpholines antisens dirigés contre l'ARNm *mos* (GeneTool), puis stimulés par la progestérone. 1 ng d'oligonucléotides antisens *mos* neutralise efficacement la synthèse de la protéine, ainsi que la phosphorylation des MAPK et de p90Rsk. L'injection de 2 ng d'oligonucléotides sens n'a quant à elle pas d'effet sur les MAPK. Ce contrôle négatif nous garantie de la spécificité de l'inhibition provoquée par les antisens. Une protéine recombinante Raf1 humaine a ensuite été injectée dans les ovocytes (3 ng/ovocyte ; CellScience) en présence ou non d'oligonucléotides antisens *mos*, et la réponse des MAPK a été analysée cellule par cellule.

L'injection de Raf1 provoque la phosphorylation complète des MAPK (ovocytes 2, 3, 4, 7 ; **Figure 43B**). Ce type de réponse est caractéristique des ovocytes dans lesquelles les formes actives et inactives des MAPK ne sont jamais co-détectées : la réponse est de type tout-ou-rien **(Figure 43C)**. En condition antisens *mos*, la protéine Raf1 active les MAPK selon une réponse de type graduel (ovocytes 8, 10, 12 et 13), et p90Rsk n'est jamais phosphorylée.

Malgré l'injection, certains ovocytes n'activent jamais les MAPK (ovocytes 1, 5, 6). Dans la mesure où la protéine Raf1 surexprimée n'est pas constitutivement active, l'évantualité qu'une phosphatase déphosphoryle la MAP3K injectée et/ou MEK1 et/ou les MAPK en absence de p39Mos n'est pas exclue. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Verlhac et collaborateurs (2000) dans lesquels la microinjection d'une forme constitutivement active de Raf dans des ovocytes de souris KO pour *mos* ne permet pas d'activer les MAPK.

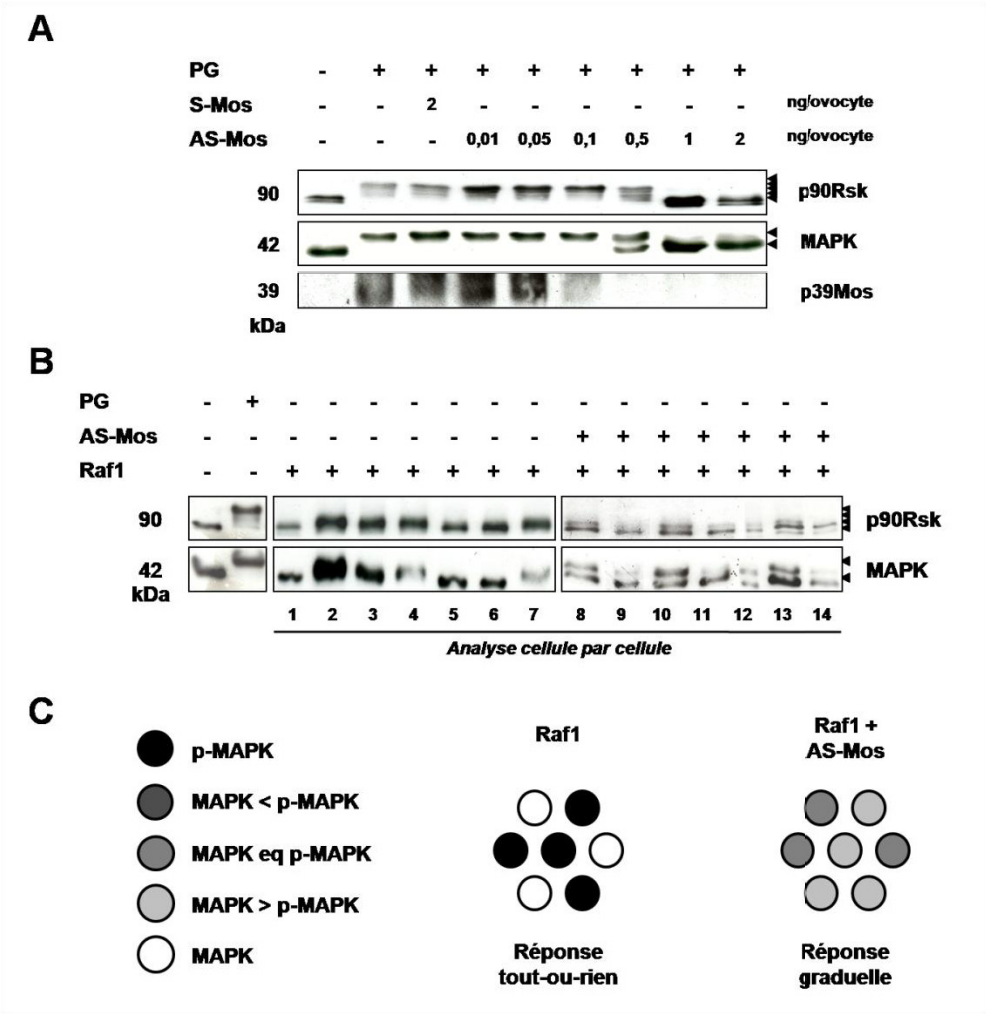


Figure 43 : Recrutement des MAPK par Raf1 en présence ou non de p39Mos. (A) Une stratégie antisens a été utilisée pour bloquer la synthèse de p39Mos et inhiber l'activation des MAPK stimulée par la progestérone. **(B)** Injection d'une protéine recombinante humaine Raf1 dans des ovocytes en présence ou non d'antisens *mos.* L'analyse par western blot a été réalisée ovocyte par ovocyte. **(C)** Réponse individuelle des ovocytes schématisée par un gradient de couleur représentatif du taux de phosphorylation des MAPK (p-MAPK). **PG**, progestérone ; **S-Mos**, sens *mos ;* **AS-Mos**, antisens *mos.*

3. Effet des inhibiteurs de phosphatases sur l'activation des MAPK

En absence de p39Mos, la 1,10-PA et Raf1 activent les MAPK selon une réponse de type graduel et dépendante de MEK. De plus, nous avons émis l'hypothèse qu'une ou plusieurs MEK-phosphatases seraient régulées négativement au cours de la reprise méiotique. Afin d'examiner la possibilité que l'inhibition spécifique de protéines phosphatases puisse activer les MAPK indépendamment de p39Mos, différents inhibiteurs ont été testés **(Tableau 9)**.

	Inhibiteur	Cibles (IC50)	Remarque
Tyr-Ppases	bpV(phen)	PTEN (38nM) ; PTP (n.d.)	Activateur des IRK par inhibition de leur déphosphorylation.
	Déphostatine	PTP (7,7µM)	/
Ser/Thr-PPases	Acide Okadaïque	PP2A (0,1-1nM) > PP1 (10-15nM) > PP2B (5µM)	/
	Acide Cantharidique	PP2A (50nM)	Inhibiteur potentiel de PP1
	Cyperméthrine	PP2B (40pM)	Ouverture potentielle des canaux calciques
	Tautomycétine	PP1 (1,6nM) > PP2A (62nM) > PP2B (≥1µM)	N'inhibe pas PP2A dans les COS-7
	NIPP-1	PP1 (1-10pM)	Substrat potentiel de PKA et de CKII

Tableau 9 : Sélection d'inhibiteurs de phosphatases. Les inhibiteurs ont été choisis selon leur spécifié pour les sérine/thréonine- ou tyrosine-phosphatases (Ser/Thr- ou Tyr-PPases). Les IC50 sont celles recommandées par Merck-Calbiochem®.

3.1. Inhibiteurs de tyrosine-phosphatases

3.1.1. bpV(phen) : potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate

Connu pour inhiber les PTP et la PTEN, le bpV(phen) est un dérivé de la 1,10-PA. À une concentration inférieure à 0,2 mM, cet inhibiteur n'active pas les MAPK, et ce même après 48 heures de traitement. Lorsqu'un volume de 100 nl de solution est injecté dans l'ovocyte, la concentration cytoplasmique de bpV(phen) équivaut à celle utilisée pour la 1,10-PA : 1 mM. Cette concentration provoque une phosphorylation des MAPK et une dépigmentation atypique du pôle animal **(Figure 44A)**. En conditions bpV(phen), le MPF n'est jamais activé et p39Mos n'est jamais synthétisée. Enfin, malgré une mort cellulaire importante (30 à 40%), l'injection d'un volume identique d'eau ne conduit pas à l'activation des MAPK.

L'utilisation d'U0126 et de CHX nous a ensuite permis de caractériser l'action du bpV(phen) sur les MAPK. La phosphorylation des MAPK provoquée par cet inhibiteur dépend de MEK et non de la synthèse protéique. Par ailleurs, l'ajout de zinc en solution a montré que le

bpV(phen) active les MAPK par un mécanisme indépendant de la chélation du zinc **(Figure 44A)**.

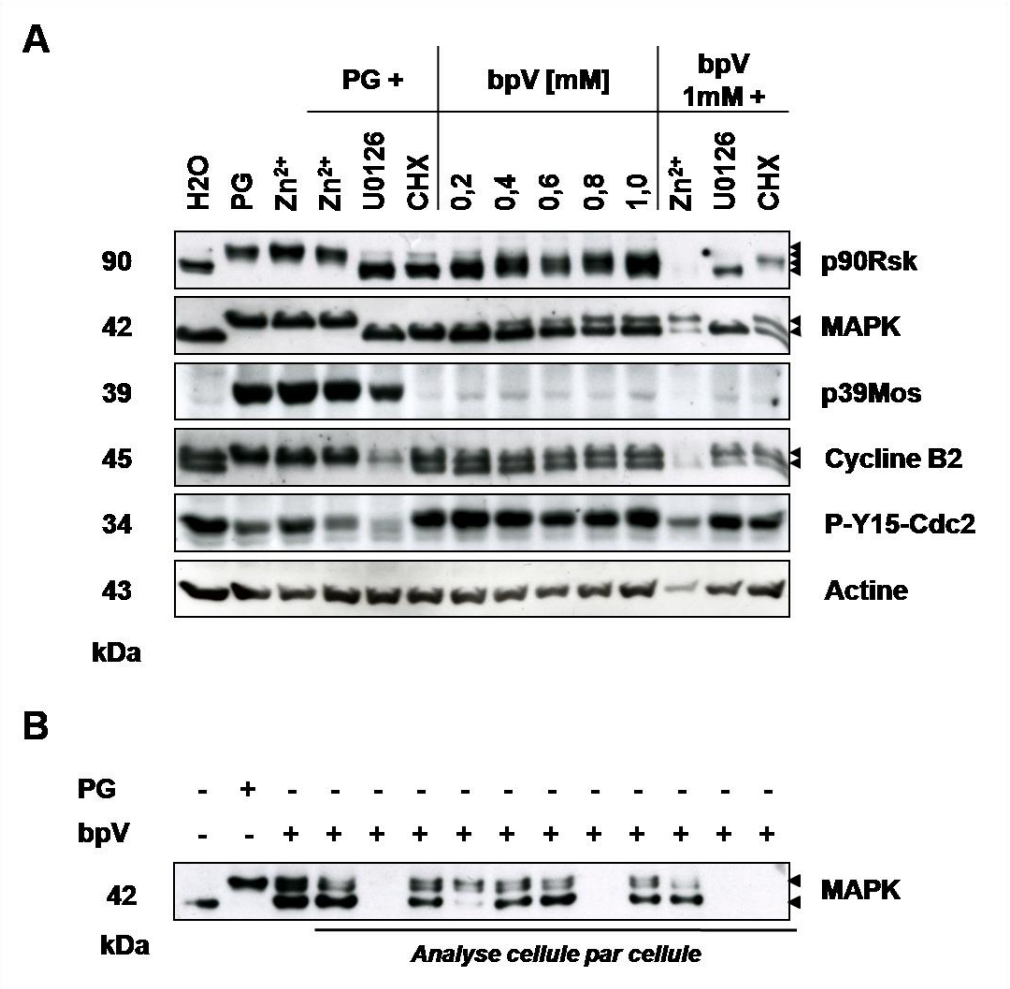


Figure 44 : Effets du bpV(phen) sur la voie MAPK. (A) Les profils des protéines p90Rsk, MAPK, p39Mos, Cycline B2, P-Y15-Cdc2 et de l'Actine ont été analysés par western blot après incubation des ovocytes dans de la progestérone ou des concentrations croissantes de bpV(phen). Différentes conditions inhibitrices ont été considérées. **(B)** Réponse des MAPK par une analyse cellule par cellule après l'injection de bpV (1 mM) dans l'ovocyte. **H2O**, injection d'eau (100nl) ; **PG**, progestérone ; **Zn^{2+}**, zinc ; **U1026**, inhibiteur de MEK ; **CHX**, cycloheximide inhibitrice de la synthèse protéique et **bpV**, bpV(phen).

Le bpV(phen) active les MAPK par l'intermédiaire de MEK1 en absence de p39Mos. Le profil de phosphorylation des MAPK stimulé par 1mM de bpV(phen) a finalement été analysé cellule par cellule **(Figure 44B)**. Quatre ovocytes présentent un taux de protéolyse très important tandis que les sept autres présentent une phosphorylation partielle des MAPK, caractéristique d'une réponse graduelle similaire à celle observée en présence de 1,10-PA. Le contexte d'activation des MAPK semble donc favorable à notre étude. Cependant, les conditions d'injections et le taux de mort cellulaire nous ont dissuadé d'utiliser le bpV(phen) sur de grandes populations d'ovocytes.

3.1.2. Déphostatine

La Déphostatine est un inhibiteur des PTP. Différentes concentrations ont été injectées dans l'ovocyte de Xénope : 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM (concentrations cellulaires finales). Aucune de ces concentrations n'a néanmoins permis d'activer les MAPK après 24 et 48 heures de traitement **(Figure 45)**.

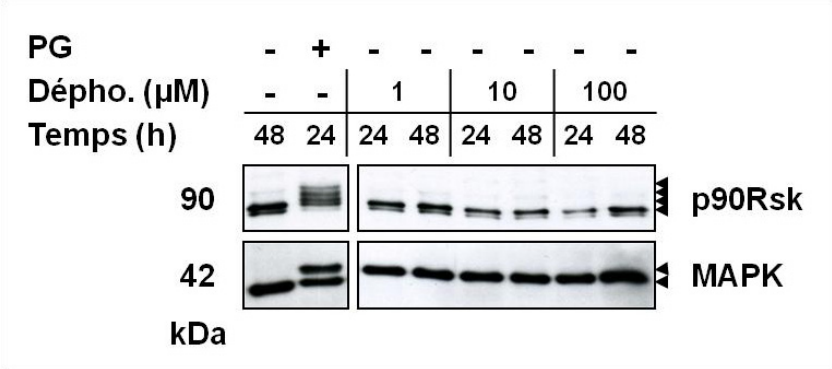


Figure 45 : Effets de la Déphostatine sur la voie MAPK. Les profils de phosphorylation des MAPK et de p90Rsk ont été analysés par western blot après l'injection de concentrations croissantes de Déphostatine (**Dépho.**). **PG**, progestérone.

Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que les concentrations utilisées sont trop faibles pour observer un effet. Cependant, il est à supposer que les phosphatases ciblées par cet inhibiteur ne jouent pas un rôle primordial dans la régulation des MAPK de l'ovocyte de Xénope.

3.2. Inhibiteurs de sérine/thréonine-phosphatases

3.2.1. Acide Okadaïque

3.2.1.1. L'OA stimule la GVBD et active les MAPK

L'Acide Okadaïque (OA) stimule la reprise méiotique ovocytaire (Felix *et al.*, 1990a ; Felix *et al.*, 1990b) et active les MAPK dans les extraits acellulaires (Kosako *et al.*, 1994a). Inhibé par des anticorps anti-MEK, son mode d'action dépend de la MAP2K/MEK.

L'injection d'OA (1µM) dans les ovocytes de Xénope suffit à activer les MAPK et p90Rsk. Dans cette condition, p39Mos est accumulée et le MPF activé **(Figure 46A)**. En présence d'antisens *mos*, l'OA provoque la phosphorylation partielle des MAPK et l'activation de p90Rsk. Lorsque la synthèse protéique (CHX) ou MEK (U0126) est inhibée, le MPF est actif bien que la phosphorylation des MAPK ne soit plus détectée. La phosphorylation des MAPK provoquée par l'OA dépend donc de MEK1, et non de l'accumulation de p39Mos.

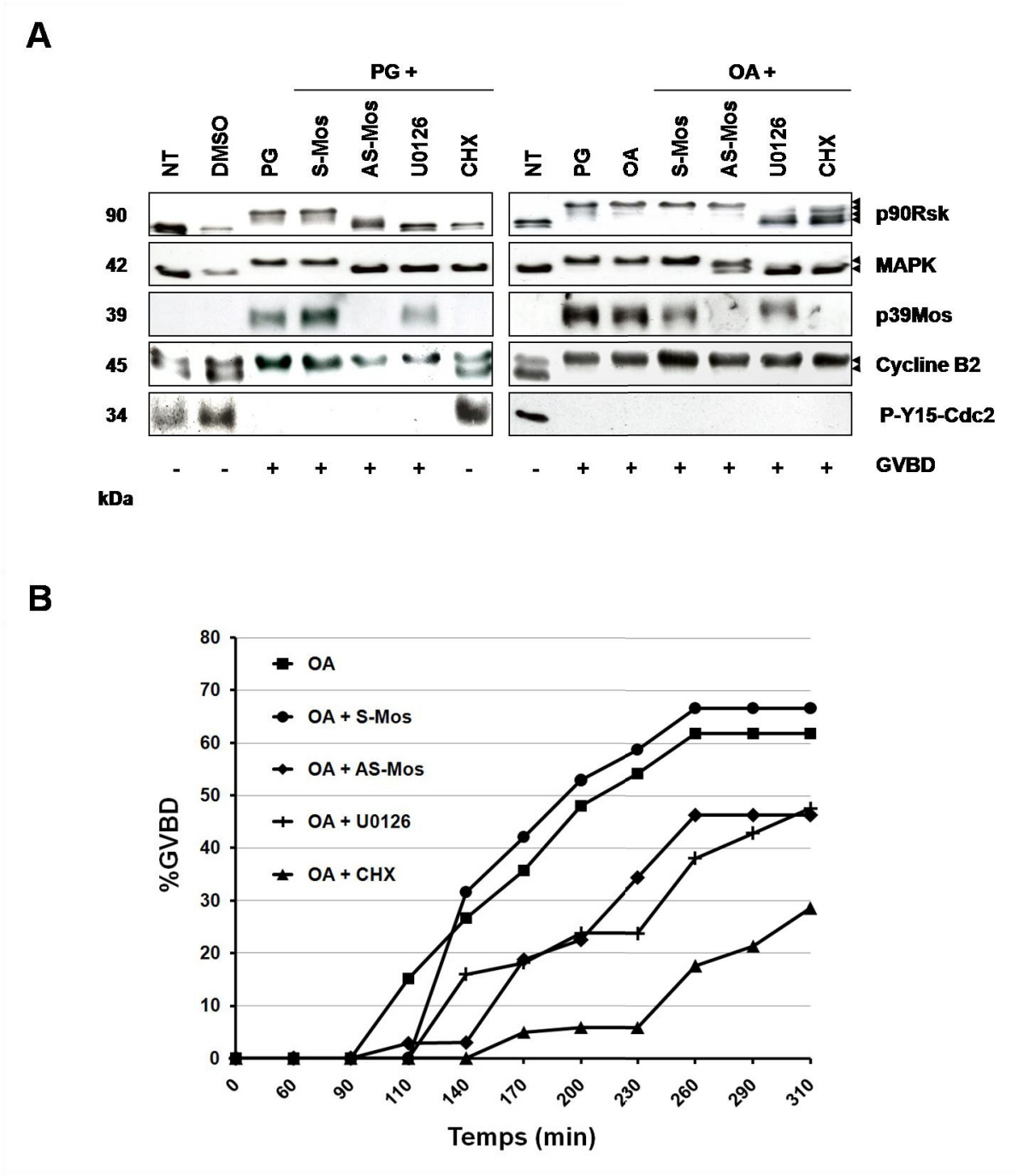


Figure 46 : Effets de l'Acide Okadaïque sur la voie MAPK et la reprise méiotique. (A) Des ovocytes ont été exposés à la progestérone ou injectés d'OA (1 µM) dans différentes conditions inhibitrices. Les profils des protéines p90Rsk, MAPK, p39Mos, Cycline B2 et P-Y15-Cdc2 ont été analysés par western blot. **(B)** Cinétique de GVBD stimulée par l'OA. **NT**, ovocytes non traités ; **DMSO**, contrôle d'injection ; **PG,** progestérone ; **S-Mos**, oligonucléotides sens *mos* ; **AS-Mos**, oligonucléotides antisens *mos* ; **U1026**, inhibiteur de MEK ; **CHX**, cycloheximide inhibitrice de la synthèse protéique et **OA**, Acide Okadaïque.

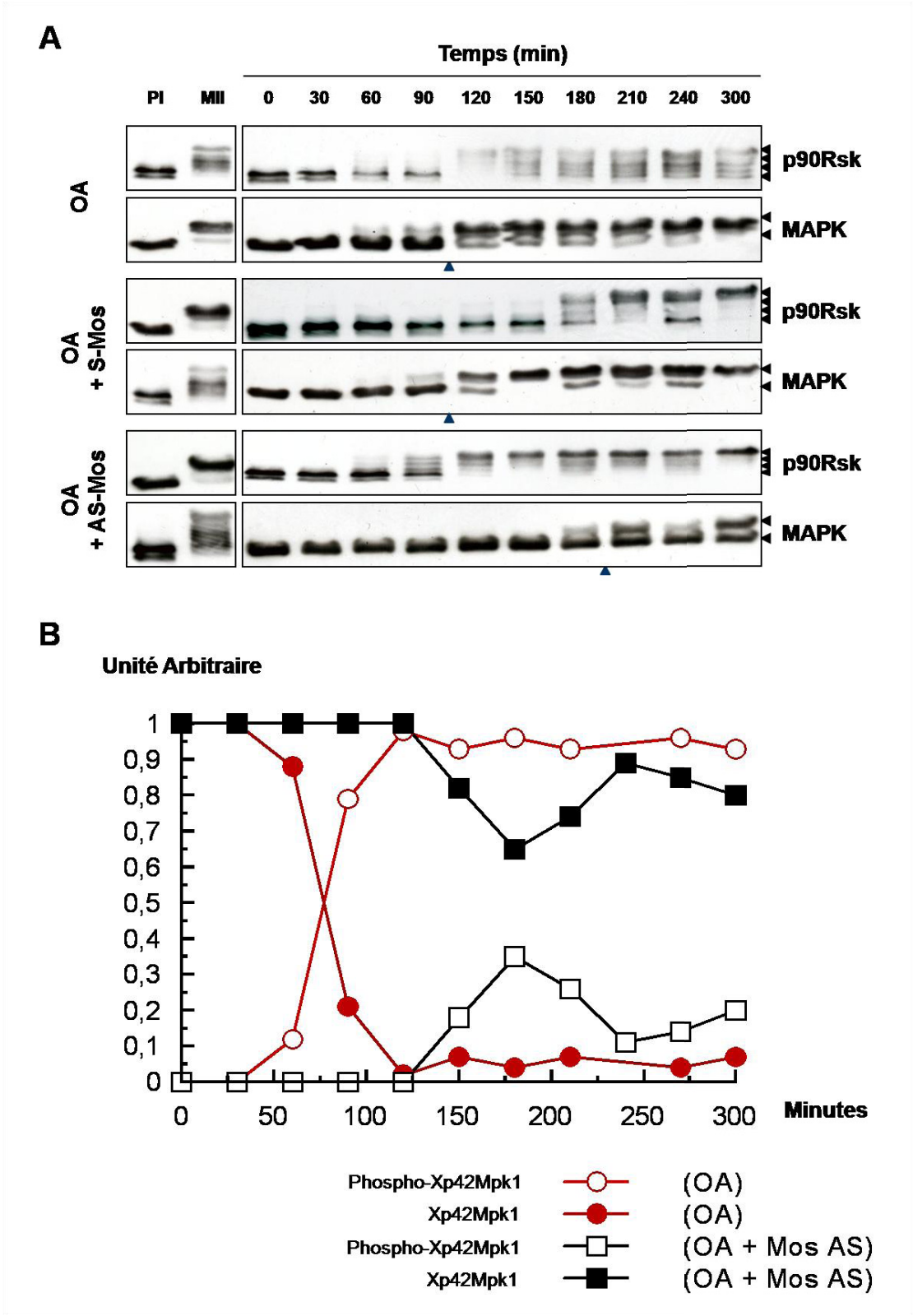


Figure 47 : Cinétique d'activation des MAPK par l'OA en absence de p39Mos. (A) Les profils des MAPK et de p90Rsk ont été analysés par western blot en conditions OA (1µM) ± oligonucléotides morpholines sens (**S-Mos**) ou antisens *mos* (**AS-Mos**). **(B)** La phosphorylation des MAPK a été semi-quantifiée et reportée au cours du temps. **PI**, ovocytes arrêtés en prophase I et **MII**, ovocytes arrêtés en métaphase II après 24 heures d'incubation en progestérone

En conditions témoins OA et OA+S-Mos, les premières GVBD sont détectées 100 minutes après l'injection de l'inhibiteur de phosphatases **(Figure 46B)**. De plus, dans ces conditions, les pourcentages finaux de reprise méiotique ne présentent pas de différences significatives, respectivement 66,7% et 61,9% de GVBD. Dans les ovocytes injectés d'oligonucléotides antisens *mos* ou incubés en U0126, les premières taches de maturation apparaissent en même temps que les ovocytes témoins. Néanmoins, les cinétiques sont plus lentes et les pourcentages finaux de GVBD sont diminués : 46,4% (OA+AS-Mos) et 47,6% (OA+U0126). Enfin, en présence de Cycloheximide, la GVBD est retardée (140ème minute) et n'est detectée que dans 28,6% des ovocytes injectés d'OA.

3.2.1.2. Les MAPK sont activées en absence de p39Mos

Les cinétiques d'activation des MAPK et de p90Rsk ont été analysées en présence ou en absence de synthèse de p39Mos. 90 à 120 minutes sont nécessaires à l'OA pour activer efficacement les MAPK. Ce temps est doublé lorsque p39Mos ne s'accumule pas **(Figure 47A)**. Les deux formes de MAPK (phosphorylées ou non) ont ensuite été semi-quantifiées **(Figure 47B)**. Si l'OA parvient à activer totalement les MAPK en condition contrôle, il est moins efficace en absence de rétroaction exercée sur la synthèse de p39Mos. Dans cette dernière condition, l'OA ne recrute que 35% des MAPK.

3.2.1.3. Rétablissement de l'activité des MAPK par l'OA

L'OA active les MAPK indépendamment de p39Mos. La capacité de cet inhibiteur de phosphatases, susceptible de restaurer l'activité des MAPK, à promouvoir la formation du fuseau de division méiotique a donc été évaluée. Des ovocytes injectés d'oligonucléotides morpholines antisens *mos* ont été stimulés avec de la progestérone, puis injectés d'OA dès l'apparition de la tache de maturation, *i.e.* au moment de la GVBD. Deux à trois heures après l'injection, les ovocytes ont été prélevés pour réaliser des analyses biochimiques et cytologiques. En condition PG+AS-Mos+OA, l'analyse par western blot révèle une activation partielle des MAPK, et totale de p90Rsk **(Figure 48A)**. Sur le plan cytologique, 100% des ovocytes témoins (PG+S-Mos) présentent un fuseau de seconde division de méiose (n = 17, 3 femelles). L'injection d'antisens *mos* et la stimulation des ovocytes par la progestérone conduisent à des aberrations de division puisqu'aucun fuseau n'est observé et que 50,3% des ovocytes traités présentent des structures de type asters simples ou doubles (n = 26, 4 femelles). En condition PG+AS-Mos+OA, la formation du fuseau de division n'est pas restaurée malgré l'activation des MAPK : 63% des ovocytes traités présentent au moins un aster (n = 41, 4 femelles ; 14,9% d'asters simples ou doubles et 48,1% d'asters supérieurs à 10 ; **Figure 48B à E**). Au cours de cette expérience, jusqu'à 25 asters ont été dénombrés dans une même cellule et l'analyse par immunofluorescence confirme que ces structures rayonnantes sont composées de β-tubuline. Toutefois, aucun chromosome condensé, associé ou non à ces asters, n'a été détecté **(Figure 48F et G)**. En cohérence avec les travaux de Bodart et collaborateurs (2005), ces observations suggèrent qu'une activité MAPK ne peut pas promouvoir à elle seule l'établissement du fuseau bipolaire de division méiotique.

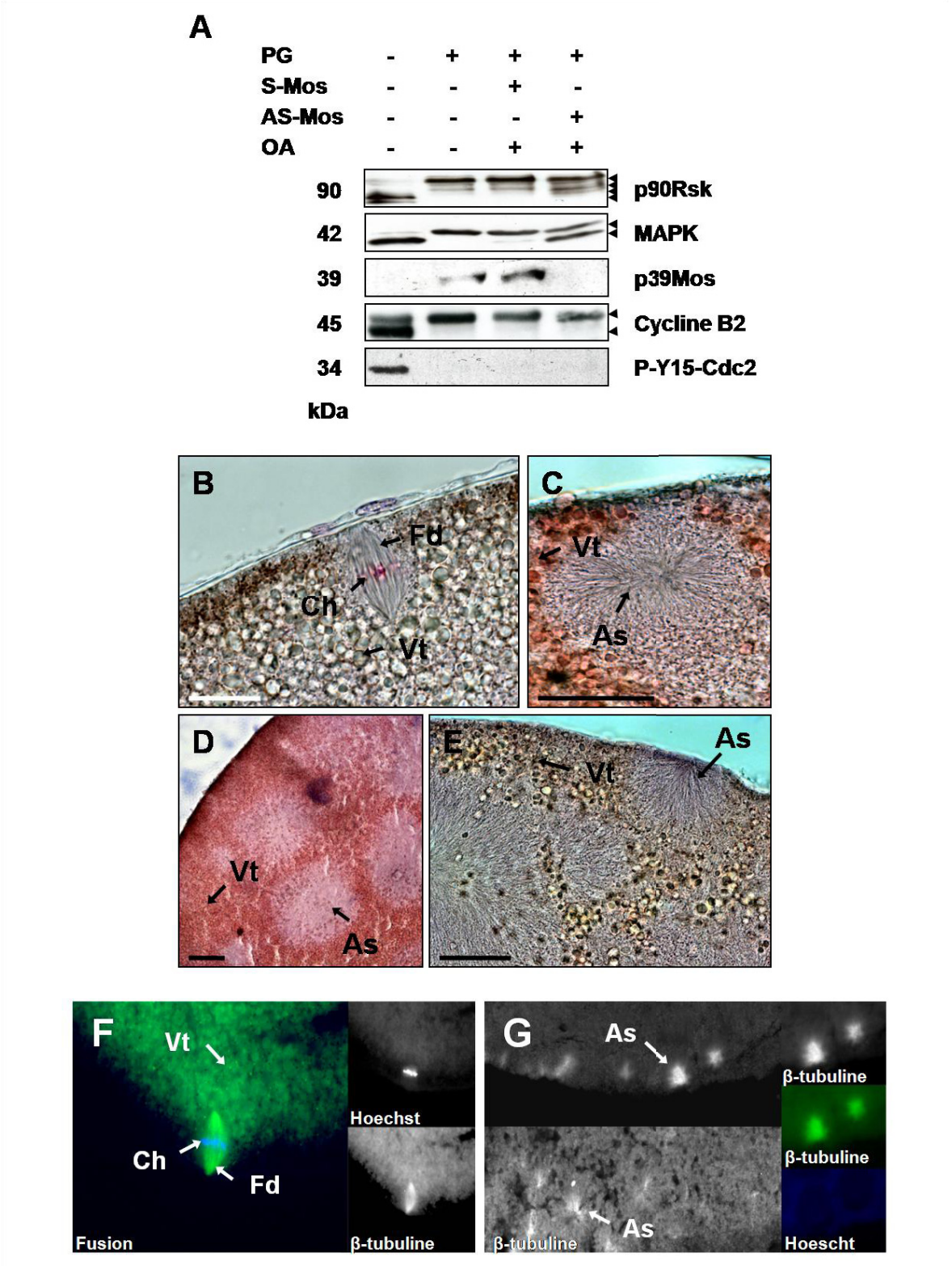


Figure 48 : l'OA restaure l'activité des MAPK en absence de p39Mos. Les ovocytes, préalablement injectés d'oligonucléotides morpholines sens (**S-Mos**) ou antisens *mos* (**AS-Mos**), ont été incubés dans de la progestérone puis injectés d'OA (1 µM). **(A)** Les profils des protéines p90Rsk, MAPK, p39Mos, Cycline B2 et P-Y15-Cdc2 ont été analysés par western blot. **(B-G)** Coupes d'ovocytes en conditions : **(B et F)** PG+S-Mos ; **(C)** PG+AS-Mos ; **(D)** PG+S-Mos+OA ; **(E et G)** PG+AS-Mos+OA. **(B à E)**, colorations classiques ; **(F et G)**, immunohistochimie. **Ch**, chromosomes sur la plaque métaphasique ; **Fd**, fuseau de division ; **Vt**, vitellus ; **As**, aster.

De manière surprenante, le même phénotype est observé en condition PG+S-Mos+OA. Il est donc possible que la restauration de l'activité des MAPK soit contrebalancée par un effet secondaire exercé par l'OA sur PP1 ou PP2A et la formation du fuseau de division. En effet, ces phosphatases régulent la dynamique des microtubules lors de la transition G2/M des extraits d'œufs de Xénope (Tournebize *et al.*, 1997). Par ailleurs, de nombreux travaux montrent que l'injection d'OA, ou l'inhibition de PP2A, conduit à des aberrations dans la morphogenèse du fuseau de division chez la Drosophile (Chen *et al.*, 2007) ou encore les cellules somatiques (HeLa : Chaudhuri *et al.*, 1997 ; CHO-K1 : Hegarat *et al.*, 2005). Enfin, si le DMSO n'affecte pas le fuseau lorsqu'il est dilué le milieu de culture (Bodart *et al.*, 2005), son injection dans la cellule peut expliquer la formation d'asters multiples (Sawin et Mitchison, 1994 ; Heald *et al.*, 1997 ; Wilde et Zheng, 1999)

3.2.2. Acide Cantharidique

3.2.2.1. Le CA provoque la phosphorylation des MAPK

L'Acide Cantharidique (CA) est un inhibiteur de PP2A. Les ovocytes ont été incubés dans des concentrations croissantes de cet inhibiteur **(Figure 49A)**.

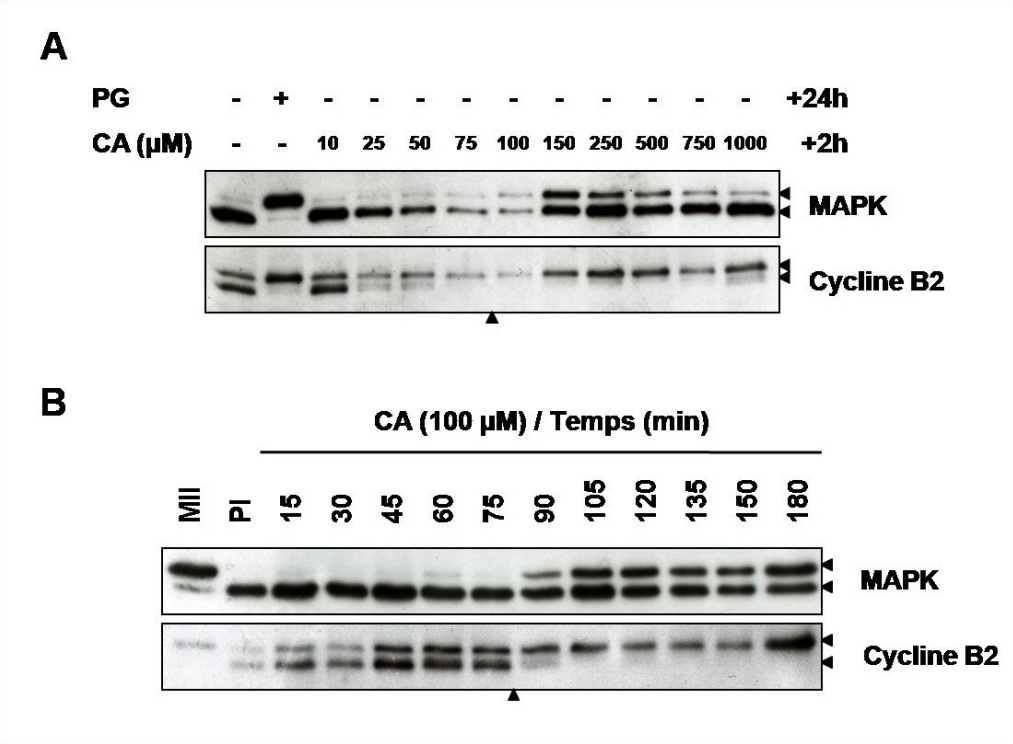


Figure 49 : Gamme de concentrations et cinétique d'activation des MAPK par l'Acide Cantharidique. Les profils de phosphorylation des MAPK et de la Cycline B2 ont été analysés par western blot **(A)** après incubation des ovocytes pendant 2 heures dans des concentrations croissantes d'Acide Cantharidique (**CA**), et **(B)** au cours d'une cinétique de CA (100µM). **PG**, progestérone ; **PI**, ovocytes immatures bloqués en prophase I ; **MII**, ovocytes matures prélevés 24 heures après stimulation par la progestérone.

Environ 2 heures après le début de l'expérience, les ovocytes placés dans des concentrations de CA supérieures à 50 µM présentent une dépigmentation généralisée du pôle animal très différente de la tache de maturation. Dès 25 µM, le CA provoque la phosphorylation de la Cycline B2 ainsi que la déphosphorylation du résidu inhibiteur tyrosine 15 de Cdc2. L'activation de la moitié de la population des MAPK est observée à partir de 100 µM de CA, tandis que de plus fortes concentrations (250 µM à 1 mM) semblent moins efficaces. La concentration 100 µM de CA a donc été retenue.

Des cinétiques de phosphorylation des MAPK et de la Cycline B2 par le CA (100 µM) ont été réalisées sur les ovocytes de 5 femelles différentes. Le temps nécessaire à l'inhibiteur de PP2A pour activer les MAPK varient d'une femelle à l'autre (début d'activation entre 90 et 120 minutes d'incubation). La phosphorylation de la Cycline B2 précède toujours celle des MAPK qui n'est jamais totale **(Figure 49B)**. Dans ce contexte, le profil de p39Mos n'a pas été étudié. Par ailleurs, au cours de ces cinétiques, une dépigmentation de l'ovocyte est observée dès la première heure de traitement. Cette dépigmentation touche 100% de la population cellulaire après 2 heures, et une lyse cellulaire massive est constatée après 3 heures d'incubation. Les propriétés toxiques du CA ne sont pas exclues puisque les tentatives d'injection de ce produit se sont soldées par de fortes pertes cellulaires.

3.2.2.2. Le CA active les MAPK en absence de p39Mos

Un analogue structurel non fonctionnel du CA, le 1,4-Dimethylendothall (DME), a été utilisé dans les mêmes gammes de concentrations que l'inhibiteur. Il ne provoque ni la phosphorylation des MAPK, ni celle de la Cyclines B2 **(Figure 50A)**.

Les propriétés d'activation des MAPK par le CA ont ensuite été analysées par l'intermédiaire d'inhibiteurs de la synthèse de p39Mos (oligonucléotides morpholines antisens *mos*), de MEK (U0126), et de la synthèse protéique (CHX). La phosphorylation des MAPK et de la Cycline B2 est inhibée en présence d'U0126 et de CHX **(Figure 50A)**. En revanche, l'inhibition de l'accumulation de p39Mos par une stratégie antisens n'interfère pas dans l'activation des MAPK par le CA. L'action de ce dernier sur la voie MAPK semble donc dépendre de l'activité des MEK et de la synthèse d'une protéine qui n'est pas p39Mos. Le rôle du zinc a également été considéré. L'ajout de zinc en solution n'empêche pas la phosphorylation des MAPK par le CA.

Il est à souligner que cet inhibiteur ne recrute pas les MAPK avec la même efficacité dans tous les ovocytes. Ceci pourrait s'expliquer par la lyse rapide des cellules suivant phosphorylation des MAPK. Ajouté à la toxicité du CA, l'hétérogénéité importante de réponse des ovocytes à ce produit fait de cet outil un mauvais activateur de la voie.

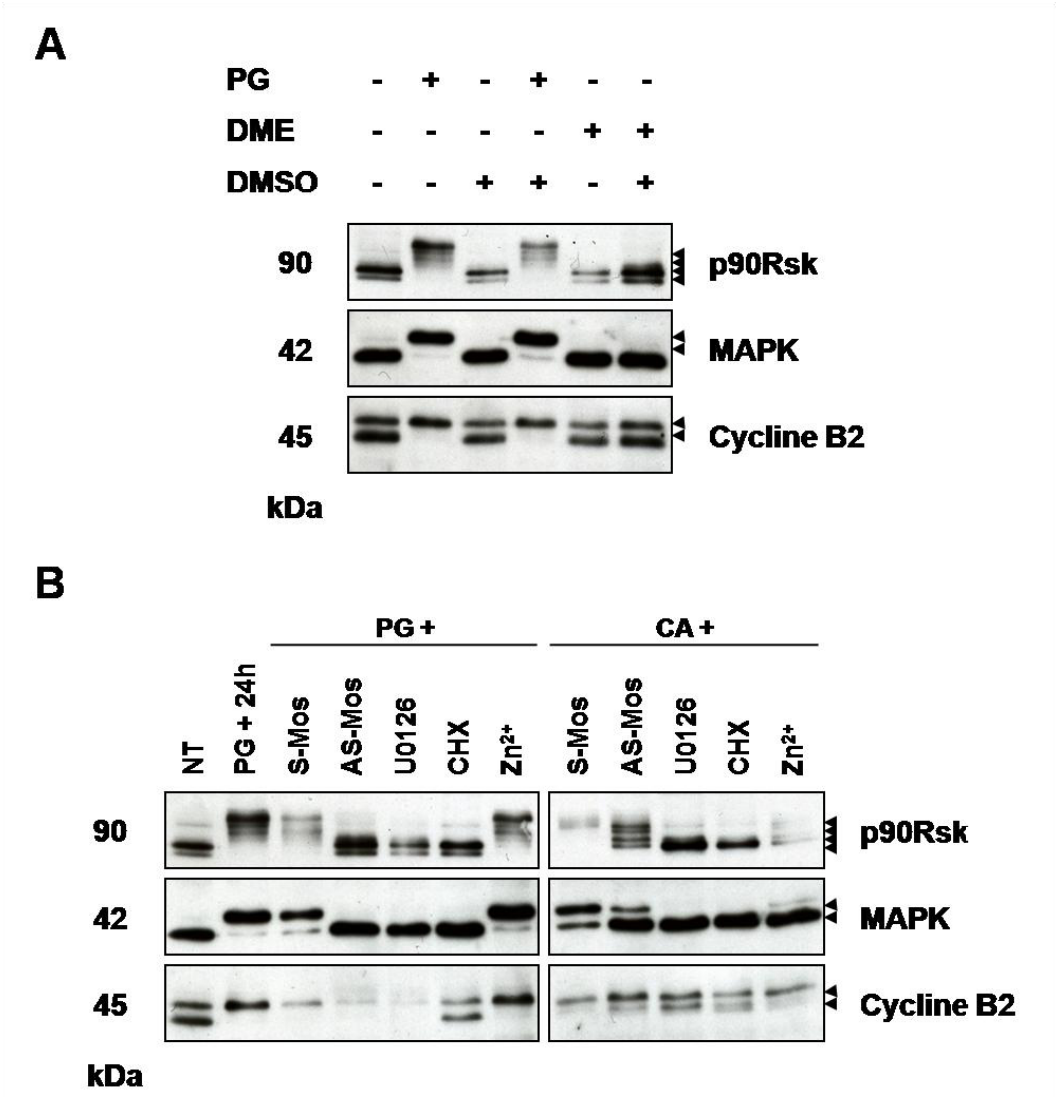


Figure 50 : Effets du CA sur la voie MAPK et le MPF. Les profils de phosphorylation de p90Rsk, des MAPK et de la Cycline B2 ont été analysés par western blot **(A)** en conditions contrôles progestérone (**PG**), 1,4-Dimethylendothall (**DME**) et/ou **DMSO** ; **(B)** après incubation des ovocytes dans de la progestérone ou de l'Acide Cantharidique (**CA**, 100 µM), puis placés dans différentes conditions inhibitrices. **NT**, ovocytes non traités ; **S-Mos**, oligonucléotides sens *mos* ; **AS-Mos**, oligonucléotides antisens *mos* ; **U1026**, inhibiteur de MEK ; **CHX**, Cycloheximide ; **Zn^{2+}**, zinc.

3.2.3. Cyperméthrine

La Cyperméthrine est un inhibiteur puissant de PP2B utilisé dans les pesticides. Différentes concentrations ont été injectées dans l'ovocyte : 5 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 2 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM et 500 nM (concentrations cytoplasmiques finales). À 500 nM, une très faible activation des MAPK et de p90Rsk a été observée **(Figure 51)**. Cette concentration est néanmoins toxique pour l'ovocyte.

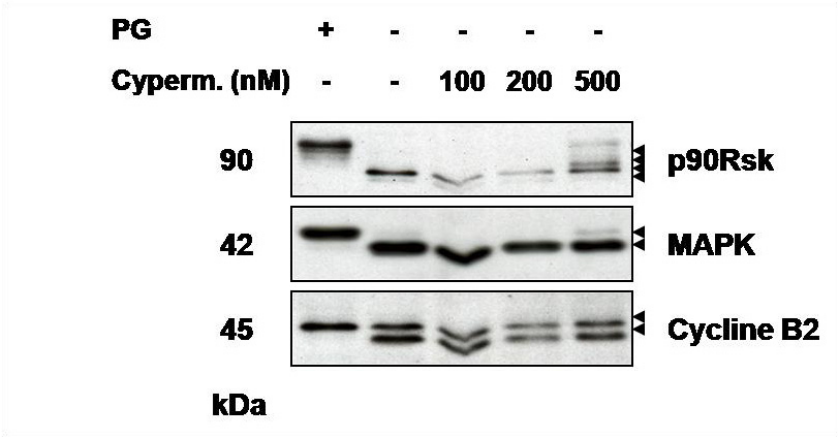


Figure 51 : Effets de la Cyperméthrine sur la voie MAPK et le MPF. Les profils de phosphorylation de p90Rsk, des MAPK et de la Cycline B2 ont été analysés par western blot suivant l'injection de concentrations croissantes de Cyperméthrine (**Cyperm.**) dans les ovocytes de Xénope. **PG**, progestérone.

3.2.4. Tautomycétine et NIPP-1

La Tautomycétine inhibe les phosphatases PP1, PP2A et PP2B. Les ovocytes ont été incubés dans des concentrations croissantes de cet inhibiteur (100 nM, 200 nM, 500 nM) ou microinjectés de celui-ci (7 nM, 25 nM, 70 nM, 50 nM, 100 nM, 700 nM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM et 4 µM ; concentrations cytoplasmiques finales). Aucune de ces concentrations n'a néanmoins permis d'activer les MAPK et p90Rsk, malgré une analyse réalisée 24 et 48 heures après l'incubation ou l'injection **(Figure 52)**.

NIPP-1 inhibe spécifiquement PP1. Cet inhibiteur a été injecté à raison de 25,8 pM, 51,6 pM et 25,8 nM mais ne provoque pas l'activation des MAPK.

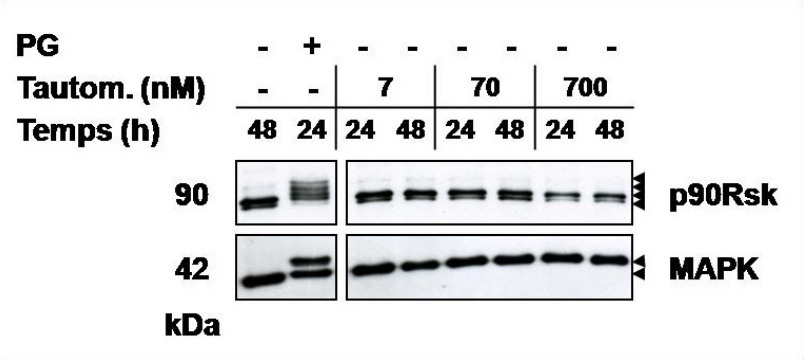


Figure 52 : Effets de la Tautomycétine sur la voie MAPK. Les profils de phosphorylation des MAPK et de p90Rsk ont été analysés par western blot après l'injection de concentrations croissantes de Tautomycetine (**Tautom.**). **PG**, progestérone.

Trois inhibiteurs nous ont finalement permis d'activer les MAPK : le bpV(phen), l'Acide Okadaïque et l'Acide Cantharidique. Les résultats relatifs à l'inhibition des phosphatases sont résumés dans le **Tableau 10.**

	Inhibiteur	Cibles	[ ]	p39Mos	P-Cycline	P-MAPK			
						/	AS-Mos	U0126	CHX
Tyr-Ppases	bpV(phen)	PTP, PTEN	1mM	-	-	<50% G	n.d.	-	<50%
	Déphostatine	PTP	/	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.
Ser/Thr-PPases	Acide Okadaïque	PP1, PP2A	1µM	+	+	100%	35%	-	-
	Acide Cantharidique	PP2A	100µM	n.d.	+	<50%	<50%	-	-
	Cyperméthrine	PP2B	500nM	n.d.	-	<5%	n.d.	n.d.	n.d.
	Tautomycétine	PP1, PP2A, PP2B	/	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.
	NIPP-1	PP1	/	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.

Tableau 10 : Activation des MAPK par inhibition des phosphatases. Ser/Thr-PPases, sérine/thréonine phosphatases ; **Tyr-PPases**, tyrosine-phosphatases ; **[ ]**, concentration optimale ; **P-Cycline**, phospho-Cycline B2 ; **P-MAPK**, phospho-MAPK ; **AS-Mos**, oligonucléotides antisens *mos* ; **U0126**, inhibiteur de MEK ; **CHX**, Cycloheximide inhibitrice de la synthèse protéique ; **G**, réponse graduelle des MAPK en cellules uniques ; **n.d.**, non déterminé.

4. Matériel et méthodes complémentaires

L'essentiel du matériel et méthodes relatif à cette seconde partie de résultats est disponible dans la publication 2. Les informations techniques non compilées dans l'article sont présentées ci-après.

4.1. Traitement des ovocytes de *Xenopus laevis*

4.1.1. Injection de Raf1

La protéine recombinante humaine Raf1 a été exprimée dans des cellules Sf9, puis solubilisée dans une solution tampon (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,25 mM DTT, 0,1 mM EGTA, 25% glycérol ; pH 7,5 ; CellSciences). 30 nl (*eq.* 3 ng/ovocyte) de Raf1 ont été injectés dans des ovocytes de Xénope arrêtés en prophase I.

4.1.2. Inhibition de la synthèse de p39Mos

Les oligonucléotides morpholines antisens *mos* (5'GGGAAGGCATTCTGTGTGACTCGC3', GeneTools, LLC) sont complémentaires des nucléotides 127 à 103 situés en région 5'UTR de l'ARNm maternel de Xénope codant p39Mos. Les oligonucléotides antisens *mos* chevauchent

les trois premiers codons ainsi que le premier nucléotide du quatrième codon des ARNm. Ils sont injectés dans les ovocytes de Xénope au moins une heure avant la stimulation par la progestérone. Des ovocytes contrôles sont systématiquement injectés d'oligonucléotides sens.

4.1.3. Inhibition des protéines phosphatases

Dilué dans le DMSO, l'Acide Okadaïque (Sigma-Aldrich) a été injecté à une concentration finale de 1 µM (10 nl/ovocyte). Le bpV(phen), la Déphostatine, l'Acide Cantharidique, le 1,4-Diméthylendothall, la Cyperméthrine, la Tautomycétine et NIPP-1 ont été solubilisés dans du DMSO ou de l'eau suivant les limites de dilution indiquées par Merck-Calbiochem®. Les concentrations finales testées par incubation ou par injection des ovocytes ont été calculées en fonction de l'IC50. Des ovocytes contrôles sont systématiquement injectés d'un volume équivalent d'eau ou de DMSO.

4.2. Immunohistochimie

Les ovocytes sont fixés par un bain de méthanol, déshydratés par des concentrations croissantes d'éthanol, puis inclus dans la paraffine. Les coupes de 7 µm d'épaisseur sont ensuite réhydratées, saturées (BSA 5% dans du PBS, 145 mM NaCl, 20 mM NaH2PO4 ; pH 7,4) puis imprégnées d'anticorps monoclonaux dirigés contre la β-tubuline (Sigma ; 1/250 dans du PBS pendant 12 heures). Après 3 rinçages par le PBS, les lames sont imprégnées d'anticorps secondaires de chèvre anti-souris couplés à l'Oregon Green (Molecular Probes ; Ex/Em : 496/524 nm). Succédant à un dernier rinçage, le montage est réalisé à l'aide d'une solution contenant un intercalant de l'ADN, l'Hoescht (80% PBS, 20% Glycérol, Hoescht 1 $\mu g.ml^{-1}$; Ex/Em : 352/461 nm).

PUBLICATION 2

(en préparation)

"Ultrasensitive MAPK/Erk activation in absence of protein synthesis in *Xenopus* oocytes." Beaujois Rémy, Riquet Franck, Cailliau Katia, Browaeys-Poly Edith, Russo Christophe, Blossey Ralf, Vicogne Dorothée, Marin Matthieu, Vilain Jean-Pierre and Bodart Jean-François

Ultrasensitive MAPK/Erk activation in absence of protein synthesis in *Xenopus* oocytes

Beaujois Rémy[1,2], Riquet Franck[1,2], Cailliau Katia[1], Browaeys-Poly Edith[1], Russo Christophe[1,2], Blossey Ralf[2], Vicogne Dorothée[2], Marin Matthieu[1], Vilain Jean-Pierre[1] and Bodart Jean-François[1,2]

[1]EA 4479, University Lille1, F59655 Villeneuve d'Ascq, France.

[2]USR 3078 CNRS, F59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Abstract: MAPK cascade in *Xenopus* oocytes exhibits an all-or-none, ultrasensitive response, which is thought to depend on a positive feedback loop. Here we describe an experimental context were 1,10-Phenanthroline slowly but strongly activates MAPK while it impairs protein synthesis in a zinc-dependent manner, abolishing any feedback loop. The induced-MAPK response was ultrasensitive. It may be suggested that regulation motif like feed forward loop built ultrasensitive response *in vivo.*

Keywords: MAPK, ultrasensitivity, feedback, protein synthesis, regulation motif

Running title: Ultrasensitive MAPK activation by 1,10 PA

INTRODUCTION

A specific *All-or-None* response for MAPK/Erk activation is observed in *Xenopus* oocytes at cell cycle G2/M transition. G2-synchronized oocytes easily enter M-phase upon stimulation of Ras-independent (progesterone) or Ras-dependent (insulin, heterologously expressed FGF-R) pathways. The MAPK response in this context contrasts with the gradual answer of the MAPK cascade to external stimuli in somatic cells. The oncoprotein Mos, being an oocyte-

expressed kinase functioned ancestrally in regulating specialization of female meiosis (Amiel et al, 2009), plays a pivotal role as the upstream activator of the MAP2K (Mitogen Activated Protein Kinase kinase)-MAPK/Erk (Extracellular Regulated Kinase) cascade in *Xenopus* oocytes (Baert et al, 2003; Dupre et al, 2002). Once accumulated, Mos activates MAP2K, which in turn phosphorylates MAPK.

Physical properties of MAPK activation in *Xenopus* oocytes are ultrasensitivity, bistability and irreversibility (Huang & Ferrell, 1996; Russo et al, 2009). Ultrasensitivity has been defined to indicate cases in which the sensitivity of a system to a signal is greater than that expected from standard hyperbolic (Michaelis-Menten) response. Sensitivity is conveniently expressed quantitatively in terms of Hill Coefficient though not considering cooperating molecules (Goldbeter & Koshland, 1982). Cascade organisation generates the steepness of Erk response in *Xenopus* oocytes. Both bistability and ultrasensitivity are attributed to the existence of positive feedback loop motifs within the network promoting Mos synthesis (Howard et al, 1999; Keady et al, 2007) or enhancing Mos stability by phosphorylation (Sheng et al, 2002), which might be achieved by MAPK (Matten et al, 1996) or by MPF (M-Phase Promoting Factor / Cdk1-Cyclin B complex) (Castro et al, 2001). Other regulation motifs, such as a feed-forward loop (Csikasz-Nagy et al., 2009), may be involved in the building of an ultrasensitive response. Feed forward loop (FFL) is a motif that appears in many transcription regulatory networks, where A activates B while A and B activate C. According to their types, FFLs act as sign-sensitive accelators, by speeding up response of the target, build transitory responses (pulsers) or act as sign-sensitive delays.

Here we tested the hypothesis that an ultrasensitive response may be generated for MAPK response in absence of feed-back loop, through other regulation motifs, and seek for experimental conditions where MAPK could be activated in absence of feed-back. To this purpose, zinc-chelator 1,10-Phenanthroline monohydrate (1,10-PA) was used, based on

earlier observations reporting this chelator of zinc being a potential activator of MAPK in *Xenopus* oocytes (Watanabe et al, 2003). Present work reports extensive characterization of the molecular mechanisms in experimental conditions leading to an ultrasensitive activation of MAPK in absence of protein synthesis.

RESULTS AND DISCUSSION

MAPK activation induced by 1,10-PA

Increasing concentrations of 1,10 PA were applied on immature oocytes. 48 hours post-incubation, 1 mM 1,10-PA activated 50% of MAPK and 2 mM drives the phosphorylation of majority of MAPK (Fig 1A). MAPK activity was assayed and kinase maximum activity was observed 72 hours post 1,10 PA addition (Fig 1B). Surprisingly, whereas the entire pool of endogenous MAPK was not recruited, activity of the kinase was even higher (3.22 (± 0.34) fold) than in progesterone (PG)-treated control oocytes in which MAPK were fully activated (Fig 1B).

1,10 PA acts through MAP2K but not MAP3K

To decipher the mechanism underlying 1,10-PA effects on MAPK several strategies were used including chelating competition (ZnSO4) and MEK inhibition (U0126) prior to PG or 1,10-PA addition (Fig 1C). Upon progesterone stimulation, both MAPK and MPF pathways were activated, according to Mos accumulation, MAPK and dephosphorylation of Cdk1 (MPF catalytic subunit) on Tyr15 (Fig 1C). M-phase entry, as attested by nuclear envelope dissolution (GVBD) was reached within 16-18 hours. In 1,10-PA treated oocytes, Mos did not accumulate and MPF components remained inactive since Tyr15 remained phosphorylated. Absence of MPF activation in this context was presumably due to Cdc25 inhibition. Indeed, Cdc25, which contributes to MPF activation through Tyr 15 dephosphorylation, has been

shown to bind to Zn^{2+} (Landrieu et al, 2004; Sun et al, 2007). The latter appeared to be required as a structural regulator for Cdc25C substrate recognition and to be critical for MPF activation at the onset of M-phase (Sun et al, 2007).

Since Mos did not accumulate, we tested also the hypothesis that MAPK activation in 1,10-PA could rely on another MAPK kinase kinase (MAP3K), Raf, but the latter was never observed to be phosphorylated in 1,10 PA treated oocytes (Fig S1). PG induced GVBD, MAPK and MPF activations were not impaired by MAP2K inhibitor U0126. Both ZnSO4 and U0126 prevented 1,10-PA-induced MAPK activation (Fig 1C), driving the conclusion that activation of MAPK induced by 1,10 PA depends upon MA2K but not MAP3K. We also observed that 1,10 PA induced typical morphological changes without clear dissolution of nuclear envelope; this phenotype was likely related to the effects of zinc-chelation rather than to MAPK activation since U0126 did not prevented occurrence of these changes (Fig S2).

mRNA expression is impaired by 1,10 PA

Absence of Mos accumulation in presence of MAPK activity was surprising, since the cascade is embedded in a positive feedback loop, but might be related to inhibitory effects of zinc chelation on protein synthesis. Therefore, the effects of 1,10-PA on protein synthesis were analysed. To this purpose, GFP-Clone4 (GFP-CL4) and chimera receptor (FGF-R) polyadenylated mRNA were used. Expressed proteins were immunoblotted and semi-quantified (Fig 2A). Prophase arrested oocytes were injected with H_2O, GFP-CL4 or FGF-R mRNA. Injected oocytes were untreated, incubated in PG, 1,10-PA or both. In absence of PG stimulation, both GFP-CL4 and FGF-R were synthesised following mRNA injection attesting for translation efficiency of polyadenylation of heterologous mRNA. As expected, CHX inhibited both GFP and FGF-R accumulation. Strong signal was observed in condition GFP-CL4 and Pg + GFP-CL4, but not in others conditions where dramatically diminished levels

were observed. Using positive control condition for standardization, fluorescence signals was quantified (Fig 2B, black bars) and reported with western blot semi-quantifications for GFP (grey bars) and FGF-R (white bars). Compared to negative control conditions, mRNAs injected cells treated or not by PG exhibited strong accumulation of probes while CHX drastically inhibited the synthesis of proteins GFP-CL4 and FGF-R. 1,10-PA treated cells exhibited low rate of protein synthesis (GFP-CL4 (Fluo) = 15.64% and 20.65% respectively). Statistically, no difference was observed between oocytes injected with GFP-CL4 mRNA treated by PG or not ($p=0.571$, GFP-CL4 (Fluo)). Indeed, when GFP-CL4-injected oocytes were treated by 1,10 PA, synthesis levels were dramatically reduced in comparison to untreated one ($p<0.001$***). 1,10-treated oocytes exhibited levels of fluorescence not statistically different from those of negative control ($p=0.571$). Protein synthesis was decreased by at least 80% in presence of 1,10-PA, in a dose-dependent manner (Fig S3). Increasing ZnSO4 concentrations were applied to 1,10 PA treated oocytes, to overcome the effects of zinc chelation (Fig 2 C,D). 0.2 mM and 0.3 mM ZnSO4 reverted 1,10-PA effects on MAPK phosphorylation and protein synthesis inhibition. In such condition, GFP-CL4 accumulated but not Mos, as expected in absence of PG stimulation. These observations correlated with immunoblot and fluorescence quantifications (Fig 2D). ZnSO4 0.2 mM and 0.3 mM restored GFP-CL4 synthesis and completely inhibited the morphological features induced by 1,10 PA occurrence while 50% of these morphological features were vanished by ZnSO4 0.1 mM. Statistical differences were noted between values from conditions ZnSO4 0.2 mM and 0.3 mM *versus* Zn^{2+} 0 mM and 0.1 mM (not shown). Thus, 1,10-PA inhibitory effects on protein synthesis relies on zinc chelation: Zinc chelation by 1,10-PA is known to prevent CPEB, a crucial enzyme in polyadenylation processes, to bind RNA and therefore to promote protein synthesis (Hake et al., 1998). CPEB inhibition may explain the absence of Mos accumulation, since its mRNA has to be unsmaked by polyadenylation to be translated.

Nevertheless, the mechanisms involving zinc and impairing the synthesis of our probes remain to be elucidated, but may involve inhibition of eIFs factors, which request zinc to initiate translation (Cheng et al, 2008; Volpon et al, 2010). One might not discard that 1,10 PA may impact protein synthesis through other metal ions sequestration.

MAPK ultrasensitive response without feedback loop

From our observation, it can be assumed that MAPK activity measured upon 1,10-PA addition arose in absence of any feedback loop since protein synthesis and MPF activity were inhibited in this experimental context. Regarding MAPK profile of partial activation in 1,10 PA-treated oocytes, two hypotheses may be considered: (i) both isoforms of MAPK (phospho-MAPK and unphospho-MAPK) are found together in individual oocytes, according to a gradual response type or (ii) isoforms are found in separate oocytes, according to the all-or-none response paradigm. Therefore, MAPK phosphorylation profile was then determined cell by cell, i.e. on N=376 isolated oocytes (B=5 females), subjected to 8 concentrations (Fig 3A). Oocytes were sorted depending their amount in phospho-MAPK (Fig 3B). At 1,10-PA 1 mM, proportion of 67% in oocytes presented medium amount of phospho-MAPK (31% to 60%); and at 2 mM, high proportion of cells (94%) exhibits high amount of phospho-MAPK (61% to 100%). 1,10-PA generated partial and graded response of MAPK. In contrast, when PG-treated oocytes were analysed individually, the two forms of MAPK were never found together in one cell, in a switch-like manner reported by Ferrell and Machleder (1998).

Amount in phospho-MAPK was averaged, fitted and merged (Fig 3C). Low concentrations of 1,10-PA (up to 0.5 mM) did not generate MAPK response. Within these conditions, no statistical difference was established with negative control (Fig 3C, area c). 1,10-PA 1 mM activated 58.3% of MAPK (± 2.6%; $p<0.001^{***b}$ *vs* others concentrations) and 2 mM led to phosphorylate 78.5% of MAPK/Erk (± 2.9% ; $p<0.001^{***a}$ *vs* others concentrations). Using

fitting, Ka = 0.869 (±0.063) and Hill coefficient was defined as n = 6.305 (±1.496) to characterise cell response (MAPK phosphorylation) in function of variable stimulation (1,10-PA concentration). This value indicated that MAPK response observed in 1,10-PA was ultrasensitive.

In 1,10-PA treated oocytes, MAPK recruitment remains gradual and partial. These observations may reinforce the crucial role of positive feed-back in the building of the all-or-none response, as previously observed (Ferrell and Machleder, 1998) (Fig 4A,B). Nevertheless, here we report that ultrasensitive response of MAPK may be driven in absence of feedback loop, through a regulation motif that remains to be deciphered. Because phosphorylation of MAPK induced by 1,10-PA relies on MAP2K activation but not upon MAP3K, it might be hypothesized that 1,10-PA affects substrate recognition of a zinc sensitive MAP2K-upstream phosphatase, whose inhibition drives the activation of MAP2K, independently of MAP3K. Similar mechanism, closely related to feed forward loop, described in mice Mos has been proposed to phosphorylate and inactivate a MAP2K-phosphatase (Verlhac et al, 2000). Theoretical approaches of cooperativity within the MAP3K-MAP2K-MAPK network underlined that a feed forward loop involving the downregulation of either a MAP2K-phosphatase (Fig 4C) or a MAPK-phosphatase would lead to an increase of the cooperativity bringing n=6 (Russo et al., 2009). From these a model for 1,10 PA action on the considered network might be proposed (Fig 4D): while abolishing the molecular actors involved in feedback loops, 1,10 PA promotes MAPK phosphorylation and activation through the down-regulation a MAP2K-phosphatase. Then, early mechanisms leading to MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes may hide a feed-forward loop motif, which contributes to the steepness and ultrasensitivity, building strength of stability of the MAPK response.

METHODS

Xenopus oocytes treatment. Oocytes were obtained as stated in supplementary information. They were incubated in ND96 medium containing 35 µM CHX (in Et-OH), 50 µM U0126 (in DMSO). These over-night incubations were performed before mRNA injection and/or incubation in PG (12 µM) and/or 1,10-PA (1 mM) and/or ZnSO4 (0,3 mM). Using syringe positive displacement digital micropipette (Nichiryo, Tokyo, Japan), mRNA microinjections were performed in the equatorial region (50-55 ng of GFP-CL4 mRNA 1 µg/µl or 60 ng of FGF-R mRNA 1 µg/µl per oocyte). Control oocytes were incubated or injected with an identical amount of DMSO (1‰) or ethanol (1‰) or water (50 to 60 nl/oocyte).

Antibodies. Antibodies used are listed in supplementary information and were used according to standard protocols.

Quantification procedures. MAPK activity was assayed following manufacturer instructions of STAR ERK1/2 Elisa Kit (Millipore). Films from (i) western blotting on population of oocytes (GFP-CL4 and FGF-R accumulation) and (ii) Oocyte by oocyte MAPK phosphorylation state analysis, were scanned and semi-quantification was realized by Optical Density (O.D.) measurement using Quantity One V4.21 1-D gel analysis software from BioRad.

Using fluorescent probe, analyse was set thanks to Nikon Eclipse 80i microscope and objective APO4x. Every oocytes of each condition were pictured individually with Photometrics® CoolSNAP™ ES^2 camera and NIS Element V2.3 imaging software. Pictures were submitted to ImageJ software analysis.

Statistical analysis and Hill coefficient determination. Representative western blot analysis is provided for each condition. Experiments were performed at least in triplicate. Fluorescence values are given as mean ± standard error of the mean (S.E.M) with N = 9, where N is the number of oocytes and B = 4, where B is the number of batches. Statistic significance was assessed using One Way ANOVA, Tukey *post hoc* and accepted as * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$) and *** ($p<0.001$).

Hill coefficient discriminates cell response in function of variable stimulation (Ferrell & Machleder, 1998). Experimental curve has been fitted using the following function: $F(x) = ((V.x^n) / (x^n + a^n)) + b$. In this function, we chose V and b to symbolise maximal (V+b) and minimal (b) values obtained in phospho-MAPK. F(x) corresponded to the MAPK occurrence in percent of phospho-MAPK ; x, to the concentration in 1,10-PA (mM) ; a, to the Ka ; n, to the Hill coefficient.

ACKNOWLEDGEMENTS

R. Beaujois was recipient of French Ministère. C. Russo was recipient of a grant from INCa (Institut National contre le Cancer).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

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

Baert F, Bodart JF, Bocquet-Muchembled B, Lescuyer-Rousseau A, Vilain JP (2003) Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated Xenopus oocytes. *J Biol Chem* **278:** 49714-49720

Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T, Labbe JC (2001) Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell* **12:** 2660-2671

Cheng S, Sultana S, Goss DJ, Gallie DR (2008) Translation initiation factor 4B homodimerization, RNA binding, and interaction with Poly(A)-binding protein are enhanced by zinc. *J Biol Chem* **283:** 36140-36153

Dupre A, Jessus C, Ozon R, Haccard O (2002) Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Embo J* **21:** 4026-4036

Ferrell JE, Jr., Machleder EM (1998) The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in Xenopus oocytes. *Science* **280:** 895-898

Goldbeter A, Koshland DE, Jr. (1982) Sensitivity amplification in biochemical systems. *Q Rev Biophys* **15:** 555-591

Hochegger H, Klotzbucher A, Kirk J, Howell M, le Guellec K, Fletcher K, Duncan T, Sohail M, Hunt T (2001) New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. *Development* **128:** 3795-3807

Howard EL, Charlesworth A, Welk J, MacNicol AM (1999) The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol* **19:** 1990-1999

Huang CY, Ferrell JE, Jr. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 10078-10083

Karaiskou A, Jessus C, Brassac T, Ozon R (1999) Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* **112 (Pt 21):** 3747-3756

Keady BT, Kuo P, Martinez SE, Yuan L, Hake LE (2007) MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in Xenopus oocytes. *J Cell Sci* **120:** 1093-1103

Landrieu I, Hassan S, Sauty M, Dewitte F, Wieruszeski JM, Inze D, De Veylder L, Lippens G (2004) Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath;CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **322:** 734-739

Masui Y, Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177:** 129-145

Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude GF (1996) Positive feedback between MAP kinase and Mos during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol* **179:** 485-492

Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270:** 86-90

Ruiz EJ, Hunt T, Nebreda AR (2008) Meiotic inactivation of Xenopus Myt1 by CDK/XRINGO, but not CDK/cyclin, via site-specific phosphorylation. *Mol Cell* **32:** 210-220

Russo C, Beaujois R, Bodart J-F, Blossey R (2009) Kicked by Mos and tuned by MPF—the initiation of the MAPK cascade in Xenopus oocytes. *HFSP Journal* **3**:428-440

Russo C, Giuraniuc C, Blossey R and Bodart JF (2009) On the equilibria of the MAPK cascade: Cooperativity, modularity and bistability. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. **388(24)**: 5070-5080.

Sheng J, Kumagai A, Dunphy WG, Varshavsky A (2002) Dissection of c-MOS degron. *Embo J* **21:** 6061-6071

Sun L, Chai Y, Hannigan R, Bhogaraju VK, Machaca K (2007) Zinc regulates the ability of Cdc25C to activate MPF/cdk1. *J Cell Physiol* **213:** 98-104

Verlhac MH, Lefebvre C, Kubiak JZ, Umbhauer M, Rassinier P, Colledge W, Maro B (2000) Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J* **19:** 6065-6074

Volpon L, Osborne MJ, Capul AA, de la Torre JC, Borden KL (2010) Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 5441-5446

Wasserman WJ, Masui Y (1975) Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic naturation in Xenopus oocytes. *Exp Cell Res* **91:** 381-388

Watanabe K, Tokumoto T, Ishikawa K (2003) 1,10-Phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in Xenopus oocytes. *Cell Signal* **15:** 1139-1147

FIGURE LEGENDS

Fig 1: MAPK activation induced by 1,10-PA. 1,10-PA increasing concentrations were applied and MAPK/Erk phosphorylation profile was examined (A) and assayed for 1 mM (B). Values were compared to control oocytes (PG+24 h, dotted line). Statistical difference was observed between MAPK activity 32h *vs* 72h (p=0,044* 32h *vs* 72h). (C) MAPK, Mos, Cdk1 were analysed following treatment Zn^{2+} (ZnSO4, competitor) or U0126 (MAP2K) in cells either stimulated by PG or 1,10-PA. Patterns were correlated to M-Phase entry.

Fig 2: 1,10-PA dramatically inhibit protein synthesis in spite of MAPK strong activity. Protein synthesis was considered by western blotting and fluorescence microscopy by fluorescence detection at animal cortex where pigmentation overcomes platelets auto-fluorescence (A) following H_20 or polyadenylated mRNA (GFP-CL4 and FGF-R) injections, and upon PG or 1,10-PA treatment. CHX was used as negative control. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE for MAPK, CyclinB2, Cdk1 phosphorylation states and Mos, GFP-CL4 and FGF-R accumulation profiles. (B) Plasma membrane fluorescence quantification (black bars), GFP-CL4 (grey bars) and FGF-R (white bars) semi-quantifications from immunoblot were reported in graph and submitted to statistical assay. Increasing in ZnSO4 were appended on 1,10-PA treated oocytes (C-D) GFP-CL4 probe accumulation was evaluated quantified by microscopy (black bars) and immunoblot (grey bars) correlatively to cell responses: GVBD and typical morphological features induced by zinc chelation. Arbitrary Units (A.U.) were used to report protein synthesis.

Fig 3: Cell by cell analysis discriminates MAPK/Erk ultrasensitive response in absence of feedback. MAPK phosphorylation profile was analyzed in 376 individual cells, subjected to increasing concentrations of 1,10 PA (A). (B) Proportion of oocytes was sorted depending on the percentage in Phospho-MAPK (MAPK-P). In graph, N represents the number of analysed cells for each concentration in 1,10-PA for which P-MAPK percentages were finally been averaged and traced (C). No statistical differences were observed between values from area c while high significant differences were noticed between value a (***) *versus* value b (***) *versus* values from area c. Experimental curve was fitted and merged to determine hill coefficient (n) linking 1,10-PA and MAPK.

Fig 4: MAP3K-MAPK-MPF network in a simplified diagram model. Nomenclature is as follows: X, unstable inactive Mos; Xa, unstable active Mos; Xas, stable active Mos (Russo et al., 2009); Y1,2,3 MAP2K increasing phosphorylation status and likewise Z1,2,3 for MAPK. P stands for MAP2K-phosphatase, whose identity remains undefined and Dm for degradation machinery. In absence of hormonal stimulation, injection of Mos/Xa (black sphere) induces typical MAPK/Y3 All-or-None response exhibiting a Hill coefficient n=35 while this response is dramatically less sensitive (n=3) when Mos/Xa is injected in presence of CHX (B) (Ferrell and Machleder, 1998), which breaks direct and indirect feedback from MAPK/Y3 to Mos/Xa (dashed lines). In silico (C), inhibition of P by Mos is predicted to increase n up to 6 (Russo et al., 2009). Here we propose a model (D) where 1,10 PA (i) breaks all routes for feedback by preventing both accumulation of Mos/Xa and MPF activation but (ii) promotes ultrasensitive MAPK/Y3 response (n=6.35) through P inhibition.

FIGURES

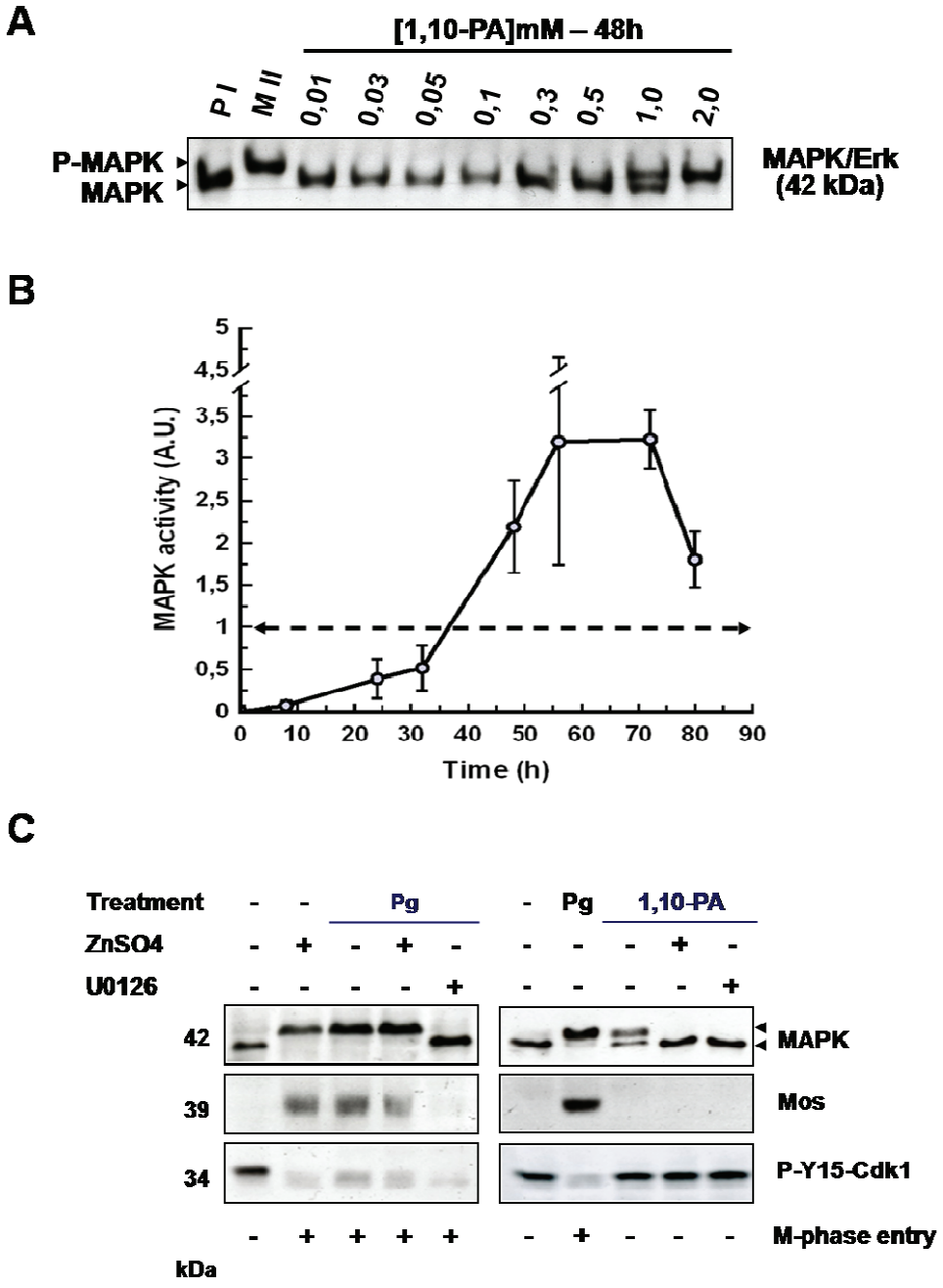


Fig 1: MAPK activation induced by 1,10-PA.

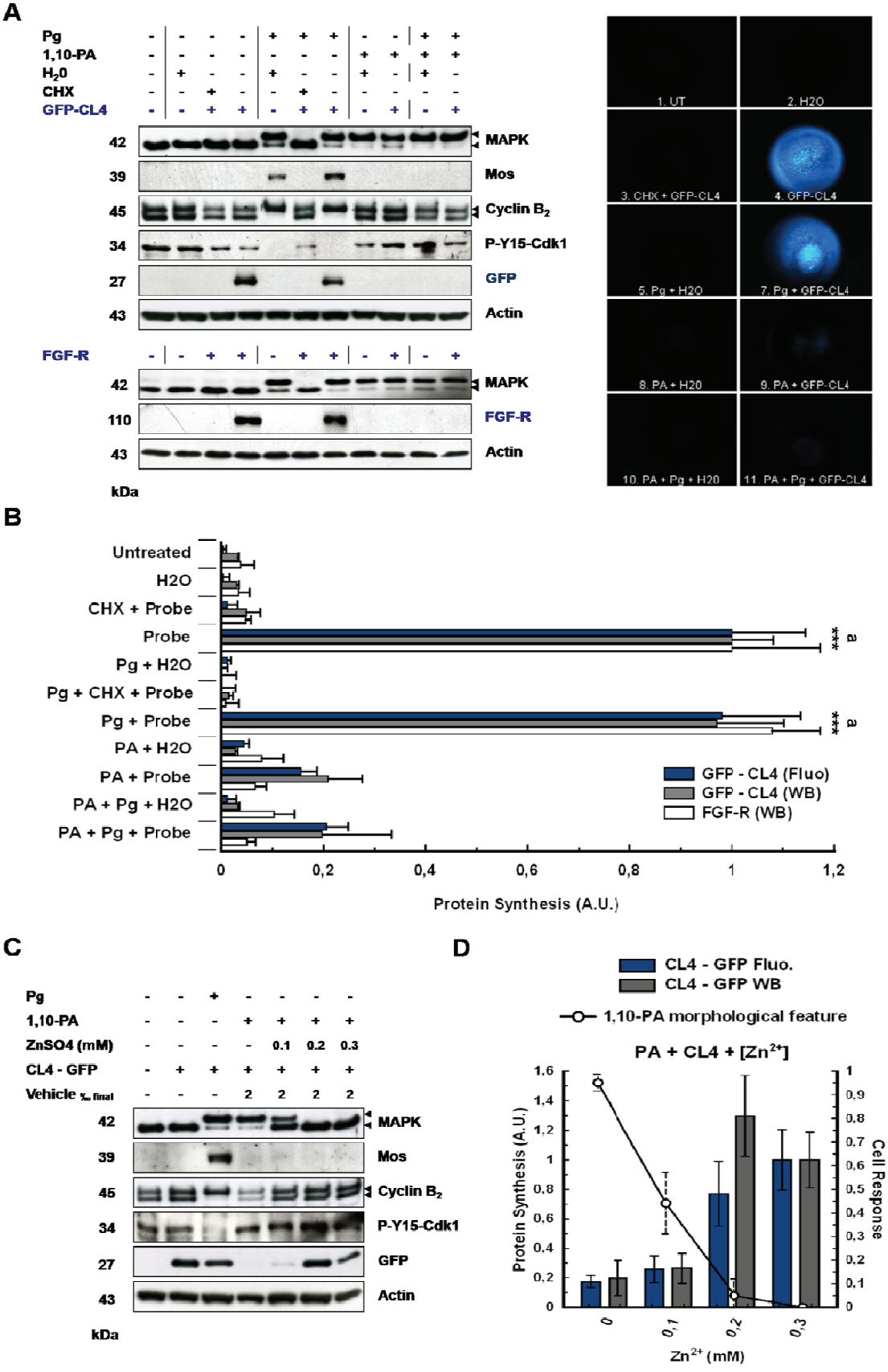


Fig 2: 1,10-PA dramatically inhibit protein synthesis in spite of MAPK strong activity.

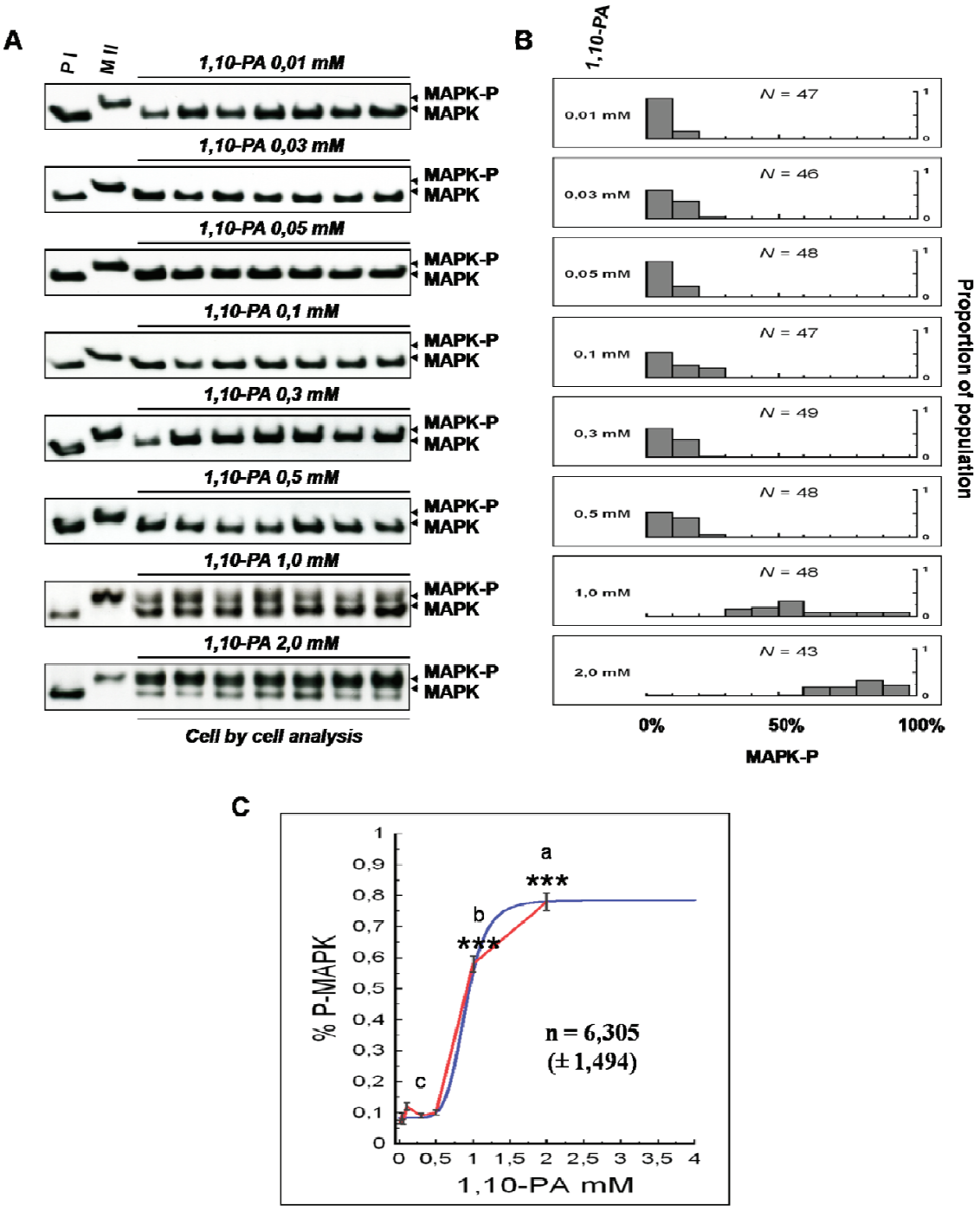


Fig 3: Cell by cell analysis discriminates MAPK/Erk ultrasensitive response in absence of feedback.

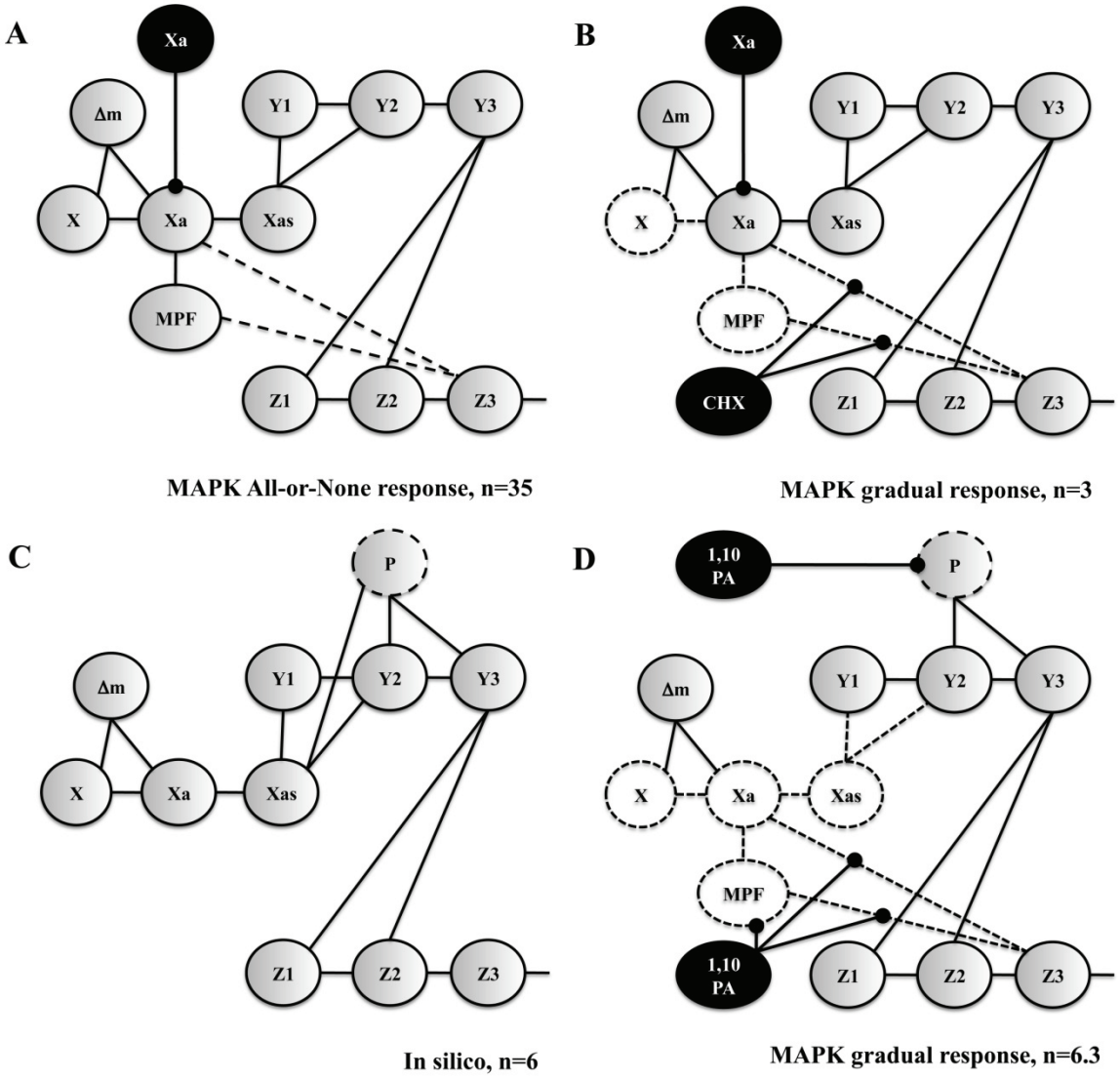


Fig 4: MAP3K-MAPK-MPF network in a simplified diagram model.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Chemicals and bioreagents. Collagenase A and proteases inhibitors were purchased from Roche Applied Science. Mouse monoclonal anti-Erk2 (D-2) and rabbit polyclonal anti-Mos^{xe} (C-237), anti-Raf (C-20) and anti-Actin (I-19) antibodies were from Santa Cruz Biotechnologies. Mouse monoclonal anti-GFP was from Roche Applied Science, mouse monoclonal anti-PDGF-Rβ was from BD Transduction Laboratories^{TM}, rabbit polyclonal anti-phospho-Tyr15-Cdc2 antibody was from Cell Signaling Technology^{TM} and rabbit polyclonal anti-active JNK pAb and anti-phosphoMEK1/2 (pSer218/222) antibodies were purchased from Promega and Merck-Calbiochem, respectively. Rabbit polyclonal anti-CyclinB2 (JG103) is a gift from Dr. J. Gannon (ICRF, South Mimms, United Kingdom). Tricaine methane sulfonate, progesterone (Pg), 1,10-phenanthroline monohydrate (1,10-PA), zinc sulphate (ZnSO4), protein synthesis inhibitor Cycloheximide (CHX), and MEK inhibitor U0126 ethanolate and Bovine serum albumin were from Sigma. MAPKinase (ERK1/2) activity assay kit was purchased from Millipore™. ECL and hyperfilms from GE Healthcare Life Sciences were used for western blotting.

Handling of oocytes. Adult *Xenopus* females were purchased at University of Rennes I (France). After anesthetizing *Xenopus* females by immersion in 1 g.l^{-1} MS222 solution (tricaine methane sulfonate), ovarian lobes were surgically removed and kept physiological in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, 5 mM HEPES-NaOH, pH7.5). Fully-grown stage VI oocytes were isolated and follicle cells were removed by a collagenase treatment for 30 min (1 mg.ml^{-1} collagenase A) followed by a manual microdissection using forceps. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until use.

Plasmid constructs and in vitro transcriptions. Regarding GFP-Clone4 probe (GFP-CL4), construction of the pCS2-memb-eGFP plasmid as initially described in Larson and colleagues (2005), was achieved using the pCS2-memb-mCherry (Zhong et al, 2006) by swapping fluorescent proteins coding sequences, mCherry for eGFP. The eGFP coding sequence fragment was derived from the pEGFP-1 (Clontech). Plasmid were propagated in XL1 blue (Stratagene) and checked by sequencing. mRNAs encoding the memb-EGFP were transcribed *in vitro* using mMessage mMachine Sp6 kit (Ambion) according to manufacturer's recommendations. Briefly, 1 µg of Not I digested pCS2-memb-eGFP template was incubated in the reaction mixture at 37°C for 2 hours followed by a 15' treatment with DNAse I. Transcripts were subsequently cleaned using spin column (Chroma Spin-100, Clontech). Quality of RNA preparations were assessed onto agarose gel and concentrations were determined by spectrophotometry using a NanoDrop (ND-1000, Agilent Technologies). As described in Caillau et al., 2003, FGF-R probe is a chimera composed of the extracellular domain of the human PDGF-Rβ and the intracellular domain of the *P. waltlii* FGF-R1 (gift from Dr. D.L. Shi). Linearised from full-length cDNAs inserted into vector pSP64T (Riou et al, 1996; Shi et al, 1992), capped mRNAs encoding the chimera were transcribed as specified for GFP-CL4.

Stimulation and analysis of G2/M transition (meiotic resumption). M-phase entry was induced by incubating G2-arrested oocytes in ND96 medium containing 12 µM of progesterone. All experiments were performed at 19°C. Kinetic of Germinal Vesicle Breakdown (GVBD) was scored by the appearance of a white spot (WS) at the animal pole of the cell attesting of the M-phase entry. For each point of kinetics, batches of ten oocytes representative for GVBD percentage were frozen at -20°C for later biochemical analysis.

Oocytes lysis and preparation of protein samples Oocytes were lysed at 4°C in homogenization buffer (60 mM 2-β glycerophosphate, 15 mM paranitrophenylphosphate, 25 mM MOPS, 15 mM EDTA, 15 mM MgCl2, 2 mM DTT, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 1mM phenylphosphate, and proteases inhibitors, pH7.2) (Flament et al., 1996) and centrifuged at 10 000 g for 15 min (4°C) to eliminate yolk and membranous pellet (Azzi et al, 1994). For detection of chimera receptor probe (PDGFR-FGFR1), oocytes were homogenised, centrifuged and the membrane fraction was solubilised in buffer added with Triton X100 1%, at 4°C. Before heating (100°C, 5 min), lysates were centrifugated at 10 000 g for 15 min (4°C) and liquid fraction were finally mixed with one volume of Leammli sample buffer containing 4% β-mercaptoethanol (Biorad).

SDS-PAGE and Western Blotting. Proteins were run on a 12,5% SDS-PAGE for Mos, P-Tyr15-Cdc2, GFP probe, Actin, P-MEK1/2(pSer218/222) and P-JNK1/2 detections, on a 7.5% modified SDS-PAGE for PDGFR-FGFR1 probe detection, or on a 15% modified SDS-PAGE for MAPK/Erk2, CyclinB2 and Raf. As described in Chesnel et al., 1997, modified polymerisation allows a better discrimination between the active and the inactive forms of these proteins. The equivalent of third oocyte was loaded per lane and electroblotted onto nitrocellulose sheet. While the quantity of proteins remains rather constant in *Xenopus* oocytes, transfer efficiency and equal loading were checked using Ponceau red staining and Actin western blots. Membranes were saturated with 5% (w/v) non-fat milk or 10 % bovine serum albumin (w/v) in TBS (Tris-buffered saline)-Tween (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween20, pH7.4) for 45 min. Rabbit polyclonal anti-Mos^{xe} (1:500), anti-phospho-Tyr15-Cdc2 (1:5000), anti-MEK (1:500), anti-Raf (1:500), anti-Active JNK pAb (1:5000), anti-Actin (1:500) and Mouse monoclonal anti-PDGF-Rβ (1/5000) primary antibodies were incubated over-night at 4°C. Mouse monoclonal anti-Erk2 (1:500) and anti-GFP (1:500),

rabbit polyclonal and anti-Cyclin B2 (1:1250) antibodies were incubated 2 hours at room temperature. Then membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween and incubated 1 hour with either an anti-mouse (IgG or IgM) horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit IgG at a dilution of 1:2500. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence on hyperfilms. Classical ECL was used to enhance luminescence, excepted for PDGF-Rβ antibodies (ECL Advance Western Blotting Detection Kit from GE Healthcare)

Histological analysis. Oocytes were fixed overnight in Smith's fixative (10% formalin, 2.5% acetic acid, 0,5% $K_2Cr_20_7$), dehydrated, and embedded in paraffin for cytological studies. 7 µm sections were stained with nuclear red for detection of nuclei and chromosomes, whereas picroindigo-carmine was used to reveal cytoplasmic and microtubular structures. This method is precise enough to detect spindles and condensed chromosomes, even if not located near the plasma membrane. (Flament et al, 1996).

Data processing. To quantify GFP, PDGFR-FGFR1, MAPK and phospho-MAPK in Western Blot, similar rectangular areas were first made to surround each band of blots. Then 'Volume Intensity' was quantified for every plot, corresponding to the intensity data (probe O.D.) inside a defined boundary drawn on our image. Local Background was distinguished and defined as the intensity of the non-data background pixels included in your volume quantification after area drawing. Data treatment was multi-step : (i) Local Background was subtracted from Volume Intensity for each plot, (ii) global gel background was subtracted from every volume intensities (usually O.D. from untreated oocytes sample), (iii) normalization was done (GFP or FGF-R O.D. = 1) relatively to standardized positive control

sample (*i.e.* GFP-CL4 or FGF-R mRNA injected control oocytes). Concerning MAPK/Erk phosphorylation state, percentage of phospho-MAPK was determined in every cell. For each plot, we only subtracted Local Background from Volume Intensity before to apply: % p-MAPK = p-MAPK / (MAPK + p-MAPK).

Fluorescence quantification was standardized and strictly performed on animal cortex where pigmentation highly diminishes cell auto-fluorescence. For each measure, dish background was subtracted to the oocyte fluorescence intensity, and background depleted values were averaged into conditions. We achieved data normalization relatively to positive control sample (GFP-CL4 Fluo = 1).

Théoretical estimation of Hill coefficient is determined by the mean of Gnuplot software. The latter own a fitting command based on the nonlinear least-squares Marquardt-Levenberg algorithm to infer the parameters values. The process consists at three mains steps: 1) describe a user-defined analytical function with undetermined parameters; 2) provide this function to the fit command and 3) choose the variable parameters of interest. The output of this command give information about the value of the desired parameter, its standard deviation error and a confidence interval.

SUPPLEMENTARY FIGURES

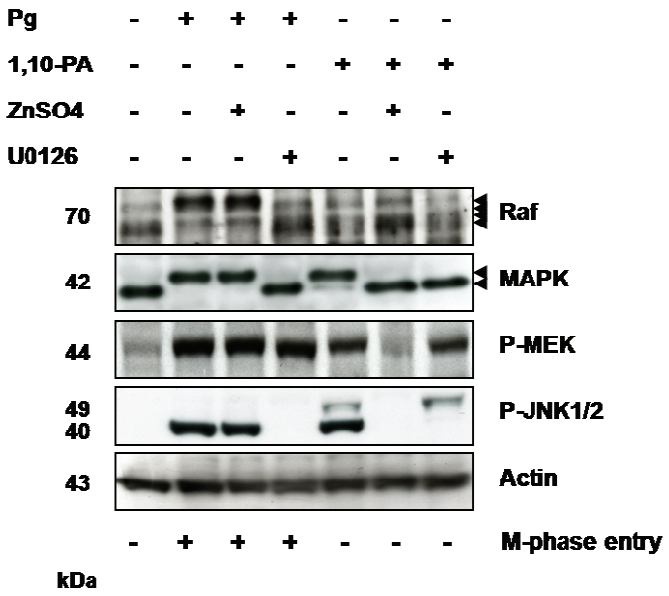


Figure S1, **MAPK activation does not account for Raf recruitment by 1,10 PA.** 1,10-PA treatment never led to Raf phosphorylation even if MEK and JNK were phosphorylated. 1,10-PA drived p40JNK1 phosphorylation was inhibited through inhibition of MEK activity by U0126 (Baert et al, 2003) while stress related p49JNK2 phosphorylation was not.

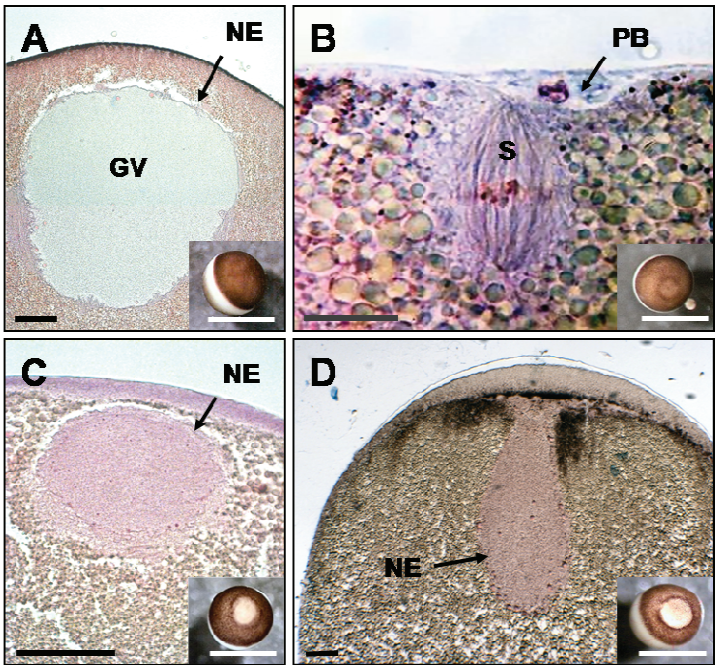


Figure S2, **Morphological changes induced by 1,10 PA.** Histological sections were performed. Oocyte maturation is characterized by the dissolution of nuclear envelope (Germinal Vesicle BreakDown / GVBD), condensation of chromosomes and formation of bipolar spindle at the plasma membrane. Prophase I oocytes exhibited intact germinal vesicle while metaphase II spindle were observed in PG-treated oocytes (**A vs B)**. 1,10-PA treated oocytes displayed atypical depigmentation at the animal cortex, which might be assimilated to white spot (**C**), in a cell phenotype we here referred as a Phenan-Type. In these oocytes, GV migration was observed toward the membrane plasma, though nuclear envelope fragments were still detected and no clear GVBD was observed. Such phenotype was not altered by U0126 (**D**) leading us to conclude its occurrence was not dependent upon MAPK phosphorylation and activation but rather related to effects of zinc chelation on cytoskeleton. It is to note that morphological events induced by 1,10 PA were correlated to p49JNK2, which was totally cancelled by ZnSO4 addition. **NE**, Nuclear Envelop; **GV**, Germinal Vesicle; **PB**, Polar Boday, **S,** Spindle.

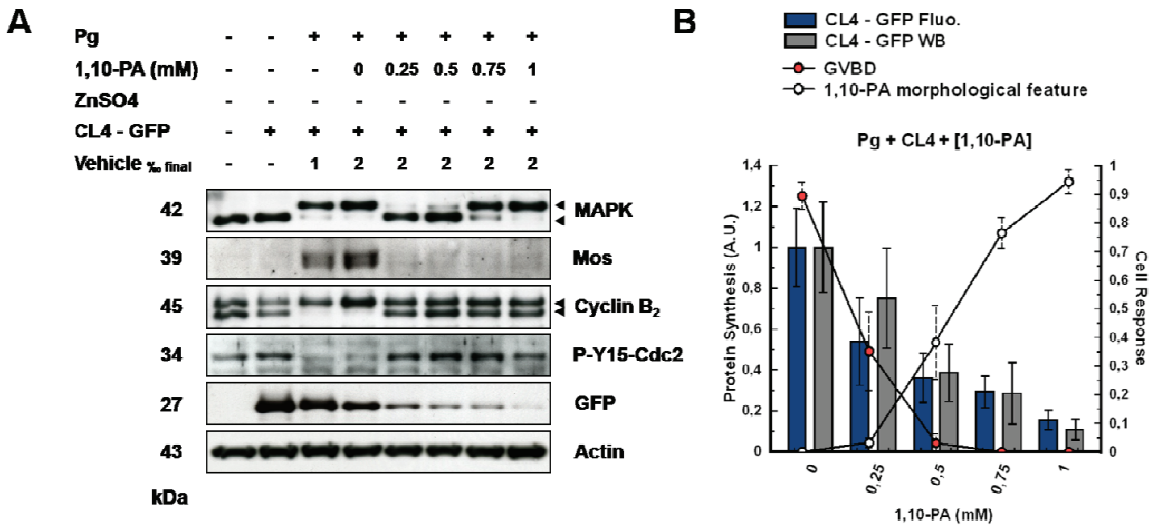


Figure S3, dose-dependent effect of 1,10 PA on heterologous expression of GFP in Xenopus oocytes. 1,10-PA gradual concentrations were applied on oocytes injected with GFP-CL4 mRNA and stimulated with progesterone **(A)**. 0.25 mM 1,10-PA was sufficient to prevent Mos synthesis and both MAPK and MPF pathway activation. GFP-CL4 accumulation was progressively impaired by increasing concentrations (0.5 to 1 mM, **B)**. Inhibition of protein synthesis was dose dependent and correlated with inhibition of PG-induced GVBD.

REFERENCES

Azzi L, Meijer L, Ostvold AC, Lew J, Wang JH (1994) Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J Biol Chem* **269:** 13279-13288

Flament S, Browaeys E, Rodeau JL, Bertout M, Vilain JP (1996) Xenopus oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int J Dev Biol* **40:** 471-476

Larson DR, Gosse JA, Holowka DA, Baird BA, Webb WW (2005) Temporally resolved interactions between antigen-stimulated IgE receptors and Lyn kinase on living cells. *J Cell Biol* **171:** 527-536

Riou JF, Clavilier L, Boucaut JC (1996) Early regionalized expression of a novel Xenopus fibroblast growth factor receptor in neuroepithelium. *Biochem Biophys Res Commun* **218:** 198-204

Shi DL, Feige JJ, Riou JF, DeSimone DW, Boucaut JC (1992) Differential expression and regulation of two distinct fibroblast growth factor receptors during early development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl. *Development* **116:** 261-273

Zhong H, Wu X, Huang H, Fan Q, Zhu Z, Lin S (2006) Vertebrate MAX-1 is required for vascular patterning in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 16800-16805

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette thèse considère le rôle des motifs de régulation dans la mise en place des propriétés physiques d'activation du réseau p39Mos-MEK1-MAPK, à savoir l'ultrasensibilité, la bistabilité, l'irréversibilité et le caractère tout-ou-rien de cette réponse. Deux questions principales ont été abordées dans ce travail : (1) Quels sont les rôles respectifs des rétrocontrôles exercés par les MAPK et le MPF dans l'accumulation de p39Mos et l'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK et (2) peut-on recruter efficacement les MAPK en absence de la MAP3K/p39Mos ?

1. Modélisation du réseau p39Mos-MEK1-MAPK

- **Influence des rétrocontrôles sur l'accumulation de p39Mos**

Le premier volet de mes travaux a permis de développer un modèle mathématique de la voie p39Mos-MEK1-MAPK dans lequel le MPF exerce un rôle non négligeable. Une approche modulaire du réseau a d'abord été proposée pour l'étude de la voie MAPK lors de la transition G2/M des ovocytes de Xénope **(Figure 35)**. Dans ce contexte, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs permet d'étudier le comportement du réseau et les fonctions cellulaires lorsqu'un des composants de la voie n'est pas fonctionnel. L'évolution temporelle de p39Mos après stimulation des ovocytes par la progestérone ou l'injection de MPF a ensuite été analysée en présence d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. Des analyses semi-quantitatives par western blot ont permis d'analyser la cinétique d'accumulation de p39Mos, et les états de phosphorylation de MEK1, des MAPK et de la Cycline B2. Nos résultats montrent que le MPF peut être activé en absence d'activité MAPK et qu'il joue un rôle prépondérant dans l'accumulation de p39Mos. En effet, après une stimulation des ovocytes par la progestérone en présence ou non d'U0126, les mesures relatives à cette accumulation n'ont pas montré de différences significatives. Cette observation minimise donc l'influence du rétrocontrôle exercé par les MAPK sur la voie. Cependant, en absence d'activité MAPK, l'accumulation de p39Mos est transitoire et suggère que les MAPK stabilisent la synthèse et la stabilisation de l'oncoprotéine au cours du temps. Dans ce processus, deux mécanismes peuvent être envisagés : d'une part, les MAPK régulent directement la synthèse de p39Mos *via* la boucle de rétrocontrôle positif et, d'autre part, les MAPK renforcent l'activité kinasique du MPF qui, en retour, stimule l'accumulation de p39Mos par rétrocontrôle positif. Soulignant l'existence d'interconnections entre ces deux voies, l'injection d'antisens dirigés contre l'ARN *cycline* conduit elle aussi à une accumulation transitoire de p39Mos associée à activation transitoire des MAPK (Hochegger *et al.*, 2001).

Les résultats de simulation obtenus avec le modèle ont été confrontés aux observations expérimentales et une corrélation satisfaisante a été obtenue dans une optique qualitative. Cependant, les variations abruptes de p39Mos observées *in vivo* ne le sont pas *in silico* et imposent l'amélioration du modèle. Corrélées à l'activation du MPF (phosphorylation de la Cycline B2), ces variations n'ont été testées que dans deux conditions suivant l'injection de cytoplasme contenant du MPF actif : (1) une condition contrôle où l'activité du MPF et celle des MAPK sont considérées stables et (2) une condition où l'activation transitoire du MPF est observée en absence d'activité des MAPK. Une troisième condition pourra être rapidement testée *in vivo* et *in silico.* Cette approche repose sur l'injection d'une forme non dégradable de

la Cycline B (Delta-Cyline, Rime *et al.*, 1992) de manière à stabiliser l'activité du MPF en condition U0126, c'est-à-dire en absence de rétrocontrôle exercé par les MAPK. Parallèlement, les profils de phosphorylation des protéines MAPK, p90Rsk, Cdc25, Myt1 et Plx1 pourront être considérés par western blot, et les résultats expérimentaux et *in silico* confrontés afin de valider notre modèle. L'objectif d'une telle démarche nous permettra d'étudier les mécanismes de régulation du MPF dans le cas où les MAPK sont inactives et que p39Mos s'accumule transitoirement.

Si l'analyse par western blot offre un aperçu instantané de la synthèse ou de l'état de phosphorylation des termes du système, elle ne reflète pas les interactions ou l'activité de ces derniers. Pourtant, la détermination des valeurs expérimentales qui rendent compte de la variation de l'activité du MPF au cours du temps est devenue nécessaire à la progression de notre modélisation. Les perspectives qui sont envisagées impliquent, d'une part, l'analyse dynamique fine des variations d'activité du MPF et, d'autre part, la modélisation de cette dynamique d'activité au cours de la méiose.

Dans un premier temps, une mesure d'activité H1-kinase précisera la dynamique et les variations de l'activité du MPF dans les conditions expérimentales déjà mises en place. Ces mesures peuvent être réalisées à l'aide de tests froids (Cyclex® Cdc2-Cycline B Kinase Assay Kit ; MBL International Corporation) ou radioactifs ($ATP^{[32P]}$). Dans un second temps, l'utilisation de sondes fluorescentes et le développement de molécules 'biosenseurs' de type KAR (Kinase Activity Reporters) paraissent prometteuses (Ni *et al.*, 2006 ; Gavet et Pines, 2010). Les techniques de microscopie appliquées à la fluorescence permettent de réaliser des mesures quantitatives, *in vivo,* en temps réel et dans l'espace de l'accumulation, la diffusion (FRAP, FLIM), l'interaction et l'activation (FRET, FLIM, BRET) des protéines d'intérêt (pour revue voir Trugnan *et al.*, 2004). Récemment, un biosenseur utilisant le phénomène de FRET a été développé pour mesurer l'activité des couples Cdc2/Cycline B dans le contexte de la transition G2/M du cycle cellulaire (Gavet et Pines, 2010). Compte tenu du nombre de fluorochromes développés à ce jour, les différents effecteurs du réseau pourront être analysés simultanément puisque d'autres sondes sont disponibles quant à l'étude de l'activité des MAPK (Harvey *et al.*, 2008) ou de PKA (Allen et Zhang, 2006). Le choix des couples de fluorophores donneur/accepteur sera néanmoins critique (recoupement des nombreux spectres d'excitation et d'émission des fluorophores) et constituera une limitation à l'application pratique. Cette approche sera développée en collaboration avec le Dr. Laurent Héliot de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (CNRS USR3078, Villeneuve d'Ascq, France).

Une modélisation du comportement du MPF pourra être entreprise parallèlement aux démarches expérimentales qui seraient engagées. Un modèle minimal de l'interaction en cascade entre la Cycline et Cdc2 a déjà été proposé par Goldbeter (1991) dans le cadre des oscillations mitotiques. Par ailleurs, des études théoriques et expérimentales ont été menées par Tyson et collaborateurs sur l'évolution du MPF dans l'embryon et les extraits d'œufs de Xénope (Novak et Tyson, 1993), la levure (Novak *et al.*, 2001) et les cellules de Mammifères (Novak et Tyson, 2004). Des modèles mathématiques ont été proposés pour analyser les interactions entre les Cyclines et Cdc2, et trois comportements du système ont été observés : un niveau stable et élevé de l'activité du MPF associé à l'arrêt en métaphase, un comportement oscillatoire lors de la mitose embryonnaire, et un comportement bistable dans

le contexte de la division des cellules somatiques. Néanmoins, les modèles élaborés par ces travaux n'ont pas de valeurs biologiques dans la modélisation des voies de régulation de la méiose ovocytaire puisqu'à titre d'exemple, le MPF est considéré par ces auteurs comme l'unique enzyme activatrice de Wee1 et de Cdc25C. Pourtant, ces protéines sont régulées par d'autres partenaires telle que la Polo-kinase, responsable de l'autoamplification du MPF en absence d'activité MAPK (Karaiskou *et al.*, 2004). De plus, les travaux de Bazile et collaborateurs (2007) montrent que les motifs de régulation des MAPK par le MPF sont absents dans les extraits mitotiques embryonnaires de Xénope, ce qui suggère que de réelles différences existent entre les voies de régulation de la mitose et de la méiose chez le Xénope. En considérant ces différences, notre modèle de prédiction sera complété sur la base des travaux de Novak et Tyson (Novak et Tyson, 1993 ; Novak *et al.*, 2001 ; Novak et Tyson, 2004). Il intégrera la régulation des protéines régulatrices du MPF (Myt1 et Cdc25C) par Plx1 et la cascade p39Mos-MEK1-MAPK-p90Rsk.

- **Dégradation de p90Rsk et effondrement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK**

Nos résultats montrent que la protéine p90Rsk peut être dégradée dans les ovocytes de Xénope. Ce constat inédit implique que notre modèle de prédiction n'est valable que sur une fenêtre de temps restreinte, limitée à 48 heures suivant l'entrée en phase M des ovocytes. Afin de rendre le modèle plus réaliste, l'effondrement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK devra être considéré *in silico*, et les mécanismes responsables de cet effondrement et de la dégradation de p90Rsk devront être identifiés.

Dans le contexte de l'étude de la dégradation de p90Rsk, un fragment d'environ 37 kDa (poids moléculaire apparent) correspondant à la région C-terminale de cette protéine (Ct-ΔRsk) a été identifié par immunoprécipitation, mais n'a pu être purifié. La purification et le séquençage du fragment Ct-ΔRsk permettrait d'identifier le site de clivage. La protéine native et son fragment n'ont cependant pas été détectés en gel de part leur faible recrutement et la présence d'un important bruit de fond. Un tel bruit s'expliquent par deux raisons : des protéines parasites ont été recrutées de façon aspécifique (1) par la résine ou (2) par l'anticorps. La première hypothèse sera testée par coloration des protéines après immunoprécipitation en absence d'anticorps. La seconde hypothèse sera évaluée par l'utilisation de nouveaux anticorps (monoclonaux) reconnaissant la région C-terminale de p90Rsk. Si toutefois les concentrations en p90Rsk et en Ct-ΔRsk ne permettent pas une détection après immunoprécipitation, il sera envisagé de les surexprimer par injection dans l'ovocyte d'une protéine ou d'un ARNm codant une p90Rsk étiquetée. Par ailleurs, dans l'hypothèse où le fragment N-terminal n'a pas été clivé en de plus petits morceaux, le résidu Nt-ΔRsk manquant (d'environ 53 kDa) sera recherché à l'aide d'un anticorps reconnaissant la région N-terminale de la protéine.

Le poids moléculaire de Ct-ΔRsk suggère que la protéine p90Rsk est clivée par le biais des Caspases, suivant une voie indépendante du protéasome. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Dhar et collaborateurs (2009) selon lesquelles la protéine p70S6Kinase, de la famille de p90Rsk, est clivée par la Caspase 3 sur un site non canonique composé de la séquence en acides aminés TPVN. Le clivage de cette protéine est bloqué par l'inhibition des Caspases, mais non par l'inhibition du protéasome. Les sites de clivages consensuels des

Caspases et le site non canonique proposé par ces auteurs n'ont cependant pas été retrouvés dans la séquence de p90Rsk de Xénope (www.uniprot.org). Afin de tester l'hypothèse qu'une Caspase puisse cliver p90Rsk indépendamment du protéasome, trois inhibiteurs seront testés : le MG132 (inhibiteur du protéasome, Chesnel *et al.*, 2006), le ZVAD (inhibiteur des Caspases, Johnson *et al.*, 2010) et le Z-DEVD-CHO (inhibiteur de la Caspase 3, Bhuyan *et al.*, 2001). L'efficacité de ces deux derniers inhibiteurs sera évaluée avec le AC-DEVD-AMC, un substrat fluorogènique des Caspases 3 et 7.

La dégradation de la protéine p90Rsk est indépendante des MAPK, puisqu'elle survient en condition 1,10-PA malgré une forte activité MAPK. La dégradation de p90Rsk précède également la déphosphorylation des Cyclines et la dégradation de p39Mos. L'effondrement de la voie p39Mos-MEK1-MAPK ne repose donc pas sur l'inactivation d'un de ces régulateurs ou sur la perte d'un motif de régulation puisqu'en condition 1,10-PA, le MPF et la synthèse protéique sont inhibés par la chélation du zinc. *In fine*, la kinase p90Rsk ainsi qu'une protéine étrangère au réseau modélisé *in silico* forment un module fonctionnel dans le contexte de l'effondrement de la cascade. De manière à s'affranchir du délai de dégradation de p90Rsk, ce processus de rupture pourra être simulé et étudié *in vivo* par l'intermédiaire d'un inhibiteur spécifique de p90Rsk, le SL0101 (Smith *et al.*, 2007). Cette approche devra être couplée à des mesures d'activité du MPF et des MAPK, ainsi qu'à l'activation des SAPK. En effet, il est possible que la dégradation de p90Rsk soit associée à une mort cellulaire dans la mesure où, dans de nombreux modèles, cette protéine présente une activité anti-apoptotique (cellules du rein COS et HEK293 : Tan *et al.*, 1999 ; macrophages : Zhou *et al.*, 2005 ; cellules neuronales GT1-7 : Neithardt *et al.*, 2006 ; fibroblastes NIH3T3 : Fueller *et al.*, 2008).

2. Activation des MAPK indépendamment de p39Mos

Le deuxième volet de ma thèse s'intéresse aux propriétés physiques d'activation des MAPK lorsque l'accumulation de p39Mos est inhibée. Dans ce contexte, les travaux de Ferrell et Machleder (1998) ont préalablement montré que l'injection d'une protéine malE-Mos dans les ovocytes de Xénope conduit à une activation ultrasensible des MAPK (nH=35) selon une réponse de type tout-ou-rien, et que la sensibilité de cette réponse est sévèrement diminuée (nH=3) en absence de synthèse protéique et de rétrocontrôles exercés sur la voie p39Mos-MEK1-MAPK. Nous avons donc étudié la possibilité qu'une réponse de type ultrasensible puisse être produite en absence de p39Mos, indépendamment de tout rétrocontrôle positif.

- **Activation ultrasensible des MAPK par un chélateur du zinc : la 1,10-PA**

La quantité de zinc contenue dans les ovocytes de Xénope suggère un rôle important de ce métal dans les processus de vie cellulaire. En effet, les ovocytes de stade VI contiennent 70 ng de zinc, soit une concentration 100 fois supérieure à celle des ovocytes de souris, et 7000 fois supérieure à celle des leucocytes humains. Dans l'ovocyte, ce métal est le troisième plus concentré après le magnésium et le calcium : 10% du zinc est associé à des molécules et organites du cytoplasme et les 90% restant sont séquestrés par les plaquettes vitellines (Falchuk et Montorzi, 2001).

Les effets du zinc sur le cycle cellulaire et les voies qui coordonnent la progression du cycle diffèrent selon les modèles considérés. L'entrée en phase M des ovocytes de Batraciens peut être obtenue par un traitement au zinc en absence de stimulation hormonale (Wallace et Misulovin, 1980). Ce résultat contraste avec l'inhibition de la transition G2/M et l'entrée en apoptose des cellules de carcinome de prostate (LNCaP et PC-3) exposées à du zinc en solution (Liang *et al.*, 1999). Un arrêt en phase G1 et une entrée en apoptose sont observés dans les lymphoblastes (Falchuk et Krishan, 1977) et les cellules du pancréas PaCA44 (Donadelli *et al.*, 2008) traités respectivement par la 1,10-PA et le TPEN (N,N,N′,N′-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylene diamine), des chélateurs du zinc. De façon cohérente, la déplétion du zinc réduit également la prolifération des fibroblastes Swiss3T3 (blocage en phase S et lors de la transition G2/M, Thornton *et al.*, 1998). En absence de ce métal, la synthèse des Cyclines A et B1 est diminuée dans les cellules HT-29 de carcinome de colon (Kindermann *et al.*, 2004) et les PaCA44 (Donadelli *et al.*, 2008). La chélation du zinc par le TPEN inhibe également la phosphatase Cdc25C et bloque l'activation du MPF dans les ovocytes de Xénope (Sun *et al.*, 2007). Par ailleurs, si la chélation du zinc par le DTPA (DiethyleneTriaminepenta-Acetic Acid) inhibe l'activation des MAPK stimulée par l'IGF1 dans les fibroblastes Rat-1 (Lefebvre *et al.*, 1999), une augmentation du zinc intracellulaire inhibe les PTP et active les MAPK dans les cellules C-6 de gliomes de rat (Haase et Maret, 2003). Une exposition au zinc entraîne également l'activation des MAPK de type Erk1 et 2 dans les cellules épithéliales BEAS (Samet *et al.*, 1998) et les phéochromocyomes PC-12 (Seo *et al.*, 2001). L'activation des MAPK par le zinc pourrait enfin nécessiter la synthèse des ROS (Matsunaga *et al.*, 2005) ou la phosphorylation de MEK *via* l'activation du récepteur à l'EGF (Wu *et al.*, 1999).

Nos résultats montrent que la phosphorylation des MAPK a été obtenue par incubation des ovocytes de Xénope dans la 1,10-PA, un chélateur du zinc. Cette activation ne dépend ni de p39Mos, ni de la synthèse des ROS (inhibée par l'utilisation de la SOD et de la Catalase), ni de l'activation du MPF puisque la synthèse protéique est inhibée et que le zinc est nécessaire à l'activité de Cdc25C (Sun *et al.*, 2007). L'activation des MAPK par la 1,10-PA dépend de l'activité de MEK et de la chélation du zinc. Elle a été caractérisée comme ultrasensible ($nH > 6$) et graduelle. L'absence de rétrocontrôle positif exercé sur la voie justifie la perte de la bistabilité en condition 1,10-PA. Cependant, au regard des travaux de Ferrell et Machleder (1998), l'activation ultrasensible des MAPK en absence de p39Mos et de rétrocontrôle paraît originale. Cette réponse nécessite un mode de régulation différent de celui proposé par ces auteurs et pourrait impliquer une MEK-phosphatase sensible au zinc, comme dans le cas de la Cdc25C (Sun *et al.*, 2007).

Le mode d'action par lequel l'inhibition d'une phosphatase permet d'activer les MAPK en absence de MAP3K peut être discuté. Les mécanismes de régulation par phosphorylation et déphosphorylation sont très sensibles aux stimuli et aux perturbations du réseau d'interactions protéiques. À l'image d'une balance à bascule, ces mécanismes de régulation font appel à un équilibre fragile maintenu par l'opposition entre une activité activatrice (phosphorylation des MAPK par MEK1) et une activité inhibitrice (déphosphorylation des MAPK par une phosphatase). Chez la levure, il a été suggéré qu'en absence de stimulus, la rupture de cet équilibre peut faire basculer spontanément la réaction vers la phosphorylation,

voire l'autophosphorylation des MAPK (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Sur le plan moléculaire, de nombreux paramètres physiques et chimiques établis de façon spatio-temporelle influencent ces processus (*e.g.* la concentration en zinc).

Outre l'activation ultrasensible des MAPK, la 1,10-PA conduit à un phénotype cellulaire particulier observé même en présence d'U0126. Les réserves vitellines se sédimentent, le nucléoplasme s'échappe de la vésicule germinative et du cytoplasme est retrouvé entre la membrane plasmique et la membrane vitelline. Il est à souligner que le zinc intervient dans la régulation du cytosquelette et que les dimères de tubulines présentent 60 sites potentiels de fixation du zinc (Eagle *et al.*, 1983). Le zinc est également utilisé *ex vivo* pour former des structures nommées « tubulin-sheets » (Keskin *et al.*, 2002 ; Niederstrasser *et al.*, 2002). Par ailleurs, la β-tubuline de type 2 serait susceptible de s'associer à une Ubiquitine-ligase à doigt de zinc, la ZNRF1 (Yoshida *et al.*, 1999) ; Xklp1, une protéine motrice des microtubules, présente un domaine en doigt de zinc sur une séquence responsable de sa localisation nucléaire (Vernos *et al.*, 1995) ; et XKCM1, une protéine déstabilisatrice des microtubule dépolymérise les polymères de tubuline formés grâce au zinc (Niederstrasser *et al.*, 2002). Puisque 90% du zinc ovocytaire est séquestré par les plaquettes vitellines, la chélation de ce métal par la 1,10-PA pourrait générer un remaniement délétère du cytosquelette, responsable de la sédimentation du vitellus et des dommages subis par la vésicule germinative.

- **Activation des MAPK par Raf1 et hypothèse de pro-boucle**

De façon préliminaire, les expériences d'injection de Raf1 dans les ovocytes de Xénope permettent d'activer les MAPK selon une réponse de type tout-ou-rien. Lorsque la synthèse de p39Mos est inhibée, ce comportement est perdu au profit d'une réponse graduelle. Nos observations corroborent les travaux de Dupré et collaborateurs (2002b) selon lesquels l'expression d'une protéine Xe-H-RasV12 dans l'ovocyte de Xénope n'active que partiellement les MAPK en absence de synthèse protéique et d'accumulation de p39Mos. D'autres travaux minimisent le rôle de Raf1 dans la reprise méiotique ovocytaire. En 2003, Baert et collaborateurs montrent qu'en absence de p39Mos, l'insuline échoue à stimuler l'entrée en phase M des ovocytes de Xénope malgré l'activation des voies Ras-dépendantes (Baert *et al.*, 2003). Dans le modèle murin, Verlhac et collaborateurs (2000) montrent que l'injection d'une forme Delta-Raf constitutivement active dans des ovocytes de souris KO pour *mos* n'active pas les MAPK. Il a été suggéré par ces auteurs qu'une protéine phosphatase dirigée contre les MAPK est inhibée lorsque p39Mos s'accumule.

Dans nos conditions expérimentales, la protéine Raf1 surexprimée lors de l'injection n'est pas constitutivement active. À l'image du modèle murin, une phosphatase pourrait donc déphosphoryler Raf1, MEK1 et/ou les MAPK, et ainsi s'opposer à la mise en place d'une réponse bistable des MAPK lorsque la synthèse de p39Mos est inhibée. De plus, l'hypothèse que les phosphatases influencent la dynamique d'activation des MAPK a été évaluée *in silico*. Une réponse ultrasensible des MAPK (nH=6) a été prédite par notre modèle lorsque les phosphatases sont inhibées et que p39Mos est absent du réseau. Le coefficient de hill ainsi estimé équivaut à celui mesuré expérimentalement avec la 1,10-PA, ce qui renforce l'idée qu'une MEK-phosphatase soit inhibée par la chélation du zinc.

- **Effets des inhibiteurs de phosphatases sur l'activation de MAPK**

L'inhibition d'une MEK-phosphatase par l'intermédiaire d'un motif de type pro-action pourrait moduler la dynamique de réponse des MAPK dans l'ovocyte de Xénope. Nous avons donc testé une série d'inhibiteurs de phosphatases pour leur capacité à activer les MAPK en absence de p39Mos.

Le bpV(phen) est un inhibiteur des PTP et de la PTEN dérivé de la 1,10-PA. L'inhibition de la phosphatase PTEN, regulatrice de la voie PI3-K/Akt, par le bpV(phen) active les MAPK dans les tissus du parenchyme du poumon (Lai *et al.*, 2009). Le bpV(phen) active également les MAPK de façon soutenue et dépendante de MEK dans les cellules RINm5F (Rumora *et al.*, 2004). Ce même inhibiteur active les MAPK de type Erk et JNK, respectivement de manière soutenue et transitoire, dans les cellules PC-12. Dans ces cellules, de faibles concentrations en bpV(phen) stimule la prolifération tandis que des concentrations plus fortes provoque leur mort (Cerovac *et al.*, 1999). Dans les ovocytes de Xénope, nos résultats montrent que le bpV(phen) recrute environ 50% des MAPK en absence de p39Mos, selon une réponse de type graduel dépendante de MEK. Dans cette condition le MPF n'est jamais activé, ce qui peut s'expliquer par l'inhibition de Cdc25 par le bpV(phen) (Faure *et al.*, 1995 ; Scrivens *et al.*, 2003). Bien qu'il ne chélate pas le zinc, le bpV(phen) provoque un phénotype cellulaire et une activation des MAPK comparables à ceux observés en présence de 1,10-PA. Les conditions d'utilisation du bpV(phen) semblent néanmoins toxiques pour les ovocytes.

L'Acide Cantharidique et l'Acide Okadaïque, des inhibiteurs des sérine/thréonine-phosphatases PP2A et PP1, ont été testés dans l'ovocyte de Xénope. Le rôle de l'Acide Cantharidique sur l'activité des MAPK est très peu documenté. Schweyer et collaborateurs (2007) ont montré que l'activation des MAPK peut être obtenue par traitement de cellules germinales tumorales de testicule par l'Acide Cantharidique. En accord avec nos observations, cette activation serait dépendante de MEK et provoquerait l'entrée en apoptose de cette lignée. Dans l'ovocyte de Xénope, nos travaux montrent que l'Acide Cantharidique active les MAPK à un faible niveau en absence de p39Mos. Toxique pour les ovocytes, cet inhibiteur a été considéré comme un mauvais outil d'étude de l'activation des MAPK.

L'Acide Okadaïque s'est avéré être un activateur efficace des MAPK dans les ovocytes de Xénope. Son injection conduit à une phosphorylation des MAPK qui peut être inhibée par l'ajout d'anticorps anti-MEK (Kosako *et al.*, 1994c). L'Acide Okadaïque active également le MPF (Goris *et al.*, 1989 ; Maton *et al.*, 2005) indépendamment de la synthèse protéique (Rime *et al.*, 1990), ce qui s'explique par le fait que, dans les ovocytes immatures, PP2A déphosphoryle et inactive Cdc25C de façon antagoniste à Plx1 (Izumi *et al.*, 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1996 ; Karaiskou *et al.*, 1999). Il a été constaté qu'en absence de synthèse protéique, l'Acide Okadaïque active le MPF à partir du stock de pré-MPF et permet l'entrée en phase M de 29,6% des ovocytes traités. Dans cette condition, la phosphorylation des MAPK n'est jamais détectée. Par ailleurs, il est à souligner qu'en condition antisens *mos*, le recrutement des MAPK par l'Acide Okadaïque est moins efficace : 35% des MAPK sont phosphorylées en absence de p39Mos contre 100% en présence de la MAP3K. Ces résultats suggèrent donc que l'Acide Okadaïque agit de façon dépendante de la synthèse d'une protéine

qui n'est pas p39Mos. Récemment, il a été rapporté que la kinase Greatwall mime les effets stimulés par l'Acide Okadaïque sur la reprise méiotique (Zhao *et al.*, 2008) et inactive la PP2A (Castilho *et al.*, 2009 ; Vigneron *et al.*, 2009). Le lien entre Greatwall, l'inhibition de la PP2A et l'activation MEK-dépendante des MAPK reste cependant à determiner.

Trois inhibiteurs de phosphatases nous ont finalement permis d'activer les MAPK : l'Acide Okadaïque, l'Acide Cantharidique et le bpV(phen). L'Acide Okadaïque provoque la GVBD et active 100% des MAPK tandis que l'Acide Cantharidique et le bpV(phen), des inhibiteurs respectifs de sérine/thréonine- et de tyrosine-phosphatases, agissent dans des conditions toxiques pour les ovocytes. En absence de p39Mos, ces trois inhibiteurs activent partiellement les MAPK par l'intermédiaire de MEK1. En conclusion, nos observations suggèrent que, dans l'ovocyte de Xénope, plusieurs phosphatases régulent négativement la voie MAPK : une sérine/thréonine-phosphatase (PP1 et/ou PP2A) dont l'inhibition requiert la synthèse d'une protéine différente de p39Mos, et une tyrosine-phosphatase, voire PTEN. À l'avenir, des inhibiteurs de Cdc2, tel que le purvanol ou la roscovitine (Flament *et al.*, 2000 ; Knockaert *et al.*, 2000), pourraient être employés afin de déterminer le rôle du MPF dans l'activation des MAPK stimulée par l'Acide Cantharidique et l'Acide Okadaïque.

3. Évaluation du motif de pro-boucle

Les phosphatases sont susceptibles de moduler la durée, l'amplitude et la sensibilité de réponse des signaux de transduction (Kholodenko, 2000 ; Markevich *et al.*, 2004 ; Hornberg *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2008). L'influence de la concentration en phosphatases dans la transformation d'une réponse bistable en une réponse graduelle a été discutée dans des fibroblastes NIH3T3. Dans ces cellules, une faible concentration en MAPK-phosphatases conduit à une réponse bistable des MAPK. À l'inverse, une forte concentration de ces phosphatases transforme la réponse bistable en une réponse graduelle (Bhalla *et al.*, 2002). Cependant, la régulation des MAPK par les phosphatases peut cacher une réalité plus complexe. Il a d'abord été montré que les protéines PP2A et PTP1B sont régulées négativement par phosphorylation de leurs résidus tyrosines et sérines (Chen *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1994 ; Ravichandran *et al.*, 2001). Ensuite, dans le striatum de souris, les MAPK sont indirectement régulées par PP1 et STEP (Valjent *et al.*, 2005). La tyrosine-phosphatase STEP est inactive lorsqu'une de ses sérines est phosphorylée par PKA, et active lorsque ce résidu est déphosphorylé par PP1. Dans ce modèle, l'inhibition de PP1 conduit à l'inactivation de STEP et, par conséquent, à l'activation soutenue de MEK et des MAPK. Cette cascade, qui peut être définie comme une pro-boucle, permet à la sérine/thréonine-phosphatase PP1 de moduler la dynamique de réponse des MAPK sans interagir avec elles. Enfin, un réseau de régulation tout aussi complexe, impliquant trois phosphatases entre-elles (PP2A, MKP3 et PP1) et avec la voie Raf-MEK-MAPK, a été proposé par dans le cas d'une stimulation du récepteur BCR (B-cell antigen receptor) des lymphocytes B (Chaudhri *et al.*, 2010). La perturbation de ce dernier réseau de régulation conduit à une modification de la cinétique et de l'amplitude du signal de sortie, à savoir la phosphorylation des MAPK.

Dans l'ovocyte de Xénope, l'utilisation de la 1,10-PA, de Raf1 et des inhibiteurs de phosphatases a permis d'observer une activation partielle, souvent graduelle, des MAPK en absence de la MAP3K/p39Mos. Nos résultats suggèrent que la synthèse protéique, voire p39Mos, pourraient tenir un rôle décisif dans la mise en place d'une réponse tout-ou-rien des MAPK lors de la transition G2/M des ovocytes de Xénope. Ainsi, deux voies parallèles serait empruntées pour activer une réponse ultrasensible et bistable des MAPK. La première nécessiterait la phosphorylation de MEK1, et la seconde impliquerait l'inhibition directe ou non de MEK-phosphatases par l'intermédaire d'un motif de régulation nommé boucle de pro-action ou pro-boucle (feed-forward loop) **(Figure 53)**. Compte tenu de la redondance et de la multiplicité des interactions qui caractérisent les réseaux de régulation moléculaire, ce motif ne pourra être identifié que par l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs (Keith *et al.*, 2005). Une telle stratégie est proposée dans la **Figure 53** : l'injection d'une protéine Raf1 couplée à l'utilisation comparée d'oligonucléotides antisens *mos* ou de cycloheximide nous informera du rôle de p39Mos, ou d'une autre protéine synthétisée lors de la reprise méiotique, dans la mise en place de la réponse tout-ou-rien des MAPK.

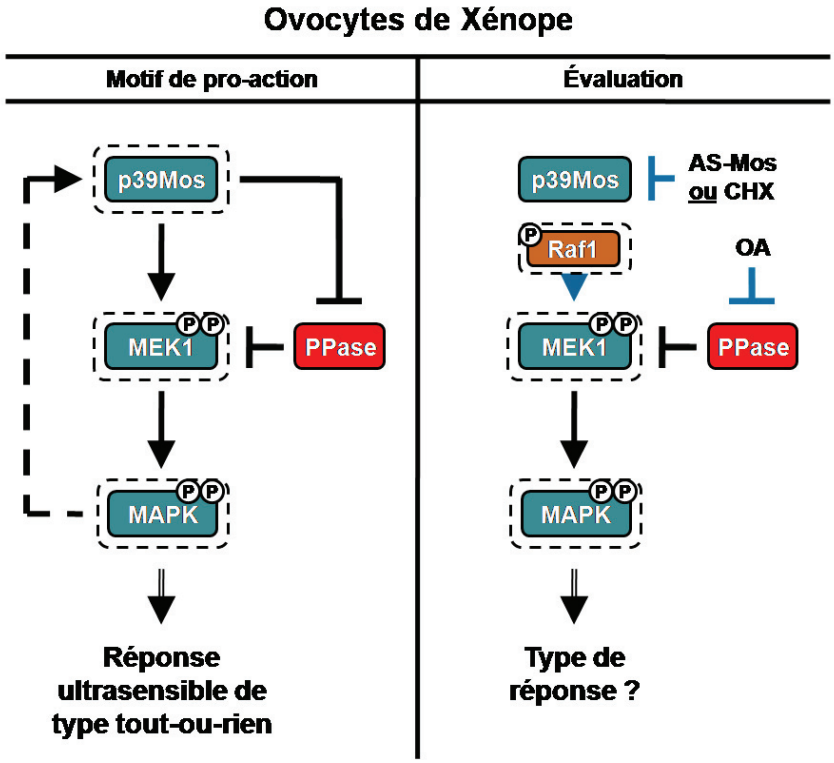


Figure 53 : Activation des MAPK par le recrutement d'un motif de pro-action. Illustration du motif de pro-action dans l'ovocyte de Xénope (gauche). Afin de tester notre hypothèse, une condition expérimentale basée sur l'injection d'une protéine de synthèse Raf1 est proposée (droite). La flèche en pointillés correspond à la rétroaction excercée par les MAPK soit directement sur p39Mos, soit indirectement par l'intermédiaire du MPF. **AS-Mos**, oligonucléotides antisens *mos* ; **CHX**, Cycloheximide inhibitrice de la synthèse protéique ; **OA**, Acide Okadaïque.

En conclusion, les protéines phosphatases présentent des rôles clefs dans la régulation des réseaux complexes d'interactions protéiques. Elles modulent notamment la dynamique d'activation des signaux mitogènes. Dans les ovocytes de Xénope, p39Mos est susceptible de phosphoryler une ou plusieurs protéines phosphatases afin de stimuler une réponse ultrasensible et bistable des MAPK. La régulation négative de ces phosphatases pourrait également s'effectuer en amont de p39Mos, par des effecteurs qu'il s'agira d'identifier. L'identité des phosphatases qui composent ce réseau, ainsi que leur contribution dans la mise en place des propriétés physiques d'activation de la voie p39Mos-MEK1-MAPK, restent également à déterminer de manière précise. Définir la nature des interactions et des motifs de régulation qui impliquent les protéines kinases et phosphatases au sein l'architecture des réseaux constitue une approche de biologie systémique prometteuse. De manière fondamentale, les modèles construits permettront de prédire le comportement de chacun des membres de la voie MAPK en réponse aux agents pharmacologiques, et d'adapter la pharmacopée qui vise l'inhibition des signaux mitogènes.

BIBLIOGRAPHIE

ABRIEU, A., LORCA, T., LABBE, J.C., MORIN, N., KEYSE, S., DOREE, M. (1996). MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in Xenopus egg extracts. *J Cell Sci*, **109 (Pt 1)**, p 239-46.

ABRIEU, A., BRASSAC, T., GALAS, S., FISHER, D., LABBE, J.C., DOREE, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. *J Cell Sci*, **111 (Pt 12)**, p 1751-7.

ABRIEU, A., DOREE, M., FISHER, D. (2001). The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci*, **114**, p 257-67.

ADACHI, Y., LUKE, M., LAEMMLI, U.K. (1991). Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell*, **64**, p 137-48.

ADAMS, D.G., COFFEE, R.L., JR., ZHANG, H., PELECH, S., STRACK, S., WADZINSKI, B.E. (2005). Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. *J Biol Chem*, **280**, p 42644-54.

ADLER, V., QU, Y., SMITH, S.J., IZOTOVA, L., PESTKA, S., KUNG, H.F., LIN, M., FRIEDMAN, F.K., CHIE, L., CHUNG, D., BOUTJDIR, M., PINCUS, M.R. (2005). Functional interactions of Raf and MEK with Jun-N-terminal kinase (JNK) result in a positive feedback loop on the oncogenic Ras signaling pathway. *Biochemistry*, **44**, p 10784-95.

AGUILAR, J.L., KULKARNI, R., RANDIS, T.M., SOMAN, S., KIKUCHI, A., YIN, Y., RATNER, A.J. (2009). Phosphatase-dependent regulation of epithelial mitogen-activated protein kinase responses to toxin-induced membrane pores. *PLoS One*, **4**, p e8076.

ALEXANDRU, G., ZACHARIAE, W., SCHLEIFFER, A., NASMYTH, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J*, **18**, p 2707-21.

ALLEN, M.D., ZHANG, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, p 716-21.

ANDERSEN, C.B., ROTH, R.A., CONTI, M. (1998). Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **273**, p 18705-8.

ANDERSEN, C.B., SAKAUE, H., NEDACHI, T., KOVACINA, K.S., CLAYBERGER, C., CONTI, M., ROTH, R.A. (2003). Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *Biochem J*, **369**, p 227-38.

ANDERSEN, S.S. (1999). Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary view. *Bioessays*, **21**, p 53-60.

ANDRESSON, T., RUDERMAN, J.V. (1998). The kinase Eg2 is a component of the Xenopus oocyte progesterone-activated signaling pathway. *Embo J*, **17**, p 5627-37.

ANGELI, D., FERRELL, J.E., JR., SONTAG, E.D. (2004). Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, p 1822-7.

ARAKI, K., NAITO, K., HARAGUCHI, S., SUZUKI, R., YOKOYAMA, M., INOUE, M., AIZAWA, S., TOYODA, Y., SATO, E. (1996). Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod*, **55**, p 1315-24.

ARUMUGAM, K., WANG, Y., HARDY, L.L., MACNICOL, M.C., MACNICOL, A.M. (2010). Enforcing temporal control of maternal mRNA translation during oocyte cell-cycle progression. *Embo J*, **29**, p 387-97.

AUDET, R.G., GOODCHILD, J., RICHTER, J.D. (1987). Eukaryotic initiation factor 4A stimulates translation in microinjected Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **121**, p 58-68.

BAE, D., CERYAK, S. (2009). Raf-independent, PP2A-dependent MEK activation in response to ERK silencing. *Biochem Biophys Res Commun*, **385**, p 523-7.

BAERT, F., BODART, J.F., BOCQUET-MUCHEMBLED, B., LESCUYER-ROUSSEAU, A., VILAIN, J.P. (2003). Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **278**, p 49714-20.

BAGOWSKI, C.P., FERRELL, J.E., JR. (2001). Bistability in the JNK cascade. *Curr Biol*, **11**, p 1176-82.

BAGOWSKI, C.P., XIONG, W., FERRELL, J.E., JR. (2001a). c-Jun N-terminal kinase activation in Xenopus laevis eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, p 1459-65.

BAGOWSKI, C.P., MYERS, J.W., FERRELL, J.E., JR. (2001b). The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **276**, p 37708-14.

BALLANTYNE, S., DANIEL, D.L., JR., WICKENS, M. (1997). A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation. *Mol Biol Cell*, **8**, p 1633-48.

BANDYOPADHYAY, A., BANDYOPADHYAY, J., CHOI, H.H., CHOI, H.S., KWON, H.B. (1998). Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (Rana dybowskii) oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol*, **109**, p 293-301.

BARABASI, A.L., OLTVAI, Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*, **5**, p 101-13.

BARKOFF, A., BALLANTYNE, S., WICKENS, M. (1998). Meiotic maturation in Xenopus requires polyadenylation of multiple mRNAs. *Embo J*, **17**, p 3168-75.

BARKOFF, A.F., DICKSON, K.S., GRAY, N.K., WICKENS, M. (2000). Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol*, **220**, p 97-109.

BARNARD, D.C., RYAN, K., MANLEY, J.L., RICHTER, J.D. (2004). Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell*, **119**, p 641-51.

BARRETT, C.B., SCHROETKE, R.M., VAN DER HOORN, F.A., NORDEEN, S.K., MALLER, J.L. (1990). Ha-rasVal-12,Thr-59 activates S6 kinase and p34cdc2 kinase in Xenopus oocytes: evidence for c-mosxe-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biol*, **10**, p 310-5.

BAULIEU, E.E., GODEAU, F., SCHORDERET, M., SCHORDERET-SLATKINE, S. (1978). Steroid-induced meiotic division in Xenopus laevis oocytes: surface and calcium. *Nature*, **275**, p 593-8.

BAYAA, M., BOOTH, R.A., SHENG, Y., LIU, X.J. (2000). The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, p 12607-12.

BAZILE, F., PASCAL, A., KARAISKOU, A., CHESNEL, F., KUBIAK, J.Z. (2007). Absence of reciprocal feedback between MPF and ERK2 MAP kinase in mitotic Xenopus laevis embryo cell-free extract. *Cell Cycle*, **6**, p 489-96.

BELLE, R., MINELLA, O., CORMIER, P., MORALES, J., POULHE, R., MULNER-LORILLON, O. (1995). Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. *Prog Cell Cycle Res*, **1**, p 265-70.

BELLOC, E., MENDEZ, R. (2008). A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature*, **452**, p 1017-21.

BEMENT, W.M., CAPCO, D.G. (1990). Protein kinase C acts downstream of calcium at entry into the first mitotic interphase of Xenopus laevis. *Cell Regul*, **1**, p 315-26.

BERRA, E., DIAZ-MECO, M.T., DOMINGUEZ, I., MUNICIO, M.M., SANZ, L., LOZANO, J., CHAPKIN, R.S., MOSCAT, J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell*, **74**, p 555-63.

BHALLA, U.S., RAM, P.T., IYENGAR, R. (2002). MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science*, **297**, p 1018-23.

BHATT, R.R., FERRELL, J.E., JR. (1999). The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*, **286**, p 1362-5.

BHUYAN, A.K., VARSHNEY, A., MATHEW, M.K. (2001). Resting membrane potential as a marker of apoptosis: studies on Xenopus oocytes microinjected with cytochrome c. *Cell Death Differ*, **8**, p 63-9.

BIALOJAN, C., TAKAI, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*, **256**, p 283-90.

BIRCHMEIER, C., BROEK, D., WIGLER, M. (1985). ras proteins can induce meiosis in Xenopus oocytes. *Cell*, **43**, p 615-21.

BLETHROW, J.D., GLAVY, J.S., MORGAN, D.O., SHOKAT, K.M. (2008). Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, p 1442-7.

BLONDEAU, J.P., BAULIEU, E.E. (1984). Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of Xenopus laevis oocytes. *Biochem J*, **219**, p 785-92.

BODART, J.F., BECHARD, D., BERTOUT, M., ROUSSEAU, A., GANNON, J., VILAIN, J.P., FLAMENT, S. (1999). Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of Xenopus laevis. *FEBS Lett*, **457**, p 175-8.

BODART, J.F., FLAMENT, S., VILAIN, J.P. (2002a). Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol Reprod Dev*, **61**, p 570-4.

BODART, J.F., GUTIERREZ, D.V., NEBREDA, A.R., BUCKNER, B.D., RESAU, J.R., DUESBERY, N.S. (2002b). Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of Xenopus tropicalis oocytes. *Dev Biol*, **245**, p 348-61.

BODART, J.F., BAERT, F.Y., SELLIER, C., DUESBERY, N.S., FLAMENT, S., VILAIN, J.P. (2005). Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **283**, p 373-83.

BONDEVA, T., PIROLA, L., BULGARELLI-LEVA, G., RUBIO, I., WETZKER, R., WYMANN, M.P. (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*, **282**, p 293-6.

BOOHER, R.N., ALFA, C.E., HYAMS, J.S., BEACH, D.H. (1989). The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell*, **58**, p 485-97.

BOOHER, R.N., DESHAIES, R.J., KIRSCHNER, M.W. (1993). Properties of Saccharomyces cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J*, **12**, p 3417-26.

BOOHER, R.N., HOLMAN, P.S., FATTAEY, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem*, **272**, p 22300-6.

BORGNE, A., OSTVOLD, A.C., FLAMENT, S., MEIJER, L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem*, **274**, p 11977-86.

BORISUK, M.T., TYSON, J.J. (1998). Bifurcation analysis of a model of mitotic control in frog eggs. *J Theor Biol*, **195**, p 69-85.

BOULTON, T.G., YANCOPOULOS, G.D., GREGORY, J.S., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J., COBB, M.H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, **249**, p 64-7.

BOUTROS, R., DOZIER, C., DUCOMMUN, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, p 185-91.

BRACHET, J., HANOCQ, F., VAN GANSEN, P. (1970). A cytochemical and ultrastructural analysis of in vitro maturation in amphibian oocytes. *Dev Biol*, **21**, p 157-95.

BRADHAM, C., MCCLAY, D.R. (2006). p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle*, **5**, p 824-8.

BRANDMAN, O., FERRELL, J.E., JR., LI, R., MEYER, T. (2005). Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions. *Science*, **310**, p 496-8.

BRAVO, R., OTERO, C., ALLENDE, C.C., ALLENDE, J.E. (1978). Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, p 1242-6.

BRIZUELA, L., DRAETTA, G., BEACH, D. (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *Embo J*, **6**, p 3507-14.

BROWAEYS-POLY, E., CAILLIAU, K., VILAIN, J.P. (2000). Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in Xenopus laevis oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. *Eur J Biochem*, **267**, p 6256-63.

BROWAEYS-POLY, E., CAILLIAU, K., VILAIN, J.P. (2001). Transduction cascades initiated by fibroblast growth factor 1 on Xenopus oocytes expressing MDA-MB-231 mRNAs. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. *Cell Signal*, **13**, p 363-8.

BROWNE, C.L., WILEY, H.S., DUMONT, J.N. (1979). Oocyte-follicle cell gap junctions in Xenopus laevis and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science*, **203**, p 182-3.

BURKE, B., GERACE, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell*, **44**, p 639-52.

BURNS, R.G., ISLAM, K., CHAPMAN, R. (1984). The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2:tubulin interaction. *Eur J Biochem*, **141**, p 609-15.

CAILLIAU, K., BROWAEYS-POLY, E. (2009). A microinjectable biological system, the Xenopus oocyte, as an approach to understanding signal transduction protein function. *Methods Mol Biol*, **518**, p 43-55.

CAMPS, M., NICHOLS, A., ARKINSTALL, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*, **14**, p 6-16.

CAO, Q., RICHTER, J.D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *Embo J*, **21**, p 3852-62.

CARNERO, A., LACAL, J.C. (1993). Phospholipase-induced maturation of Xenopus laevis oocytes: mitogenic activity of generated metabolites. *J Cell Biochem*, **52**, p 440-8.

CARNERO, A., LIYANAGE, M., STABEL, S., LACAL, J.C. (1995). Evidence for different signalling pathways of PKC zeta and ras-p21 in Xenopus oocytes. *Oncogene*, **11**, p 1541-7.

CASTILHO, P.V., WILLIAMS, B.C., MOCHIDA, S., ZHAO, Y., GOLDBERG, M.L. (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell*, **20**, p 4777-89.

CASTRO, A., PETER, M., LORCA, T., MANDART, E. (2001a). c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during Xenopus oocyte maturation. *Biol Cell*, **93**, p 15-25.

CASTRO, A., PETER, M., MAGNAGHI-JAULIN, L., VIGNERON, S., GALAS, S., LORCA, T., LABBE, J.C. (2001b). Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*, **12**, p 2660-71.

CEROVAC, Z., BAN, J., MORINVILLE, A., YACCATO, K., SHAVER, A., MAYSINGER, D. (1999). Activation of MAPK by potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate (V). *Neurochem Int*, **34**, p 337-44.

CEULEMANS, H., BOLLEN, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, **84**, p 1-39.

CHANG, L., KARIN, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, p 37-40.

CHARLESWORTH, A., WELK, J., MACNICOL, A.M. (2000). The temporal control of Wee1 mRNA translation during Xenopus oocyte maturation is regulated by cytoplasmic polyadenylation elements within the 3'-untranslated region. *Dev Biol*, **227**, p 706-19.

CHARLESWORTH, A., RIDGE, J.A., KING, L.A., MACNICOL, M.C., MACNICOL, A.M. (2002). A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *Embo J*, **21**, p 2798-806.

CHARLESWORTH, A., COX, L.L., MACNICOL, A.M. (2004). Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)- and CPE-binding protein (CPEB)-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **279**, p 17650-9.

CHARLESWORTH, A., WILCZYNSKA, A., THAMPI, P., COX, L.L., MACNICOL, A.M. (2006). Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *Embo J*, **25**, p 2792-801.

CHAUDHRI, V.K., KUMAR, D., MISRA, M., DUA, R., RAO, K.V. (2010). Integration of a phosphatase cascade with the mitogen-activated protein kinase pathway provides for a novel signal processing function. *J Biol Chem*, **285**, p 1296-310.

CHAUDHURI, S.K., GHOSH, S., PAWELETZ, N., SCHROETER, D. (1997). Effects of low concentrations of okadaic acid in HeLa cells. *Indian J Exp Biol*, **35**, p 1044-54.

CHEN, F., ARCHAMBAULT, V., KAR, A., LIO, P., D'AVINO, P.P., SINKA, R., LILLEY, K., LAUE, E.D., DEAK, P., CAPALBO, L., GLOVER, D.M. (2007). Multiple protein phosphatases are required for mitosis in Drosophila. *Curr Biol*, **17**, p 293-303.

CHEN, J., MARTIN, B.L., BRAUTIGAN, D.L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, **257**, p 1261-4.

CHEN, J., PARSONS, S., BRAUTIGAN, D.L. (1994). Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, **269**, p 7957-62.

CHEN, M., COOPER, J.A. (1995). Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol*, **15**, p 4727-34.

CHEN, M., COOPER, J.A. (1997). The beta subunit of CKII negatively regulates Xenopus oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, p 9136-40.

CHEN, M., LI, D., KREBS, E.G., COOPER, J.A. (1997). The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol*, **17**, p 1904-12.

CHEN, R.H., WATERS, J.C., SALMON, E.D., MURRAY, A.W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science*, **274**, p 242-6.

CHESNEL, F., BAZILE, F., PASCAL, A., KUBIAK, J.Z. (2006). Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of Xenopus laevis embryos. *Cell Cycle*, **5**, p 1687-98.

CHESNEL, F., BAZILE, F., PASCAL, A., KUBIAK, J.Z. (2007). Cyclin B2/cyclin-dependent kinase1 dissociation precedes CDK1 Thr-161 dephosphorylation upon M-phase promoting factor inactivation in Xenopus laevis cell-free extract. *Int J Dev Biol*, **51**, p 297-305.

CHOI, T., RULONG, S., RESAU, J., FUKASAWA, K., MATTEN, W., KURIYAMA, R., MANSOUR, S., AHN, N., VANDE WOUDE, G.F. (1996). Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, p 4730-5.

CHOPRA, A.P., BOONE, S.A., LIANG, X., DUESBERY, N.S. (2003). Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem*, **278**, p 9402-6.

CHUANG, L.M., MYERS, M.G., JR., SEIDNER, G.A., BIRNBAUM, M.J., WHITE, M.F., KAHN, C.R. (1993a). Insulin receptor substrate 1 mediates insulin and insulin-like growth factor I-stimulated maturation of Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, p 5172-5.

CHUANG, L.M., MYERS, M.G., JR., BACKER, J.M., SHOELSON, S.E., WHITE, M.F., BIRNBAUM, M.J., KAHN, C.R. (1993b). Insulin-stimulated oocyte maturation requires insulin receptor substrate 1 and interaction with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, p 6653-60.

CICIRELLI, M.F., SMITH, L.D. (1985). Cyclic AMP levels during the maturation of Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **108**, p 254-8.

CICIRELLI, M.F., TONKS, N.K., DILTZ, C.D., WEIEL, J.E., FISCHER, E.H., KREBS, E.G. (1990). Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, p 5514-8.

COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, **270**, p 14843-6.

COHEN, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*, **25**, p 596-601.

COULOMBE, P., MELOCHE, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, p 1376-87.

COWLEY, S., PATERSON, H., KEMP, P., MARSHALL, C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, **77**, p 841-52.

CRITTENDEN, S.L., ECKMANN, C.R., WANG, L., BERNSTEIN, D.S., WICKENS, M., KIMBLE, J. (2003). Regulation of the mitosis/meiosis decision in the Caenorhabditis elegans germline. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, p 1359-62.

CROSS, D.A., ALESSI, D.R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M., HEMMINGS, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, p 785-9.

CROSS, D.A., SMYTHE, C. (1998). PD 98059 prevents establishment of the spindle assembly checkpoint and inhibits the G2-M transition in meiotic but not mitotic cell cycles in Xenopus. *Exp Cell Res*, **241**, p 12-22.

DAAR, I., PAULES, R.S., VANDE WOUDE, G.F. (1991). A characterization of cytostatic factor activity from Xenopus eggs and c-mos-transformed cells. *J Cell Biol*, **114**, p 329-35.

DAAR, I., YEW, N., VANDE WOUDE, G.F. (1993). Inhibition of mos-induced oocyte maturation by protein kinase A. *J Cell Biol*, **120**, p 1197-202.

DAVIS, D., SADLER, S.E. (1992). Analysis of the p21 ras system during development of meiotic competence in Xenopus laevis oocytes. *Dev Biol*, **149**, p 1-7.

DE BONDT, H.L., ROSENBLATT, J., JANCARIK, J., JONES, H.D., MORGAN, D.O., KIM, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, p 595-602.

DE MOOR, C.H., RICHTER, J.D. (1997). The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. *Mol Cell Biol*, **17**, p 6419-26.

DE MOOR, C.H., RICHTER, J.D. (2001). Translational control in vertebrate development. *Int Rev Cytol*, **203**, p 567-608.

DENG, J., LANG, S., WYLIE, C., HAMMES, S.R. (2008). The Xenopus laevis isoform of G protein-coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in X. laevis oocytes. *Mol Endocrinol*, **22**, p 1853-65.

DERUA, R., STEVENS, I., WAELKENS, E., FERNANDEZ, A., LAMB, N., MERLEVEDE, W., GORIS, J. (1997). Characterization and physiological importance of a novel cell cycle regulated protein kinase in Xenopus laevis oocytes that phosphorylates cyclin B2. *Exp Cell Res*, **230**, p 310-24.

DESHPANDE, A.K., KUNG, H.F. (1987). Insulin induction of Xenopus laevis oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. *Mol Cell Biol*, **7**, p 1285-8.

DEUTER-REINHARD, M., APELL, G., POT, D., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L.T., KAVANAUGH, W.M. (1997). SIP/SHIP inhibits Xenopus oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, p 2559-65.

DEVAULT, A., MARTINEZ, A.M., FESQUET, D., LABBE, J.C., MORIN, N., TASSAN, J.P., NIGG, E.A., CAVADORE, J.C., DOREE, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. *Embo J*, **14**, p 5027-36.

DHAR, R., PERSAUD, S.D., MIRELES, J.R., BASU, A. (2009). Proteolytic cleavage of p70 ribosomal S6 kinase by caspase-3 during DNA damage-induced apoptosis. *Biochemistry*, **48**, p 1474-80.

DHILLON, A.S., HAGAN, S., RATH, O., KOLCH, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, **26**, p 3279-90.

DICKSON, K.S., BILGER, A., BALLANTYNE, S., WICKENS, M.P. (1999). The cleavage and polyadenylation specificity factor in Xenopus laevis oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Mol Cell Biol*, **19**, p 5707-17.

DOMINGUEZ, I., DIAZ-MECO, M.T., MUNICIO, M.M., BERRA, E., GARCIA DE HERREROS, A., CORNET, M.E., SANZ, L., MOSCAT, J. (1992). Evidence for a role of protein kinase C zeta subspecies in maturation of Xenopus laevis oocytes. *Mol Cell Biol*, **12**, p 3776-83.

DONADELLI, M., DALLA POZZA, E., COSTANZO, C., SCUPOLI, M.T., SCARPA, A., PALMIERI, M. (2008). Zinc depletion efficiently inhibits pancreatic cancer cell growth by increasing the ratio of antiproliferative/proliferative genes. *J Cell Biochem*, **104**, p 202-12.

DOREE, M., HUNT, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci*, **115**, p 2461-4.

DOWNWARD, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, p 11-22.

DRURY, K.C., SCHORDERET-SLATKINE, S. (1975). Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of Xenopus laevis. *Cell*, **4**, p 269-74.

DUCKWORTH, B.C., WEAVER, J.S., RUDERMAN, J.V. (2002). G2 arrest in Xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, p 16794-9.

DUESBERY, N.S., WEBB, C.P., LEPPLA, S.H., GORDON, V.M., KLIMPEL, K.R., COPELAND, T.D., AHN, N.G., OSKARSSON, M.K., FUKASAWA, K., PAULL, K.D., VANDE WOUDE, G.F. (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, **280**, p 734-7.

DUMONT, J.N. (1972). Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, **136**, p 153-79.

DUNPHY, W.G., KUMAGAI, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, **67**, p 189-96.

DUPRE, A., JESSUS, C., OZON, R., HACCARD, O. (2002a). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Embo J*, **21**, p 4026-36.

DUPRE, A., SUZIEDELIS, K., VALUCKAITE, R., DE GUNZBURG, J., OZON, R., JESSUS, C., HACCARD, O. (2002b). Xenopus H-RasV12 promotes entry into meiotic M phase and cdc2 activation independently of Mos and p42(MAPK). *Oncogene*, **21**, p 6425-33.

EAGLE, G.R., ZOMBOLA, R.R., HIMES, R.H. (1983). Tubulin-zinc interactions: binding and polymerization studies. *Biochemistry*, **22**, p 221-8.

EBISUYA, M., KONDOH, K., NISHIDA, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci*, **118**, p 2997-3002.

EICHHORN, P.J., CREYGHTON, M.P., BERNARDS, R. (2009). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1795**, p 1-15.

EL-ETR, M., SCHORDERET-SLATKINE, S., BAULIEU, E.E. (1979). Meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes initiated by insulin. *Science*, **205**, p 1397-9.

ENDICOTT, J.A., NOBLE, M.E., TUCKER, J.A. (1999). Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, p 738-44.

ERIKSON, E., MALLER, J.L. (1985). A protein kinase from Xenopus eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, p 742-6.

ERIKSON, E., MALLER, J.L. (1989). Biochemical characterization of the p34cdc2 protein kinase component of purified maturation-promoting factor from Xenopus eggs. *J Biol Chem*, **264**, p 19577-82.

EVANS, T., ROSENTHAL, E.T., YOUNGBLOM, J., DISTEL, D., HUNT, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **33**, p 389-96.

EVAUL, K., JAMNONGJIT, M., BHAGAVATH, B., HAMMES, S.R. (2007). Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in Xenopus laevis oocytes by signaling through classical steroid receptors. *Mol Endocrinol*, **21**, p 186-96.

EYERS, P.A., LIU, J., HAYASHI, N.R., LEWELLYN, A.L., GAUTIER, J., MALLER, J.L. (2005). Regulation of the G(2)/M transition in Xenopus oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **280**, p 24339-46.

FABIAN, J.R., DAAR, I.O., MORRISON, D.K. (1993a). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, p 7170-9.

FABIAN, J.R., MORRISON, D.K., DAAR, I.O. (1993b). Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. *J Cell Biol*, **122**, p 645-52.

FALCHUK, K.H., KRISHAN, A. (1977). 1,10-Phenanthroline inhibition of lymphoblast cell cycle. *Cancer Res*, **37**, p 2050-6.

FALCHUK, K.H., MONTORZI, M. (2001). Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals*, **14**, p 385-95.

FAN, H.Y., TONG, C., LIAN, L., LI, S.W., GAO, W.X., CHENG, Y., CHEN, D.Y., SCHATTEN, H., SUN, Q.Y. (2003). Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol Reprod*, **68**, p 968-77.

FAN, H.Y., SUN, Q.Y. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, **70**, p 535-47.

FANG, G., YU, H., KIRSCHNER, M.W. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell*, **2**, p 163-71.

FAROOQ, A., PLOTNIKOVA, O., CHATURVEDI, G., YAN, S., ZENG, L., ZHANG, Q., ZHOU, M.M. (2003). Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP. *Structure*, **11**, p 155-64.

FAROOQ, A., ZHOU, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*, **16**, p 769-79.

FARUKI, S., DOREE, M., KARSENTI, E. (1992). cdc2 kinase-induced destabilization of MAP2-coated microtubules in Xenopus egg extracts. *J Cell Sci*, **101 (Pt 1)**, p 69-78.

FAURE, R., VINCENT, M., DUFOUR, M., SHAVER, A., POSNER, B.I. (1995). Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J Cell Biochem*, **59**, p 389-401.

FAURE, S., MORIN, N., DOREE, M. (1998). Inactivation of protein kinase A is not required for c-mos translation during meiotic maturation of Xenopus oocytes. *Oncogene*, **17**, p 1215-21.

FEATHERSTONE, C., RUSSELL, P. (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*, **349**, p 808-11.

FELIX, M.A., PINES, J., HUNT, T., KARSENTI, E. (1989). A post-ribosomal supernatant from activated Xenopus eggs that displays post-translationally regulated oscillation of its cdc2+ mitotic kinase activity. *Embo J*, **8**, p 3059-69.

FELIX, M.A., COHEN, P., KARSENTI, E. (1990a). Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the Xenopus early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. *Embo J*, **9**, p 675-83.

FELIX, M.A., LABBE, J.C., DOREE, M., HUNT, T., KARSENTI, E. (1990b). Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature*, **346**, p 379-82.

FELLOUS, A., KUBELKA, M., THIBIER, C., TAIEB, F., HACCARD, O., JESSUS, C. (1994). Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. *Int J Dev Biol*, **38**, p 651-9.

FERBY, I., BLAZQUEZ, M., PALMER, A., ERITJA, R., 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**, p 2177-89.

FERRELL, J.E., XIONG, W. (2001). Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos*, **11**, p 227-236.

FERRELL, J.E., JR., WU, M., GERHART, J.C., MARTIN, G.S. (1991). Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs. *Mol Cell Biol*, **11**, p 1965-71.

FERRELL, J.E., JR. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, **21**, p 460-6.

FERRELL, J.E., JR., BHATT, R.R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, p 19008-16.

FERRELL, J.E., JR., MACHLEDER, E.M. (1998). The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in Xenopus oocytes. *Science*, **280**, p 895-8.

FERRELL, J.E., JR. (1999a). Building a cellular switch: more lessons from a good egg. *Bioessays*, **21**, p 866-70.

FERRELL, J.E., JR. (1999b). Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays*, **21**, p 833-42.

FERRELL, J.E., JR. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, p 140-8.

FERRELL, J.E., JR., POMERENING, J.R., KIM, S.Y., TRUNNELL, N.B., XIONG, W., HUANG, C.Y., MACHLEDER, E.M. (2009). Simple, realistic models of complex biological processes: positive feedback and bistability in a cell fate switch and a cell cycle oscillator. *FEBS Lett*, **583**, p 3999-4005.

FESQUET, D., LABBE, J.C., DERANCOURT, J., CAPONY, J.P., GALAS, S., GIRARD, F., LORCA, T., SHUTTLEWORTH, J., DOREE, M., CAVADORE, J.C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J*, **12**, p 3111-21.

FESQUET, D., FITZPATRICK, P.J., JOHNSON, A.L., KRAMER, K.M., TOYN, J.H., JOHNSTON, L.H. (1999). A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *Embo J*, **18**, p 2424-34.

FINIDORI-LEPICARD, J., SCHORDERET-SLATKINE, S., HANOUNE, J., BAULIEU, E.E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in Xenopus laevis oocytes. *Nature*, **292**, p 255-7.

FISHER, D.L., MORIN, N., DOREE, M. (1999a). A novel role for glycogen synthase kinase-3 in Xenopus development: maintenance of oocyte cell cycle arrest by a beta-catenin-independent mechanism. *Development*, **126**, p 567-76.

FISHER, D.L., BRASSAC, T., GALAS, S., DOREE, M. (1999b). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of Xenopus oocytes. *Development*, **126**, p 4537-46.

FISHER, D.L., MANDART, E., DOREE, M. (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in Xenopus oocytes. *Embo J*, **19**, p 1516-24.

FISHER, R.P., MORGAN, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, p 713-24.

FLAMENT, S., BODART, J.F., BERTOUT, M., BROWAEYS, E., ROUSSEAU, A., VILAIN, J.P. (2000). Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on Xenopus oocytes and eggs. *Zygote*, **8**, p 3-14.

FORRISTALL, C., PONDEL, M., CHEN, L., KING, M.L. (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development*, **121**, p 201-8.

FORTUNE, J.E., CONCANNON, P.W., HANSEL, W. (1975). Ovarian progesterone levels during in vitro oocyte maturation and ovulation in Xenopus laevis. *Biol Reprod*, **13**, p 561-7.

FOX, C.A., SHEETS, M.D., WICKENS, M.P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev*, **3**, p 2151-62.

FRANK-VAILLANT, M., JESSUS, C., OZON, R., MALLER, J.L., 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**, p 3279-88.

FRASCHINI, R., FORMENTI, E., LUCCHINI, G., PIATTI, S. (1999). Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol*, **145**, p 979-91.

FREEMAN, M. (2000). Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature*, **408**, p 313-9.

FREEMAN, R.S., PICKHAM, K.M., KANKI, J.P., LEE, B.A., PENA, S.V., DONOGHUE, D.J. (1989). Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, p 5805-9.

FREEMAN, R.S., MEYER, A.N., LI, J., DONOGHUE, D.J. (1992). Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J Cell Biol*, **116**, p 725-35.

FREMIN, C., EZAN, F., BOISSELIER, P., BESSARD, A., PAGES, G., POUYSSEGUR, J., BAFFET, G. (2007). ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology*, **45**, p 1035-45.

FREMIN, C., BESSARD, A., EZAN, F., GAILHOUSTE, L., REGEARD, M., LE SEYEC, J., GILOT, D., PAGES, G., POUYSSEGUR, J., LANGOUET, S., BAFFET, G. (2009). Multiple division cycles and long-term survival of hepatocytes are distinctly regulated by extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2. *Hepatology*, **49**, p 930-9.

FUELLER, J., BECKER, M., SIENERTH, A.R., FISCHER, A., HOTZ, C., GALMICHE, A. (2008). C-RAF activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, **370**, p 552-6.

FUKASAWA, K., VANDE WOUDE, G.F. (1995). Mos overexpression in Swiss 3T3 cells induces meiotic-like alterations of the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, p 3430-4.

FUKASAWA, K., VANDE WOUDE, G.F. (1997). Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol*, **17**, p 506-18.

FURUNO, N., NISHIZAWA, M., OKAZAKI, K., TANAKA, H., IWASHITA, J., NAKAJO, N., OGAWA, Y., SAGATA, N. (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in Xenopus oocytes. *Embo J*, **13**, p 2399-410.

FURUNO, N., KAWASAKI, A., SAGATA, N. (2003). Expression of cell-cycle regulators during Xenopus oogenesis. *Gene Expr Patterns*, **3**, p 165-8.

FUTCHER, B., LEATHERWOOD, J.K. (2008). Molecular biology: Bound to splice. *Nature*, **455**, p 885-6.

GAFFRE, M., DUPRE, A., VALUCKAITE, R., SUZIEDELIS, K., JESSUS, C., HACCARD, O. (2006). Deciphering the H-Ras pathway in Xenopus oocyte. *Oncogene*, **25**, p 5155-62.

GALLO, C.J., HAND, A.R., JONES, T.L., JAFFE, L.A. (1995). Stimulation of Xenopus oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *J Cell Biol*, **130**, p 275-84.

GARD, D.L. (1992). Microtubule organization during maturation of Xenopus oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev Biol*, **151**, p 516-30.

GARD, D.L., CHA, B.J., ROEDER, A.D. (1995). F-actin is required for spindle anchoring and rotation in Xenopus oocytes: a re-examination of the effects of cytochalasin B on oocyte maturation. *Zygote*, **3**, p 17-26.

GAUTIER, J., NORBURY, C., LOHKA, M., NURSE, P., 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**, p 433-9.

GAUTIER, J., MINSHULL, J., LOHKA, M., GLOTZER, M., HUNT, T., MALLER, J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus. *Cell*, **60**, p 487-94.

GAUTIER, J., MALLER, J.L. (1991). Cyclin B in Xenopus oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *Embo J*, **10**, p 177-82.

GAVET, O., PINES, J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*, **189**, p 247-59.

GAVET, O., PINES, J. (2010). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*, **189**, p 247-59.

GEBAUER, F., XU, W., COOPER, G.M., RICHTER, J.D. (1994). Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *Embo J*, **13**, p 5712-20.

GEBAUER, F., RICHTER, J.D. (1997). Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bioessays*, **19**, p 23-8.

GELERSTEIN, S., SHAPIRA, H., DASCAL, N., YEKUEL, R., ORON, Y. (1988). Is a decrease in cyclic AMP a necessary and sufficient signal for maturation of amphibian oocytes? *Dev Biol*, **127**, p 25-32.

GODEAU, J.F., SCHORDERET-SLATKINE, S., HUBERT, P., BAULIEU, E.E. (1978). Induction of maturation in Xenopus laevis oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, p 2353-7.

GOLDBETER, A., KOSHLAND, D.E., JR. (1981). An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, p 6840-4.

GOLDBETER, A. (1991). A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, p 9107-11.

GOODHARDT, M., FERRY, N., BUSCAGLIA, M., BAULIEU, E.E., HANOUNE, J. (1984). Does the guanine nucleotide regulatory protein Ni mediate progesterone inhibition of Xenopus oocyte adenylate cyclase? *Embo J*, **3**, p 2653-7.

GORBSKY, G.J., CHEN, R.H., MURRAY, A.W. (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol*, **141**, p 1193-205.

GORDO, A.C., HE, C.L., SMITH, S., FISSORE, R.A. (2001). Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, **59**, p 106-14.

GORIS, J., HERMANN, J., HENDRIX, P., OZON, R., MERLEVEDE, W. (1989). Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in Xenopus laevis oocytes. *FEBS Lett*, **245**, p 91-4.

GOTOH, Y., MORIYAMA, K., MATSUDA, S., OKUMURA, E., KISHIMOTO, T., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., YAHARA, I., SAKAI, H., NISHIDA, E. (1991). Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *Embo J*, **10**, p 2661-8.

GOTOH, Y., NISHIDA, E. (1995a). Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol Reprod Dev*, **42**, p 486-92.

GOTOH, Y., NISHIDA, E. (1995b). The MAP kinase cascade: its role in Xenopus oocytes, eggs and embryos. *Prog Cell Cycle Res*, **1**, p 287-97.

GOTOH, Y., MASUYAMA, N., DELL, K., SHIRAKABE, K., NISHIDA, E. (1995). Initiation of Xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, **270**, p 25898-904.

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

GROIGNO, L., BONNEC, G., WOLFF, J., JOLY, J., BOUJARD, D. (1996). Insulin-like growth factor I receptor messenger expression during oogenesis in Xenopus laevis. *Endocrinology*, **137**, p 3856-63.

GROOM, L.A., SNEDDON, A.A., ALESSI, D.R., DOWD, S., KEYSE, S.M. (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J*, **15**, p 3621-32.

GROSS, S.D., SCHWAB, M.S., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science*, **286**, p 1365-7.

GROSS, S.D., SCHWAB, M.S., TAIEB, F.E., LEWELLYN, A.L., QIAN, Y.W., 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**, p 430-8.

GROSS, S.D., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **276**, p 46099-103.

GU, W., DENG, Y., ZENKLUSEN, D., SINGER, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*, **18**, p 1452-65.

GUAN, K.L., FIGUEROA, C., BRTVA, T.R., ZHU, T., TAYLOR, J., BARBER, T.D., VOJTEK, A.B. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem*, **275**, p 27354-9.

GUO, X.W., TH'NG, J.P., SWANK, R.A., ANDERSON, H.J., TUDAN, C., BRADBURY, E.M., ROBERGE, M. (1995). Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *Embo J*, **14**, p 976-85.

GUO, Z., DUNPHY, W.G. (2000). Response of Xenopus Cds1 in cell-free extracts to DNA templates with double-stranded ends. *Mol Biol Cell*, **11**, p 1535-46.

GUPTA, R.C., NEUMANN, J., WATANABE, A.M., LESCH, M., SABBAH, H.N. (1996). Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol*, **270**, p H1159-64.

GUTIERREZ, G.J., VOGTLIN, A., CASTRO, A., FERBY, I., SALVAGIOTTO, G., RONAI, Z., LORCA, T., NEBREDA, A.R. (2006). Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation. *Nat Cell Biol*, **8**, p 1084-94.

GUTTRIDGE, K.L., SMITH, L.D., MILEDI, R. (1995). Xenopus Gq alpha subunit activates the phosphatidylinositol pathway in Xenopus oocytes but does not consistently induce oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, p 1297-301.

GUZMAN, L., ROMO, X., GRANDY, R., SOTO, X., MONTECINO, M., HINRICHS, M., OLATE, J. (2004). A Gbetagamma stimulated adenylyl cyclase is involved in xenopus laevis oocyte maturation. *J Cell Physiol*.

HAASE, H., MARET, W. (2003). Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res*, **291**, p 289-98.

HACCARD, O., JESSUS, C., CAYLA, X., GORIS, J., MERLEVEDE, W., OZON, R. (1990). In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the Xenopus oocyte. *Eur J Biochem*, **192**, p 633-42.

HACCARD, O., SARCEVIC, B., LEWELLYN, A., HARTLEY, R., ROY, L., IZUMI, T., ERIKSON, E., MALLER, J.L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. *Science*, **262**, p 1262-5.

HACCARD, O., LEWELLYN, A., HARTLEY, R.S., ERIKSON, E., MALLER, J.L. (1995). Induction of Xenopus oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol*, **168**, p 677-82.

HACCARD, O., JESSUS, C. (2006a). Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle*, **5**, p 1152-9.

HACCARD, O., JESSUS, C. (2006b). Redundant pathways for Cdc2 activation in Xenopus oocyte: either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep*, **7**, p 321-5.

HADWIGER, J.A., WITTENBERG, C., RICHARDSON, H.E., DE BARROS LOPES, M., REED, S.I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, p 6255-9.

HAGTING, A., JACKMAN, M., SIMPSON, K., PINES, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, **9**, p 680-9.

HAINAUT, P., KOWALSKI, A., GIORGETTI, S., BARON, V., VAN OBBERGHEN, E. (1991a). Insulin and insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) receptors in Xenopus laevis oocytes. Comparison with insulin receptors from liver and muscle. *Biochem J*, **273 (Pt 3)**, p 673-8.

HAINAUT, P., KOWALSKI, A., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., GIORGETTI, S., GAUTIER, N., VAN OBBERGHEN, E. (1991b). Effects of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and progesterone on glucose and amino acid uptake in Xenopus laevis oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, **75**, p 133-9.

HAKE, L.E., RICHTER, J.D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Cell*, **79**, p 617-27.

HAN, J.K., FUKAMI, K., NUCCITELLI, R. (1992). Reducing inositol lipid hydrolysis, Ins(1,4,5)P3 receptor availability, or Ca2+ gradients lengthens the duration of the cell cycle in Xenopus laevis blastomeres. *J Cell Biol*, **116**, p 147-56.

HANLON, N., BARFORD, D. (1998). Purification and crystallization of the CDK-associated protein phosphatase KAP expressed in Escherichia coli. *Protein Sci*, **7**, p 508-11.

HANNON, G.J., CASSO, D., BEACH, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, p 1731-5.

HANOCQ-QUERTIER, J., BALTUS, E. (1981). Phosphorylation of ribosomal proteins during maturation of Xenopus laevis oocytes. *Eur J Biochem*, **120**, p 351-5.

HARTLEY, R.S., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (1994). MAP kinase is activated during mesoderm induction in Xenopus laevis. *Dev Biol*, **163**, p 521-4.

HARTWELL, L.H., HOPFIELD, J.J., LEIBLER, S., MURRAY, A.W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, **402**, p C47-52.

HARVEY, C.D., EHRHARDT, A.G., CELLURALE, C., ZHONG, H., YASUDA, R., DAVIS, R.J., SVOBODA, K. (2008). A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, p 19264-9.

HATCH, K.R., CAPCO, D.G. (2001). Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural elements of the mouse egg: potentiation of MAP kinase activity by CaM KII. *Mol Reprod Dev*, **58**, p 69-77.

HEALD, R., MCKEON, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*, **61**, p 579-89.

HEALD, R., TOURNEBIZE, R., BLANK, T., SANDALTZOPOULOS, R., BECKER, P., HYMAN, A., KARSENTI, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts. *Nature*, **382**, p 420-5.

HEALD, R., TOURNEBIZE, R., HABERMANN, A., KARSENTI, E., HYMAN, A. (1997). Spindle assembly in Xenopus egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol*, **138**, p 615-28.

HEGARAT, L.L., ORSIERE, T., BOTTA, A., FESSARD, V. (2005). Okadaic acid: chromosomal non-disjunction analysis in human lymphocytes and study of aneugenic pathway in CHO-K1 cells. *Mutat Res*, **578**, p 53-63.

HEHL, S., STOYANOV, B., OEHRL, W., SCHONHERR, R., WETZKER, R., HEINEMANN, S.H. (2001). Phosphoinositide 3-kinase-gamma induces Xenopus oocyte maturation via lipid kinase activity. *Biochem J*, **360**, p 691-8.

HEIDECKER, G., HULEIHEL, M., CLEVELAND, J.L., KOLCH, W., BECK, T.W., LLOYD, P., PAWSON, T., RAPP, U.R. (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol*, **10**, p 2503-12.

HILL, A.V. (1910). The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxidei. *J. Physiol.*, **40:iv–vii**.

HOCHEGGER, H., KLOTZBUCHER, A., KIRK, J., HOWELL, M., LE GUELLEC, K., FLETCHER, K., DUNCAN, T., SOHAIL, M., HUNT, T. (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. *Development*, **128**, p 3795-807.

HOFFMANN, I., CLARKE, P.R., MARCOTE, M.J., KARSENTI, E., 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**, p 53-63.

HOFFMANN, I., DRAETTA, G., KARSENTI, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *Embo J*, **13**, p 4302-10.

HOFMANN, I., SCHNOLZER, M., KAUFMANN, I., FRANKE, W.W. (2002). Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in Xenopus laevis oocytes. *Mol Biol Cell*, **13**, p 1665-76.

HORNBERG, J.J., BRUGGEMAN, F.J., BINDER, B., GEEST, C.R., DE VAATE, A.J., LANKELMA, J., HEINRICH, R., WESTERHOFF, H.V. (2005). Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. *Febs J*, **272**, p 244-58.

HORNE, M.M., GUADAGNO, T.M. (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol*, **161**, p 1021-8.

HOWARD, E.L., CHARLESWORTH, A., WELK, J., MACNICOL, A.M. (1999). The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, **19**, p 1990-9.

HUANG, C.Y., FERRELL, J.E., JR. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, p 10078-83.

HUANG, W., KESSLER, D.S., ERIKSON, R.L. (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell*, **6**, p 237-45.

HUCHON, D., OZON, R., DEMAILLE, J.G. (1981a). Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation. *Nature*, **294**, p 358-9.

HUCHON, D., CROZET, N., CANTENOT, N., OZON, R. (1981b). Germinal vesicle breakdown in the Xenopus laevis oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod Nutr Dev*, **21**, p 135-48.

HUCHON, D., OZON, R., FISCHER, E.H., DEMAILLE, J.G. (1981c). [Meiotic maturation of the ovocyte of Xenopus laevis : a 4-step mechanism]. *C R Seances Acad Sci III*, **292**, p 65-7.

HUCHON, D., RIME, H., JESSUS, C., OZON, R. (1993). Control of metaphase I formation in Xenopus oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biol Cell*, **77**, p 133-41.

HUNT, T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol*, **2**, p 213-22.

HUTCHINS, J.R., DIKOVSKAYA, D., CLARKE, P.R. (2002). Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in Xenopus Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding. *FEBS Lett*, **528**, p 267-71.

HUTCHINS, J.R., DIKOVSKAYA, D., CLARKE, P.R. (2003). Regulation of Cdc2/cyclin B activation in Xenopus egg extracts via inhibitory phosphorylation of Cdc25C phosphatase by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein [corrected] kinase II. *Mol Biol Cell*, **14**, p 4003-14.

IGEA, A., MENDEZ, R. (2010). Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *Embo J*, **29**, p 2182-93.

INOUE, D., OHE, M., KANEMORI, Y., NOBUI, T., SAGATA, N. (2007). A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. *Nature*, **446**, p 1100-4.

ITOH, T.J., HISANAGA, S., HOSOI, T., KISHIMOTO, T., HOTANI, H. (1997). Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry*, **36**, p 12574-82.

IWABUCHI, M., OHSUMI, K., YAMAMOTO, T.M., SAWADA, W., 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**, p 4513-23.

IZUMI, T., MALLER, J.L. (1991). Phosphorylation of Xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol*, **11**, p 3860-7.

IZUMI, T., WALKER, D.H., MALLER, J.L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell*, **3**, p 927-39.

IZUMI, T., MALLER, J.L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*, **4**, p 1337-50.

JACOBELLI, S., HANOCQ, J., BALTUS, E., BRACHET, J. (1974). Hormone-induced maturation of Xenopus laevis oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor. *Differentiation*, **2**, p 129-35.

JANICOT, M., FLORES-RIVEROS, J.R., LANE, M.D. (1991). The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in Xenopus laevis oocytes. *J Biol Chem*, **266**, p 9382-91.

JEFFREY, P.D., RUSSO, A.A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **376**, p 313-20.

JESSUS, C., RIME, H., HACCARD, O., VAN LINT, J., GORIS, J., MERLEVEDE, W., 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**, p 813-20.

JESSUS, C., OZON, R. (2004). How does Xenopus oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol Cell*, **96**, p 187-92.

JOHNSON, C.E., FREEL, C.D., KORNBLUTH, S. (2010). Features of programmed cell death in intact Xenopus oocytes and early embryos revealed by near-infrared fluorescence and real-time monitoring. *Cell Death Differ*, **17**, p 170-9.

JOHNSON, G.L., LAPADAT, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**, p 1911-2.

JOSEFSBERG BEN-YEHOSHUA, L., LEWELLYN, A.L., THOMAS, P., MALLER, J.L. (2007). The role of Xenopus membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Mol Endocrinol*, **21**, p 664-73.

JUSTMAN, Q.A., SERBER, Z., FERRELL, J.E., JR., EL-SAMAD, H., SHOKAT, K.M. (2009). Tuning the activation threshold of a kinase network by nested feedback loops. *Science*, **324**, p 509-12.

KAKIZUKA, A., SEBASTIAN, B., BORGMEYER, U., HERMANS-BORGMEYER, I., BOLADO, J., HUNTER, T., HOEKSTRA, M.F., EVANS, R.M. (1992). A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev*, **6**, p 578-90.

KALLIO, M., WEINSTEIN, J., DAUM, J.R., BURKE, D.J., GORBSKY, G.J. (1998). Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol*, **141**, p 1393-406.

KARAISKOU, A., JESSUS, C., BRASSAC, T., OZON, R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci*, **112 (Pt 21)**, p 3747-56.

KARAISKOU, A., DUPRE, A., HACCARD, O., JESSUS, C. (2001). From progesterone to active Cdc2 in Xenopus oocytes: a puzzling signalling pathway. *Biol Cell*, **93**, p 35-46.

KARAISKOU, A., LEPRETRE, A.C., PAHLAVAN, G., DU PASQUIER, D., OZON, R., JESSUS, C. (2004). Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. *Development*, **131**, p 1543-52.

KATSU, Y., YAMASHITA, M., NAGAHAMA, Y. (1999). Translational regulation of cyclin B mRNA by 17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing hormone) during oocyte maturation in a teleost fish, the goldfish (Carassius auratus). *Mol Cell Endocrinol*, **158**, p 79-85.

KEADY, B.T., KUO, P., MARTINEZ, S.E., YUAN, L., HAKE, L.E. (2007). MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in Xenopus oocytes. *J Cell Sci*, **120**, p 1093-103.

KEITH, C.T., BORISY, A.A., STOCKWELL, B.R. (2005). Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, p 71-8.

KESKIN, O., DURELL, S.R., BAHAR, I., JERNIGAN, R.L., COVELL, D.G. (2002). Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. *Biophys J*, **83**, p 663-80.

KHOLODENKO, B.N. (2000). Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur J Biochem*, **267**, p 1583-8.

KHOLODENKO, B.N. (2006). Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, p 165-76.

KIKUCHI, A., WILLIAMS, L.T. (1994). The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation. *J Biol Chem*, **269**, p 20054-9.

KIM, J.H., RICHTER, J.D. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*, **24**, p 173-83.

KIM, J.H., RICHTER, J.D. (2007). RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. *Genes Dev*, **21**, p 2571-9.

KIM, S.H., LIN, D.P., MATSUMOTO, S., KITAZONO, A., MATSUMOTO, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science*, **279**, p 1045-7.

KINDERMANN, B., DORING, F., PFAFFL, M., DANIEL, H. (2004). Identification of genes responsive to intracellular zinc depletion in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29. *J Nutr*, **134**, p 57-62.

KING, M.L., MESSITT, T.J., MOWRY, K.L. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell*, **97**, p 19-33.

KLOC, M., ETKIN, L.D. (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in Xenopus oocytes. *Development*, **121**, p 287-97.

KNOCKAERT, M., GRAY, N., DAMIENS, E., CHANG, Y.T., GRELLIER, P., GRANT, K., FERGUSSON, D., MOTTRAM, J., SOETE, M., DUBREMETZ, J.F., LE ROCH, K., DOERIG, C., SCHULTZ, P., MEIJER, L. (2000). Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol*, **7**, p 411-22.

KOBAYASHI, H., MINSHULL, J., FORD, C., GOLSTEYN, R., POON, R., HUNT, T. (1991a). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in Xenopus laevis. *J Cell Biol*, **114**, p 755-65.

KOBAYASHI, H., GOLSTEYN, R., POON, R., STEWART, E., GANNON, J., MINSHULL, J., SMITH, R., HUNT, T. (1991b). Cyclins and their partners during Xenopus oocyte maturation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, p 437-47.

KOHNO, M., POUYSSEGUR, J. (2006). Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med*, **38**, p 200-11.

KOLLMANN, M., LOVDOK, L., BARTHOLOME, K., TIMMER, J., SOURJIK, V. (2005). Design principles of a bacterial signalling network. *Nature*, **438**, p 504-7.

KORN, L.J., SIEBEL, C.W., MCCORMICK, F., ROTH, R.A. (1987). Ras p21 as a potential mediator of insulin action in Xenopus oocytes. *Science*, **236**, p 840-3.

KOSAKO, H., NISHIDA, E., GOTOH, Y. (1993). cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *Embo J*, **12**, p 787-94.

KOSAKO, H., GOTOH, Y., NISHIDA, E. (1994a). Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J Biol Chem*, **269**, p 28354-8.

KOSAKO, H., GOTOH, Y., NISHIDA, E. (1994b). Regulation and function of the MAP kinase cascade in Xenopus oocytes. *J Cell Sci Suppl*, **18**, p 115-9.

KOSAKO, H., GOTOH, Y., NISHIDA, E. (1994c). Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation. *Embo J*, **13**, p 2131-8.

KOTANI, T., YAMASHITA, M. (2002). Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol*, **252**, p 271-86.

KREK, W., NIGG, E.A. (1991a). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *Embo J*, **10**, p 305-16.

KREK, W., NIGG, E.A. (1991b). Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *Embo J*, **10**, p 3331-41.

KRISTJANSDOTTIR, K., SAFI, A., SHAH, C., RUDOLPH, J. (2006). Autophosphorylation of Ser66 on Xenopus Myt1 is a prerequisite for meiotic inactivation of Myt1. *Cell Cycle*, **5**, p 421-7.

KUERSTEN, S., GOODWIN, E.B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, **4**, p 626-37.

KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1991a). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell*, **64**, p 903-14.

KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1991b). Molecular mechanism of the final steps in the activation of MPF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, p 585-9.

KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts. *Cell*, **70**, p 139-51.

KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science*, **273**, p 1377-80.

KUMAGAI, A., YAKOWEC, P.S., DUNPHY, W.G. (1998a). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell*, **9**, p 345-54.

KUMAGAI, A., GUO, Z., EMAMI, K.H., WANG, S.X., DUNPHY, W.G. (1998b). The Xenopus Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J Cell Biol*, **142**, p 1559-69.

KUMAR, D., DUA, R., SRIKANTH, R., JAYASWAL, S., SIDDIQUI, Z., RAO, K.V. (2008). Cellular phosphatases facilitate combinatorial processing of receptor-activated signals. *BMC Res Notes*, **1**, p 81.

LAI, J.P., BAO, S., DAVIS, I.C., KNOELL, D.L. (2009). Inhibition of the phosphatase PTEN protects mice against oleic acid-induced acute lung injury. *Br J Pharmacol*, **156**, p 189-200.

LAURENT, A., BASSET, M., DOREE, M., LE PEUCH, C.J. (1988). Involvement of a calcium-phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of Xenopus laevis oocytes. *FEBS Lett*, **226**, p 324-30.

LAZAR, S., GALIANI, D., DEKEL, N. (2002). cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Mol Endocrinol*, **16**, p 331-41.

LEE, J., MIYANO, T., MOOR, R.M. (2000). Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*, **8**, p 119-25.

LEE, M.S., ENOCH, T., PIWNICA-WORMS, H. (1994). mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem*, **269**, p 30530-7.

LEES, E.M., HARLOW, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, p 1194-201.

LEEVERS, S.J., PATERSON, H.F., MARSHALL, C.J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, **369**, p 411-4.

LEFEBVRE, C., TERRET, M.E., DJIANE, A., RASSINIER, P., MARO, B., VERLHAC, M.H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle- stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol*, **157**, p 603-13.

LEFEBVRE, D., BONEY, C.M., KETELSLEGERS, J.M., THISSEN, J.P. (1999). Inhibition of insulin-like growth factor-I mitogenic action by zinc chelation is associated with a decreased mitogen-activated protein kinase activation in RAT-1 fibroblasts. *FEBS Lett*, **449**, p 284-8.

LEMAITRE, J.M., BOCQUET, S., MECHALI, M. (2002). Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation. *Nature*, **419**, p 718-22.

LENORMAND, J.L., DELLINGER, R.W., KNUDSEN, K.E., SUBRAMANI, S., DONOGHUE, D.J. (1999). Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *Embo J*, **18**, p 1869-77.

LEVIN-SALOMON, V., MAAYAN, I., AVRAHAMI-MOYAL, L., MARBACH, I., LIVNAH, O., ENGELBERG, D. (2009). When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem J*, **417**, p 331-40.

LEWIS, T., GROOM, L.A., SNEDDON, A.A., SMYTHE, C., KEYSE, S.M. (1995). XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from Xenopus laevis: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development. *J Cell Sci*, **108 (Pt 8)**, p 2885-96.

LI, Y., BENEZRA, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*, **274**, p 246-8.

LI, Y., GORBEA, C., MAHAFFEY, D., RECHSTEINER, M., BENEZRA, R. (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, p 12431-6.

LIANG, J.Y., LIU, Y.Y., ZOU, J., FRANKLIN, R.B., COSTELLO, L.C., FENG, P. (1999). Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate*, **40**, p 200-7.

LIEBERMAN, S.L., RUDERMAN, J.V. (2004). CK2 beta, which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev Biol*, **268**, p 271-9.

LIU, F., STANTON, J.J., WU, Z., PIWNICA-WORMS, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol*, **17**, p 571-83.

LIU, J., MALLER, J.L. (2005). Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol*, **15**, p 1458-68.

LIU, J., GRIMISON, B., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor Emi2 is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *J Biol Chem*, **281**, p 34736-41.

LIU, J.X., SINGH, B., WLODEK, D., ARLINGHAUS, R.B. (1990). Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene*, **5**, p 171-8.

LIU, X.J., SORISKY, A., ZHU, L., PAWSON, T. (1995). Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, **15**, p 3563-70.

LIU, Z., PATINO, R. (1993). High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of Xenopus oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod*, **49**, p 980-8.

LOHKA, M.J., HAYES, M.K., MALLER, J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, p 3009-13.

LOPEZ-HERNANDEZ, E., SANTOS, E. (1999). Oncogenic Ras-induced germinal vesicle breakdown is independent of phosphatidylinositol 3-kinase in Xenopus oocytes. *FEBS Lett*, **451**, p 284-8.

LORCA, T., GALAS, S., FESQUET, D., DEVAULT, A., CAVADORE, J.C., DOREE, M. (1991). Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca(2+)-calmodulin dependent event. *Embo J*, **10**, p 2087-93.

LORCA, T., LABBE, J.C., DEVAULT, A., FESQUET, D., CAPONY, J.P., CAVADORE, J.C., LE BOUFFANT, F., DOREE, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J*, **11**, p 2381-90.

LORCA, T., CRUZALEGUI, F.H., FESQUET, D., CAVADORE, J.C., MERY, J., MEANS, A., DOREE, M. (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of Xenopus eggs. *Nature*, **366**, p 270-3.

LORCA, T., CASTRO, A., MARTINEZ, A.M., VIGNERON, S., MORIN, N., SIGRIST, S., LEHNER, C., DOREE, M., LABBE, J.C. (1998). Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. *Embo J*, **17**, p 3565-75.

LUTZ, L.B., KIM, B., JAHANI, D., HAMMES, S.R. (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in Xenopus laevis oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J Biol Chem*, **275**, p 41512-20.

LUTZ, L.B., COLE, L.M., GUPTA, M.K., KWIST, K.W., AUCHUS, R.J., HAMMES, S.R. (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by Xenopus laevis ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, p 13728-33.

LUTZ, L.B., JAMNONGJIT, M., YANG, W.H., JAHANI, D., GILL, A., HAMMES, S.R. (2003). Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. *Mol Endocrinol*, **17**, p 1106-16.

MAKELA, T.P., TASSAN, J.P., NIGG, E.A., FRUTIGER, S., HUGHES, G.J., WEINBERG, R.A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**, p 254-7.

MALLER, J.L., 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**, p 1712-8.

MALLER, J.L., BUTCHER, F.R., KREBS, E.G. (1979). Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **254**, p 579-82.

MALLER, J.L., KOONTZ, J.W. (1981). A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. *Dev Biol*, **85**, p 309-16.

MALLER, J.L. (2001). The elusive progesterone receptor in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, p 8-10.

MALLER, J.L. (2003). Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science*, **300**, p 594-5.

MAMMADOVA, G., IWASAKI, T., TOKMAKOV, A.A., FUKAMI, Y., SATO, K. (2009). Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in sperm-induced tyrosine kinase signaling in Xenopus egg fertilization. *BMC Dev Biol*, **9**, p 68.

MANSOUR, S.J., RESING, K.A., CANDI, J.M., HERMANN, A.S., GLOOR, J.W., HERSKIND, K.R., WARTMANN, M., DAVIS, R.J., AHN, N.G. (1994). Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)*, **116**, p 304-14.

MARGOLIS, S.S., WALSH, S., WEISER, D.C., YOSHIDA, M., SHENOLIKAR, S., KORNBLUTH, S. (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J*, **22**, p 5734-45.

MARKEVICH, N.I., HOEK, J.B., KHOLODENKO, B.N. (2004). Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades. *J Cell Biol*, **164**, p 353-9.

MARKEVICH, N.I., TSYGANOV, M.A., HOEK, J.B., KHOLODENKO, B.N. (2006). Long-range signaling by phosphoprotein waves arising from bistability in protein kinase cascades. *Mol Syst Biol*, **2**, p 61.

MARTELLI, A.M., COCCO, L., CAPITANI, S., MISCIA, S., PAPA, S., MANZOLI, F.A. (2007). Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and PTen: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem*, **51 Suppl 1**, p 125-31.

MARTINEZ, S., PASTEN, P., SUAREZ, K., GARCIA, A., NUALART, F., MONTECINO, M., HINRICHS, M.V., OLATE, J. (2007). Classical Xenopus laevis progesterone receptor associates to the plasma membrane through its ligand-binding domain. *J Cell Physiol*, **211**, p 560-7.

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**, p 365-75.

MASUI, Y., MARKERT, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*, **177**, p 129-45.

MATON, G., LORCA, T., GIRAULT, J.A., OZON, R., JESSUS, C. (2005). Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. *J Cell Sci*, **118**, p 2485-94.

MATSUNAGA, Y., KAWAI, Y., KOHDA, Y., GEMBA, M. (2005). Involvement of activation of NADPH oxidase and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in renal cell injury induced by zinc. *J Toxicol Sci*, **30**, p 135-44.

MATTEN, W., DAAR, I., VANDE WOUDE, G.F. (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, **14**, p 4419-26.

MATTEN, W.T., COPELAND, T.D., AHN, N.G., VANDE WOUDE, G.F. (1996). Positive feedback between MAP kinase and Mos during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol*, **179**, p 485-92.

MCGREW, L.L., DWORKIN-RASTL, E., DWORKIN, M.B., RICHTER, J.D. (1989). Poly(A) elongation during Xenopus oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev*, **3**, p 803-15.

MEIJER, L., AZZI, L., WANG, J.Y. (1991). Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *Embo J*, **10**, p 1545-54.

MENDEZ, R., MURTHY, K.G., RYAN, K., MANLEY, J.L., RICHTER, J.D. (2000a). Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*, **6**, p 1253-9.

MENDEZ, R., HAKE, L.E., ANDRESSON, T., LITTLEPAGE, L.E., RUDERMAN, J.V., RICHTER, J.D. (2000b). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature*, **404**, p 302-7.

MENDEZ, R., RICHTER, J.D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, p 521-9.

MENDEZ, R., BARNARD, D., RICHTER, J.D. (2002). Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *Embo J*, **21**, p 1833-44.

MEYERHOF, P.G., MASUI, Y. (1977). Ca and Mg control of cytostatic factors from Rana pipiens oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. *Dev Biol*, **61**, p 214-29.

MILARSKI, K.L., DUNPHY, W.G., RUSSELL, P., GOULD, S.J., NEWPORT, J.W. (1991). Cloning and characterization of Xenopus cdc2, a component of MPF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, p 377-84.

MILLAR, J.B., BLEVITT, J., GERACE, L., SADHU, K., FEATHERSTONE, C., RUSSELL, P. (1991). p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, p 10500-4.

MINEO, C., ANDERSON, R.G., WHITE, M.A. (1997). Physical association with ras enhances activation of membrane-bound raf (RafCAAX). *J Biol Chem*, **272**, p 10345-8.

MINSHULL, J., BLOW, J.J., HUNT, T. (1989). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell*, **56**, p 947-56.

MINSHULL, J., MURRAY, A., COLMAN, A., HUNT, T. (1991). Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol*, **114**, p 767-72.

MINSHULL, J., SUN, H., TONKS, N.K., MURRAY, A.W. (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in Xenopus egg extracts. *Cell*, **79**, p 475-86.

MOCHIDA, S., HUNT, T. (2007). Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. *Nature*, **449**, p 336-40.

MOCHIDA, S., IKEO, S., GANNON, J., HUNT, T. (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts. *Embo J*, **28**, p 2777-85.

MOELLING, K., HEIMANN, B., BEIMLING, P., RAPP, U.R., SANDER, T. (1984). Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature*, **312**, p 558-61.

MOOD, K., BONG, Y.S., LEE, H.S., ISHIMURA, A., DAAR, I.O. (2004). Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in Xenopus oocytes. *Cell Signal*, **16**, p 631-42.

MORIN, N., ABRIEU, A., LORCA, T., MARTIN, F., DOREE, M. (1994). The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized Xenopus eggs. *Embo J*, **13**, p 4343-52.

MORITZ, M., BRAUNFELD, M.B., GUENEBAUT, V., HEUSER, J., AGARD, D.A. (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*, **2**, p 365-70.

MORRIS, M.C., HEITZ, A., MERY, J., HEITZ, F., DIVITA, G. (2000). An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins. *J Biol Chem*, **275**, p 28849-57.

MORRISON, D.K., HEIDECKER, G., RAPP, U.R., COPELAND, T.D. (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*, **268**, p 17309-16.

MORRISON, D.K., CUTLER, R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, p 174-9.

MUDA, M., BOSCHERT, U., DICKINSON, R., MARTINOU, J.C., MARTINOU, I., CAMPS, M., SCHLEGEL, W., ARKINSTALL, S. (1996). MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J Biol Chem*, **271**, p 4319-26.

MUELLER, P.R., COLEMAN, T.R., DUNPHY, W.G. (1995a). Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell*, **6**, p 119-34.

MUELLER, P.R., COLEMAN, T.R., KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1995b). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*, **270**, p 86-90.

MULNER-LORILLON, O., POULHE, R., CORMIER, P., LABBE, J.C., DOREE, M., BELLE, R. (1989). Purification of a p47 phosphoprotein from Xenopus laevis oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *FEBS Lett*, **251**, p 219-24.

MULNER, O., BELLE, R., OZON, R. (1983). cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the Xenopus oocyte: evidence for an intracellular feedback mechanism. *Mol Cell Endocrinol*, **31**, p 151-60.

MUMBY, M.C., WALTER, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev*, **73**, p 673-99.

MURAKAMI, M.S., VANDE WOUDE, G.F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of Xenopus; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos. *Development*, **125**, p 237-48.

MURRAY, A.W. (1989). Cyclin synthesis and degradation and the embryonic cell cycle. *J Cell Sci Suppl*, **12**, p 65-76.

MURRAY, A.W., KIRSCHNER, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, **339**, p 275-80.

MUSLIN, A.J., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L.T. (1993a). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is important for progesterone-induced Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, **13**, p 6661-6.

MUSLIN, A.J., MACNICOL, A.M., WILLIAMS, L.T. (1993b). Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced Xenopus oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol*, **13**, p 4197-202.

NAGAHAMA, Y. (1997). 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, **62**, p 190-6.

NAKAJIMA, H., TOYOSHIMA-MORIMOTO, F., TANIGUCHI, E., NISHIDA, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem*, **278**, p 25277-80.

NAKAJO, N., OE, T., UTO, K., SAGATA, N. (1999). Involvement of Chk1 kinase in prophase I arrest of Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **207**, p 432-44.

NAKAJO, N., YOSHITOME, S., IWASHITA, J., IIDA, M., UTO, K., UENO, S., OKAMOTO, K., SAGATA, N. (2000). Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *Genes Dev*, **14**, p 328-38.

NASH, P., TANG, X., ORLICKY, S., CHEN, Q., GERTLER, F.B., MENDENHALL, M.D., SICHERI, F., PAWSON, T., TYERS, M. (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, **414**, p 514-21.

NASSAR, N., HORN, G., HERRMANN, C., SCHERER, A., MCCORMICK, F., WITTINGHOFER, A. (1995). The 2.2 A crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, p 554-60.

NEBREDA, A.R., MARTIN-ZANCA, D., KAPLAN, D.R., PARADA, L.F., SANTOS, E. (1991). Induction by NGF of meiotic maturation of Xenopus oocytes expressing the trk proto-oncogene product. *Science*, **252**, p 558-61.

NEBREDA, A.R., HUNT, T. (1993). The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of Xenopus oocytes and eggs. *Embo J*, **12**, p 1979-86.

NEBREDA, A.R., GANNON, J.V., 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**, p 5597-607.

NEITHARDT, A., FARSHORI, M.P., SHAH, F.B., CATT, K.J., SHAH, B.H. (2006). Dependence of GnRH-induced phosphorylation of CREB and BAD on EGF receptor transactivation in GT1-7 neuronal cells. *J Cell Physiol*, **208**, p 586-93.

NELKIN, B., NICHOLS, C., VOGELSTEIN, B. (1980). Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes. *FEBS Lett*, **109**, p 233-8.

NEVIANI, P., SANTHANAM, R., TROTTA, R., NOTARI, M., BLASER, B.W., LIU, S., MAO, H., CHANG, J.S., GALIETTA, A., UTTAM, A., ROY, D.C., VALTIERI, M., BRUNER-KLISOVIC, R., CALIGIURI, M.A., BLOOMFIELD, C.D., MARCUCCI, G., PERROTTI, D. (2005). The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*, **8**, p 355-68.

NI, Q., TITOV, D.V., ZHANG, J. (2006). Analyzing protein kinase dynamics in living cells with FRET reporters. *Methods*, **40**, p 279-86.

NIEDERSTRASSER, H., SALEHI-HAD, H., GAN, E.C., WALCZAK, C., NOGALES, E. (2002). XKCM1 acts on a single protofilament and requires the C terminus of tubulin. *J Mol Biol*, **316**, p 817-28.

NILSSON, I., HOFFMANN, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*, **4**, p 107-14.

NISHIYAMA, T., OHSUMI, K., KISHIMOTO, T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. *Nature*, **446**, p 1096-9.

NISHIZAWA, M., OKAZAKI, K., FURUNO, N., WATANABE, N., SAGATA, N. (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *Embo J*, **11**, p 2433-46.

NISHIZAWA, M., FURUNO, N., OKAZAKI, K., TANAKA, H., OGAWA, Y., SAGATA, N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of Xenopus eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *Embo J*, **12**, p 4021-7.

NORBURY, C., BLOW, J., NURSE, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *Embo J*, **10**, p 3321-9.

NOVAK, B., TYSON, J.J. (1993). Numerical analysis of a comprehensive model of M-phase control in Xenopus oocyte extracts and intact embryos. *J Cell Sci*, **106 (Pt 4)**, p 1153-68.

NOVAK, B., PATAKI, Z., CILIBERTO, A., TYSON, J.J. (2001). Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos*, **11**, p 277-286.

NOVAK, B., TYSON, J.J. (2004). A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J Theor Biol*, **230**, p 563-79.

O'CONNOR, C.M., SMITH, L.D. (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev Biol*, **52**, p 318-22.

O'NEILL, E., KOLCH, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer*, **90**, p 283-8.

OE, T., NAKAJO, N., KATSURAGI, Y., OKAZAKI, K., SAGATA, N. (2001). Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **229**, p 250-61.

OHSUMI, K., SAWADA, W., KISHIMOTO, T. (1994). Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing Xenopus oocytes. *J Cell Sci*, **107 (Pt 11)**, p 3005-13.

OKANO, H., IMAI, T., OKABE, M. (2002). Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci*, **115**, p 1355-9.

OKANO, H., KAWAHARA, H., TORIYA, M., NAKAO, K., SHIBATA, S., IMAI, T. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res*, **306**, p 349-56.

OKUMURA, E., FUKUHARA, T., YOSHIDA, H., HANADA SI, S., KOZUTSUMI, R., MORI, M., TACHIBANA, K., KISHIMOTO, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol*, **4**, p 111-6.

OLATE, J., ALLENDE, C.C., ALLENDE, J.E., SEKURA, R.D., BIRNBAUMER, L. (1984). Oocyte adenylyl cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin. *FEBS Lett*, **175**, p 25-30.

OOKATA, K., HISANAGA, S., BULINSKI, J.C., MUROFUSHI, H., AIZAWA, H., ITOH, T.J., HOTANI, H., OKUMURA, E., TACHIBANA, K., KISHIMOTO, T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*, **128**, p 849-62.

OPRESKO, L.K., WILEY, H.S. (1990). Functional reconstitutional of the human epidermal growth factor receptor system in Xenopus oocytes. *J Cell Biol*, **111**, p 1661-71.

ORY, S., ZHOU, M., CONRADS, T.P., VEENSTRA, T.D., MORRISON, D.K. (2003). Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*, **13**, p 1356-64.

OSKARSSON, M., MCCLEMENTS, W.L., BLAIR, D.G., MAIZEL, J.V., VANDE WOUDE, G.F. (1980). Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus. *Science*, **207**, p 1222-4.

PADMANABHAN, K., RICHTER, J.D. (2006). Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes Dev*, **20**, p 199-209.

PALMER, A., GAVIN, A.C., 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**, p 5037-47.

PAN, B.T., COOPER, G.M. (1990). Role of phosphatidylinositide metabolism in ras-induced Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, **10**, p 923-9.

PAPIN, C., ROUGET, C., LORCA, T., CASTRO, A., MANDART, E. (2004). XCdh1 is involved in progesterone-induced oocyte maturation. *Dev Biol*, **272**, p 66-75.

PAPIN, J.A., HUNTER, T., PALSSON, B.O., SUBRAMANIAM, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, p 99-111.

PARIS, J., PHILIPPE, M. (1990). Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early Xenopus development. *Dev Biol*, **140**, p 221-4.

PARIS, J., SWENSON, K., PIWNICA-WORMS, H., RICHTER, J.D. (1991). Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. *Genes Dev*, **5**, p 1697-708.

PARKER, L.L., ATHERTON-FESSLER, S., PIWNICA-WORMS, H. (1992). p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, p 2917-21.

PASCREAU, G., DELCROS, J.G., CREMET, J.Y., PRIGENT, C., ARLOT-BONNEMAINS, Y. (2005). Phosphorylation of maskin by Aurora-A participates in the control of sequential protein synthesis during Xenopus laevis oocyte maturation. *J Biol Chem*, **280**, p 13415-23.

PATRA, D., DUNPHY, W.G. (1996). Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev*, **10**, p 1503-15.

PATRA, D., DUNPHY, W.G. (1998). Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase- promoting complex at mitosis. *Genes Dev*, **12**, p 2549-59.

PATRA, D., WANG, S.X., KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. (1999). The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem*, **274**, p 36839-42.

PAULES, R.S., BUCCIONE, R., MOSCHEL, R.C., VANDE WOUDE, G.F., EPPIG, J.J. (1989). Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, p 5395-9.

PAULOVICH, A.G., HARTWELL, L.H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in response to DNA damage. *Cell*, **82**, p 841-7.

PAYNE, D.M., ROSSOMANDO, A.J., MARTINO, P., ERICKSON, A.K., HER, J.H., SHABANOWITZ, J., HUNT, D.F., WEBER, M.J., STURGILL, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J*, **10**, p 885-92.

PELLAZ, V., SCHORDERET-SLATKINE, S. (1989). Evidence for a pertussis toxin-sensitive G protein involved in the control of meiotic reinitiation of Xenopus laevis oocytes. *Exp Cell Res*, **183**, p 245-50.

PERDIGUERO, E., PILLAIRE, M.J., BODART, J.F., HENNERSDORF, F., FRODIN, M., DUESBERY, N.S., ALONSO, G., NEBREDA, A.R. (2003). Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in Xenopus oocytes and activates Cdc25C. *Embo J*, **22**, p 5746-56.

PETER, M., NAKAGAWA, J., DOREE, M., LABBE, J.C., NIGG, E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, **61**, p 591-602.

PETER, M., SANGHERA, J.S., PELECH, S.L., NIGG, E.A. (1992). Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *Eur J Biochem*, **205**, p 287-94.

PETER, M., CASTRO, A., LORCA, T., LE PEUCH, C., MAGNAGHI-JAULIN, L., DOREE, M., LABBE, J.C. (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in Xenopus oocytes. *Nat Cell Biol*, **3**, p 83-7.

PETER, M., LABBE, J.C., DOREE, M., MANDART, E. (2002). A new role for Mos in Xenopus oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development*, **129**, p 2129-39.

PHAM, C.D., VUYYURU, V.B., YANG, Y., BAI, W., SINGH, B. (1999). Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene*, **18**, p 4287-94.

PICARD, A., GALAS, S., PEAUCELLIER, G., DOREE, M. (1996). Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *Embo J*, **15**, p 3590-8.

PINES, J., HUNTER, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J*, **13**, p 3772-81.

POON, R.Y., YAMASHITA, K., ADAMCZEWSKI, J.P., HUNT, T., SHUTTLEWORTH, J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J*, **12**, p 3123-32.

POON, R.Y., HUNTER, T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science*, **270**, p 90-3.

POSADA, J., SANGHERA, J., PELECH, S., AEBERSOLD, R., COOPER, J.A. (1991). Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **11**, p 2517-28.

POSADA, J., YEW, N., AHN, N.G., VANDE WOUDE, G.F., COOPER, J.A. (1993). Mos stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol*, **13**, p 2546-53.

PRASAD, C.K., MAHADEVAN, M., MACNICOL, M.C., MACNICOL, A.M. (2008). Mos 3' UTR regulatory differences underlie species-specific temporal patterns of Mos mRNA cytoplasmic polyadenylation and translational recruitment during oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, **75**, p 1258-68.

PROPST, F., VANDE WOUDE, G.F. (1985). Expression of c-mos proto-oncogene transcripts in mouse tissues. *Nature*, **315**, p 516-8.

QIAN, Y.W., ERIKSON, E., MALLER, J.L. (1998a). Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science*, **282**, p 1701-4.

QIAN, Y.W., ERIKSON, E., LI, C., MALLER, J.L. (1998b). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis. *Mol Cell Biol*, **18**, p 4262-71.

QIAN, Y.W., ERIKSON, E., TAIEB, F.E., MALLER, J.L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*, **12**, p 1791-9.

RADFORD, H.E., MEIJER, H.A., DE MOOR, C.H. (2008). Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, p 217-29.

RAMAN, M., CHEN, W., COBB, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, **26**, p 3100-12.

RAPP, U.R., GOLDSBOROUGH, M.D., MARK, G.E., BONNER, T.I., GROFFEN, J., REYNOLDS, F.H., JR., STEPHENSON, J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, p 4218-22.

RASAR, M., DEFRANCO, D.B., HAMMES, S.R. (2006). Paxillin regulates steroid-triggered meiotic resumption in oocytes by enhancing an all-or-none positive feedback kinase loop. *J Biol Chem*, **281**, p 39455-64.

RAUH, N.R., SCHMIDT, A., BORMANN, J., NIGG, E.A., MAYER, T.U. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*, **437**, p 1048-52.

RAVICHANDRAN, L.V., CHEN, H., LI, Y., QUON, M.J. (2001). Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol*, **15**, p 1768-80.

REIMANN, J.D., FREED, E., HSU, J.Y., KRAMER, E.R., PETERS, J.M., JACKSON, P.K. (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell*, **105**, p 645-55.

REVERTE, C.G., AHEARN, M.D., HAKE, L.E. (2001). CPEB degradation during Xenopus oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Dev Biol*, **231**, p 447-58.

REYNHOUT, J.K., SMITH, L.D. (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol*, **38**, p 394-400.

RICHTER, J.D., SMITH, L.D. (1981). Differential capacity for translation and lack of competition between mRNAs that segregate to free and membrane-bound polysomes. *Cell*, **27**, p 183-91.

RICHTER, J.D., WASSERMAN, W.J., SMITH, L.D. (1982). The mechanism for increased protein synthesis during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol*, **89**, p 159-67.

RICHTER, J.D. (1991). Translational control during early development. *Bioessays*, **13**, p 179-83.

RICHTER, J.D., SONENBERG, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, **433**, p 477-80.

RIME, H., HUCHON, D., JESSUS, C., GORIS, J., MERLEVEDE, W., OZON, R. (1990). Characterization of MPF activation by okadaic acid in Xenopus oocyte. *Cell Differ Dev*, **29**, p 47-58.

RIME, H., HACCARD, O., OZON, R. (1992). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic amp-dependent protein kinase in Xenopus oocytes. *Dev Biol*, **151**, p 105-10.

RIME, H., HUCHON, D., DE SMEDT, V., THIBIER, C., GALAKTIONOV, K., JESSUS, C., OZON, R. (1994). Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol Cell*, **82**, p 11-22.

RIME, H., JESSUS, C., OZON, R. (1995). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 is regulated by protein phosphatase 2A in growing immature Xenopus oocytes. *Exp Cell Res*, **219**, p 29-38.

RIOS-CARDONA, D., RICARDO-GONZALEZ, R.R., CHAWLA, A., FERRELL, J.E., JR. (2008). A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in Xenopus laevis oocytes. *Dev Biol*, **317**, p 380-8.

ROBERTS, P.J., DER, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, p 3291-310.

ROCHE, S., DOWNWARD, J., RAYNAL, P., COURTNEIDGE, S.A. (1998). A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol*, **18**, p 7119-29.

ROMO, X., HINRICHS, M.V., GUZMAN, L., OLATE, J. (2002). G(alpha)s levels regulate Xenopus laevis oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, **63**, p 104-9.

ROMO, X., PASTEN, P., MARTINEZ, S., SOTO, X., LARA, P., DE ARELLANO, A.R., TORREJON, M., MONTECINO, M., HINRICHS, M.V., OLATE, J. (2008). xRic-8 is a GEF for Gsalpha and participates in maintaining meiotic arrest in Xenopus laevis oocytes. *J Cell Physiol*, **214**, p 673-80.

ROY, L.M., SWENSON, K.I., WALKER, D.H., GABRIELLI, B.G., LI, R.S., PIWNICA-WORMS, H., MALLER, J.L. (1991). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A. *J Cell Biol*, **113**, p 507-14.

ROY, L.M., HACCARD, O., IZUMI, T., LATTES, B.G., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (1996). Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in Xenopus. *Oncogene*, **12**, p 2203-11.

RUMORA, L., HADZIJA, M., MAYSINGER, D., ZANIC-GRUBISIC, T. (2004). Positive regulation of ERK activation and MKP-1 expression by peroxovanadium complex bpV (phen). *Cell Biol Toxicol*, **20**, p 293-301.

RUSSO, C., BEAUJOIS, R., BODART, J.F., BLOSSEY, R. (2009). Kicked by Mos and tuned by MPF-the initiation of the MAPK cascade in Xenopus oocytes. *Hfsp J*, **3**, p 428-40.

SADHU, K., REED, S.I., RICHARDSON, H., RUSSELL, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, p 5139-43.

SADLER, S.E., MALLER, J.L. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in Xenopus oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem*, **256**, p 6368-73.

SADLER, S.E., MALLER, J.L. (1983). The development of competence for meiotic maturation during oogenesis in Xenopus laevis. *Dev Biol*, **98**, p 165-72.

SADLER, S.E., MALLER, J.L. (1987). In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in Xenopus oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem*, **262**, p 10644-50.

SADLER, S.E., MALLER, J.L. (1989). A similar pool of cyclic AMP phosphodiesterase in Xenopus oocytes is stimulated by insulin, insulin-like growth factor 1, and [Val12,Thr59]Ha-ras protein. *J Biol Chem*, **264**, p 856-61.

SADLER, S.E., ANGLESON, J.K., DSOUZA, M. (2010). IGF-1 receptors in Xenopus laevis ovarian follicle cells support the oocyte maturation response. *Biol Reprod*, **82**, p 591-8.

SAGATA, N., OSKARSSON, M., COPELAND, T., BRUMBAUGH, J., VANDE WOUDE, G.F. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Nature*, **335**, p 519-25.

SAGATA, N., WATANABE, N., VANDE WOUDE, G.F., IKAWA, Y. (1989a). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, **342**, p 512-8.

SAGATA, N., DAAR, I., OSKARSSON, M., SHOWALTER, S.D., VANDE WOUDE, G.F. (1989b). The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science*, **245**, p 643-6.

SAGATA, N. (1995). The role of Mos in oocyte maturation : prevention of parthenogenetic activation. *Cell Technology*, **14**, p 51-59.

SALTIEL, A.R., KAHN, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, p 799-806.

SAMET, J.M., GRAVES, L.M., QUAY, J., DAILEY, L.A., DEVLIN, R.B., GHIO, A.J., WU, W., BROMBERG, P.A., REED, W. (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol*, **275**, p L551-8.

SAMPSON, S.R., COOPER, D.R. (2006). Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol Genet Metab*, **89**, p 32-47.

SANTOS, S.D., VERVEER, P.J., BASTIAENS, P.I. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol*, **9**, p 324-30.

SARKISSIAN, M., MENDEZ, R., RICHTER, J.D. (2004). Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3. *Genes Dev*, **18**, p 48-61.

SASAGAWA, S., OZAKI, Y., FUJITA, K., KURODA, S. (2005). Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol*, **7**, p 365-73.

SAWIN, K.E., MITCHISON, T.J. (1994). Microtubule flux in mitosis is independent of chromosomes, centrosomes, and antiparallel microtubules. *Mol Biol Cell*, **5**, p 217-26.

SAXENA, M., MUSTELIN, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol*, **12**, p 387-96.

SCAVO, L., SHULDINER, A.R., SERRANO, J., DASHNER, R., ROTH, J., DE PABLO, F. (1991). Genes encoding receptors for insulin and insulin-like growth factor I are expressed in Xenopus oocytes and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, p 6214-8.

SCHAEFFER, H.J., WEBER, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, **19**, p 2435-44.

SCHMID, M., STEINLEIN, C. (1991). Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in Xenopus laevis. *Chromosoma*, **101**, p 123-32.

SCHMIDT, A., DUNCAN, P.I., RAUH, N.R., SAUER, G., FRY, A.M., NIGG, E.A., MAYER, T.U. (2005). Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev*, **19**, p 502-13.

SCHMIDT, A., RAUH, N.R., NIGG, E.A., MAYER, T.U. (2006). Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci*, **119**, p 1213-8.

SCHMITT, A., NEBREDA, A.R. (2002a). Inhibition of Xenopus oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, p 4361-6.

SCHMITT, A., NEBREDA, A.R. (2002b). Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci*, **115**, p 2457-9.

SCHORDERET-SLATKINE, S., DRURY, K.C. (1973). Progesterone induced maturation in oocytes of Xenopus laevis. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differ*, **2**, p 247-54.

SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M., BOQUET, P., GODEAU, F., BAULIEU, E.E. (1978). Progesterone-induced meiosis in Xenopus laevis oocytes: a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level. *Cell*, **15**, p 1269-75.

SCHUETZ, A.W. (1967a). Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (Rana pipiens) oocytes. *J Exp Zool*, **166**, p 347-54.

SCHUETZ, A.W. (1967b). Effect of steroids on germinal vesicle of oocytes of the frog (Rana pipiens) in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, **124**, p 1307-10.

SCHWAB, M.S., ROBERTS, B.T., GROSS, S.D., TUNQUIST, B.J., TAIEB, F.E., LEWELLYN, A.L., MALLER, J.L. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol*, **11**, p 141-50.

SCHWEYER, S., BACHEM, A., BREMMER, F., STEINFELDER, H.J., SORURI, A., WAGNER, W., POTTEK, T., THELEN, P., HOPKER, W.W., RADZUN, H.J., FAYYAZI, A. (2007). Expression and function of protein phosphatase PP2A in malignant testicular germ cell tumours. *J Pathol*, **213**, p 72-81.

SCRIVENS, P.J., ALAOUI-JAMALI, M.A., GIANNINI, G., WANG, T., LOIGNON, M., BATIST, G., SANDOR, V.A. (2003). Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. *Mol Cancer Ther*, **2**, p 1053-9.

SEGER, R., KREBS, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, **9**, p 726-35.

SELLIER, C., BODART, J.F., FLAMENT, S., BAERT, F., GANNON, J., VILAIN, J.P. (2006). Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in Xenopus oocytes. *J Cell Biochem*, **98**, p 287-300.

SEO, S.R., CHONG, S.A., LEE, S.I., SUNG, J.Y., AHN, Y.S., CHUNG, K.C., SEO, J.T. (2001). Zn2+-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem*, **78**, p 600-10.

SETOYAMA, D., YAMASHITA, M., SAGATA, N. (2007). Mechanism of degradation of CPEB during Xenopus oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, p 18001-6.

SHEETS, M.D., WU, M., WICKENS, M. (1995). Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. *Nature*, **374**, p 511-6.

SHENG, J., KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G., VARSHAVSKY, A. (2002). Dissection of c-MOS degron. *Embo J*, **21**, p 6061-71.

SHENG, Y., TIBERI, M., BOOTH, R.A., MA, C., LIU, X.J. (2001). Regulation of Xenopus oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr Biol*, **11**, p 405-16.

SHENG, Y., MONTPLAISIR, V., JOHNE LIU, X. (2004). Co-operation of G(salpha) and G(betagamma) in maintaining G(2) arrest in xenopus oocytes. *J Cell Physiol*.

SHENG, Y., MONTPLAISIR, V., LIU, X.J. (2005). Co-operation of Gsalpha and Gbetagamma in maintaining G2 arrest in Xenopus oocytes. *J Cell Physiol*, **202**, p 32-40.

SHIBUYA, E.K., RUDERMAN, J.V. (1993). Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Mol Biol Cell*, **4**, p 781-90.

SHIBUYA, E.K., MORRIS, J., RAPP, U.R., RUDERMAN, J.V. (1996). Activation of the Xenopus oocyte mitogen-activated protein kinase pathway by Mos is independent of Raf. *Cell Growth Differ*, **7**, p 235-41.

SINGH, B., ARLINGHAUS, R.B. (1997). Mos and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res*, **3**, p 251-9.

SMITH, J.A., MALONEY, D.J., HECHT, S.M., LANNIGAN, D.A. (2007). Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101. *Bioorg Med Chem*, **15**, p 5018-34.

SMITH, L.D., ECKER, R.E. (1969). Cytoplasmic regulation in early events of amphibian development. *Proc Can Cancer Conf*, **8**, p 103-29.

SMITH, L.D., ECKER, R.E. (1971). The interaction of steroids with Rana pipiens Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*, **25**, p 232-47.

SMITH, R.C. (1986). Protein synthesis and messenger RNA levels along the animal-vegetal axis during early Xenopus development. *J Embryol Exp Morphol*, **95**, p 15-35.

SOHASKEY, M.L., FERRELL, J.E., JR. (1999). Distinct, constitutively active MAPK phosphatases function in Xenopus oocytes: implications for p42 MAPK regulation In vivo. *Mol Biol Cell*, **10**, p 3729-43.

SOHASKEY, M.L., FERRELL, J.E., JR. (2002). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not c-Jun NH(2)-terminal kinase, induces phosphorylation and stabilization of MAPK phosphatase XCL100 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*, **13**, p 454-68.

SOLOMON, M.J., GLOTZER, M., LEE, T.H., PHILIPPE, M., KIRSCHNER, M.W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell*, **63**, p 1013-24.

SOLOMON, M.J., LEE, T., KIRSCHNER, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell*, **3**, p 13-27.

SOLOMON, M.J. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, p 180-6.

SPEAKER, M.G., BUTCHER, F.R. (1977). Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature*, **267**, p 848-50.

STEBBINS-BOAZ, B., HAKE, L.E., RICHTER, J.D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in Xenopus. *Embo J*, **15**, p 2582-92.

STEBBINS-BOAZ, B., CAO, Q., DE MOOR, C.H., MENDEZ, R., RICHTER, J.D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF-4E. *Mol Cell*, **4**, p 1017-27.

STEVENS, I., DERUA, R., RONDELEZ, E., WAELKENS, E., MERLEVEDE, W., GORIS, J. (1999). Identification of cyk, a cyclin B2 kinase, as a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and its role during Xenopus laevis oocyte maturation. *Exp Cell Res*, **252**, p 303-18.

STITH, B.J., MALLER, J.L. (1987). Induction of meiotic maturation in Xenopus oocytes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Exp Cell Res*, **169**, p 514-23.

STITH, B.J., GOALSTONE, M.L., KIRKWOOD, A.J. (1992). Protein kinase C initially inhibits the induction of meiotic cell division in Xenopus oocytes. *Cell Signal*, **4**, p 393-403.

STRACK, S. (2002). Overexpression of the protein phosphatase 2A regulatory subunit Bgamma promotes neuronal differentiation by activating the MAP kinase (MAPK) cascade. *J Biol Chem*, **277**, p 41525-32.

STRAUSFELD, U., LABBE, J.C., FESQUET, D., CAVADORE, J.C., PICARD, A., SADHU, K., RUSSELL, P., DOREE, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*, **351**, p 242-5.

STRAUSFELD, U., FERNANDEZ, A., CAPONY, J.P., GIRARD, F., LAUTREDOU, N., DERANCOURT, J., LABBE, J.C., LAMB, N.J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem*, **269**, p 5989-6000.

STRYER, L. (1988). Ed. New York : W. H. Freeman and co, 1988. ISBN 071671843X. *Biochemistry.*

SUN, L., CHAI, Y., HANNIGAN, R., BHOGARAJU, V.K., MACHACA, K. (2007). Zinc regulates the ability of Cdc25C to activate MPF/cdk1. *J Cell Physiol*, **213**, p 98-104.

SUNKARA, P.S., WRIGHT, D.A., RAO, P.N. (1979). Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, p 2799-802.

SWENSON, K.I., FARRELL, K.M., RUDERMAN, J.V. (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *Cell*, **47**, p 861-70.

TAIEB, F.E., GROSS, S.D., LEWELLYN, A.L., 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**, p 508-13.

TAN, Y., RUAN, H., DEMETER, M.R., COMB, M.J. (1999). p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*, **274**, p 34859-67.

TANOUE, T., YAMAMOTO, T., MAEDA, R., NISHIDA, E. (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem*, **276**, p 26629-39.

TAYLOR, M.A., JOHNSON, A.D., SMITH, L.D. (1985). Growing Xenopus oocytes have spare translational capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, p 6586-9.

TAYLOR, S.S., MCKEON, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, **89**, p 727-35.

TAYLOR, S.S., HA, E., MCKEON, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, **142**, p 1-11.

TERRET, M.E., FERBY, I., NEBREDA, A.R., VERLHAC, M.H. (2001). RINGO efficiently triggers meiosis resumption in mouse oocytes and induces cell cycle arrest in embryos. *Biol Cell*, **93**, p 89-97.

THEODOSIOU, A., ASHWORTH, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol*, **3**, p REVIEWS3009.

THIBIER-FOUCHET, C., MULNER, O., OZON, R. (1976). Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes Xenopus laevis. *Biol Reprod*, **14**, p 317-26.

THIBIER, C., DE SMEDT, V., POULHE, R., HUCHON, D., JESSUS, C., OZON, R. (1997). In vivo regulation of cytostatic activity in Xenopus metaphase II-arrested oocytes. *Dev Biol*, **185**, p 55-66.

THOM, G., MINSHALL, N., GIT, A., ARGASINSKA, J., STANDART, N. (2003). Role of cdc2 kinase phosphorylation and conserved N-terminal proteolysis motifs in cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB) complex dissociation and degradation. *Biochem J*, **370**, p 91-100.

THOMSON, M., GUNAWARDENA, J. (2009). Unlimited multistability in multisite phosphorylation systems. *Nature*, **460**, p 274-7.

THORNTON, W.H., JR., MACDONALD, R.S., WOLLARD-BIDDLE, L.C., BROWNING, J.D., O'DELL, B.L. (1998). Chelation of extracellular zinc inhibits proliferation in 3T3 cells independent of insulin-like growth factor-I receptor expression. *Proc Soc Exp Biol Med*, **219**, p 64-8.

TIAN, J., KIM, S., HEILIG, E., RUDERMAN, J.V. (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, p 14358-63.

TOURNEBIZE, R., ANDERSEN, S.S., VERDE, F., DOREE, M., KARSENTI, E., HYMAN, A.A. (1997). Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *Embo J*, **16**, p 5537-49.

TOURNIER, C., HESS, P., YANG, D.D., XU, J., TURNER, T.K., NIMNUAL, A., BAR-SAGI, D., JONES, S.N., FLAVELL, R.A., DAVIS, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, **288**, p 870-4.

TOYOSHIMA-MORIMOTO, F., TANIGUCHI, E., NISHIDA, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*, **3**, p 341-8.

TRUGNAN, G., FONTANGES, P., DELAUTIER, D., AIT-SLIMANE, T. (2004). [FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life]. *Med Sci (Paris)*, **20**, p 1027-34.

TSAI, M.Y., WIESE, C., CAO, K., MARTIN, O., DONOVAN, P., RUDERMAN, J., PRIGENT, C., ZHENG, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **5**, p 242-8.

TUNG, J.J., JACKSON, P.K. (2005). Emi1 class of proteins regulate entry into meiosis and the meiosis I to meiosis II transition in Xenopus oocytes. *Cell Cycle*, **4**, p 478-82.

VALJENT, E., PASCOLI, V., SVENNINGSSON, P., PAUL, S., ENSLEN, H., CORVOL, J.C., STIPANOVICH, A., CABOCHE, J., LOMBROSO, P.J., NAIRN, A.C., GREENGARD, P., HERVE, D., GIRAULT, J.A. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, p 491-6.

VANHAESEBROECK, B., WATERFIELD, M.D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, **253**, p 239-54.

VANHAESEBROECK, B., JONES, G.E., ALLEN, W.E., ZICHA, D., HOOSHMAND-RAD, R., SAWYER, C., WELLS, C., WATERFIELD, M.D., RIDLEY, A.J. (1999). Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat Cell Biol*, **1**, p 69-71.

VARNOLD, R.L., SMITH, L.D. (1990). Protein kinase C and progesterone-induced maturation in Xenopus oocytes. *Development*, **109**, p 597-604.

VASQUEZ, R.J., GARD, D.L., CASSIMERIS, L. (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*, **43**, p 310-21.

VAUR, S., POULHE, R., MATON, G., ANDEOL, Y., JESSUS, C. (2004). Activation of Cdc2 kinase during meiotic maturation of axolotl oocyte. *Dev Biol*, **267**, p 265-78.

VERDE, F., LABBE, J.C., DOREE, M., KARSENTI, E. (1990). Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of Xenopus eggs. *Nature*, **343**, p 233-8.

VERDE, F., DOGTEROM, M., STELZER, E., KARSENTI, E., LEIBLER, S. (1992). Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in Xenopus egg extracts. *J Cell Biol*, **118**, p 1097-108.

VERLHAC, M.H., KUBIAK, J.Z., WEBER, M., GERAUD, G., COLLEDGE, W.H., EVANS, M.J., MARO, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*, **122**, p 815-22.

VERLHAC, M.H., LEFEBVRE, C., KUBIAK, J.Z., UMBHAUER, M., RASSINIER, P., COLLEDGE, W., MARO, B. (2000). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J*, **19**, p 6065-74.

VERNOS, I., RAATS, J., HIRANO, T., HEASMAN, J., KARSENTI, E., WYLIE, C. (1995). Xklp1, a chromosomal Xenopus kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell*, **81**, p 117-27.

VIGNERON, S., BRIOUDES, E., BURGESS, A., LABBE, J.C., LORCA, T., CASTRO, A. (2009). Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *Embo J*, **28**, p 2786-93.

VIGNERON, S., BRIOUDES, E., BURGESS, A., LABBE, J.C., LORCA, T., CASTRO, A. (2010). RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint. *Oncogene*, **29**, p 3566-74.

VILAIN, J.P. (1977). Maturation in vitro ds ovocytes de Pleurodeles waltlii Michach (Amphibien urodèle). *Mém. Soc. Zool. France Symp. L. Gallien.*, **Progrès récents en Biologie du Développement des amphibiens**, p 93-102.

VIRSHUP, D.M. (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, p 180-5.

VOJTEK, A.B., HOLLENBERG, S.M., COOPER, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, p 205-14.

VORLAUFER, E., PETERS, J.M. (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol Biol Cell*, **9**, p 1817-31.

WAAGE, P., GULDBERG, C.M. (1864). Studies concerning affinity. *Forhandlinger I Videnskabs Selskabet I Cristiana*, p 35–40, 92–94, 111–120.

WAHLI, W., DAWID, I.B., WYLER, T., JAGGI, R.B., WEBER, R., RYFFEL, G.U. (1979). Vitellogenin in Xenopus laevis is encoded in a small family of genes. *Cell*, **16**, p 535-49.

WALCZAK, C.E., VERNOS, I., MITCHISON, T.J., KARSENTI, E., HEALD, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol*, **8**, p 903-13.

WALLACE, R.A., MISULOVIN, Z. (1980). The role of zinc and follicle cells in insulin-initiated meiotic maturation of Xenopus laevis oocytes. *Science*, **210**, p 928-30.

WANG, B., ZHANG, P., WEI, Q. (2008a). Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Sci China C Life Sci*, **51**, p 487-94.

WANG, J., 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**, p 5107-16.

WANG, J., CAO, W.L., LIU, X.J. (2006a). Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. *Cell Cycle*, **5**, p 213-7.

WANG, R., HE, G., NELMAN-GONZALEZ, M., ASHORN, C.L., GALLICK, G.E., STUKENBERG, P.T., KIRSCHNER, M.W., KUANG, J. (2007). Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*, **128**, p 1119-32.

WANG, X., HAO, N., DOHLMAN, H.G., ELSTON, T.C. (2006b). Bistability, stochasticity, and oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biophys J*, **90**, p 1961-78.

WANG, Y.Y., CHARLESWORTH, A., BYRD, S.M., GREGERSON, R., MACNICOL, M.C., MACNICOL, A.M. (2008b). A novel mRNA 3' untranslated region translational control sequence regulates Xenopus Wee1 mRNA translation. *Dev Biol*, **317**, p 454-66.

WASSERMAN, W.J., MASUI, Y. (1975a). Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic naturation in Xenopus oocytes. *Exp Cell Res*, **91**, p 381-8.

WASSERMAN, W.J., MASUI, Y. (1975b). Initiation of meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J Exp Zool*, **193**, p 369-75.

WASSERMAN, W.J., SMITH, L.D. (1978). The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol*, **78**, p R15-22.

WASSERMAN, W.J., SMITH, L.D. (1981). Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes. *J Cell Biol*, **89**, p 389-94.

WASSERMAN, W.J., HOULE, J.G. (1984). The regulation of ribosomal protein S-6 phosphorylation in Xenopus oocytes: a potential role for intracellular pH. *Dev Biol*, **101**, p 436-45.

WASSERMAN, W.J., FREEDMAN, A.B., LABELLA, J.J. (1990). sn-1,2-diacylglycerol levels increase in progesterone-stimulated Xenopus laevis oocytes. *J Exp Zool*, **255**, p 63-71.

WASSERMAN, W.J. (1992). The rapid transient decrease of sn-1,2-diacylglycerol in progesterone-stimulated Xenopus laevis oocytes is the result of an ethanol artifact. *Dev Biol*, **154**, p 223-5.

WATANABE, K., TOKUMOTO, T., ISHIKAWA, K. (2003). 1,10-Phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in Xenopus oocytes. *Cell Signal*, **15**, p 1139-47.

WATANABE, N., VANDE WOUDE, G.F., IKAWA, Y., SAGATA, N. (1989). Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of Xenopus eggs. *Nature*, **342**, p 505-11.

WATANABE, N., HUNT, T., IKAWA, Y., SAGATA, N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of Xenopus eggs. *Nature*, **352**, p 247-8.

WATANABE, N., BROOME, M., HUNTER, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *Embo J*, **14**, p 1878-91.

WELLS, N.J., WATANABE, N., TOKUSUMI, T., JIANG, W., VERDECIA, M.A., HUNTER, T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci*, **112 (Pt 19)**, p 3361-71.

WELLS, W.A., MURRAY, A.W. (1996). Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol*, **133**, p 75-84.

WERA, S., HEMMINGS, B.A. (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311 (Pt 1)**, p 17-29.

WHITE, M.F., SHOELSON, S.E., KEUTMANN, H., KAHN, C.R. (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem*, **263**, p 2969-80.

WHITMIRE, E., KHAN, B., COUE, M. (2002). Cdc6 synthesis regulates replication competence in Xenopus oocytes. *Nature*, **419**, p 722-5.

WICKENS, M., BERNSTEIN, D.S., KIMBLE, J., PARKER, R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet*, **18**, p 150-7.

WILDE, A., ZHENG, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, **284**, p 1359-62.

WOODGETT, J.R. (2005). Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, p 150-7.

WOODLAND, H.R. (1974). Changes in the polysome content of developing Xenopus laevis embryos. *Dev Biol*, **40**, p 90-101.

WU, J.Q., HANSEN, D.V., GUO, Y., WANG, M.Z., TANG, W., FREEL, C.D., TUNG, J.J., JACKSON, P.K., KORNBLUTH, S. (2007a). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, p 16564-9.

WU, J.Q., KORNBLUTH, S. (2008). Across the meiotic divide - CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *J Cell Sci*, **121**, p 3509-14.

WU, Q., GUO, Y., YAMADA, A., PERRY, J.A., WANG, M.Z., ARAKI, M., FREEL, C.D., TUNG, J.J., TANG, W., MARGOLIS, S.S., JACKSON, P.K., YAMANO, H., ASANO, M., KORNBLUTH, S. (2007b). A role for Cdc2- and PP2A-mediated regulation of Emi2 in the maintenance of CSF arrest. *Curr Biol*, **17**, p 213-24.

WU, W., GRAVES, L.M., JASPERS, I., DEVLIN, R.B., REED, W., SAMET, J.M. (1999). Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol*, **277**, p L924-31.

XIONG, W., FERRELL, J.E., JR. (2003). A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature*, **426**, p 460-5.

YANG, D.D., KUAN, C.Y., WHITMARSH, A.J., RINCON, M., ZHENG, T.S., DAVIS, R.J., RAKIC, P., FLAVELL, R.A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, **389**, p 865-70.

YANG, J., BARDES, E.S., MOORE, J.D., BRENNAN, J., POWERS, M.A., KORNBLUTH, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev*, **12**, p 2131-43.

YANG, W.H., LUTZ, L.B., HAMMES, S.R. (2003). Xenopus laevis ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in Xenopus ovarian androgen production. *J Biol Chem*, **278**, p 9552-9.

YANG, Y., HERRMANN, C.H., ARLINGHAUS, R.B., SINGH, B. (1996). Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A. *Mol Cell Biol*, **16**, p 800-9.

YAO, B., ZHANG, Y., DELIKAT, S., MATHIAS, S., BASU, S., KOLESNICK, R. (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*, **378**, p 307-10.

YEW, N., MELLINI, M.L., VANDE WOUDE, G.F. (1992). Meiotic initiation by the mos protein in Xenopus. *Nature*, **355**, p 649-52.

YOOK, S.H., OLTVAI, Z.N., BARABASI, A.L. (2004). Functional and topological characterization of protein interaction networks. *Proteomics*, **4**, p 928-42.

YOON, S., SEGER, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, **24**, p 21-44.

YOSHIDA, C., TOKUMASU, F., HOHMURA, K.I., BUNGERT, J., HAYASHI, N., NAGASAWA, T., ENGEL, J.D., YAMAMOTO, M., TAKEYASU, K., IGARASHI, K. (1999). Long range interaction of cis-DNA elements mediated by architectural transcription factor Bach1. *Genes Cells*, **4**, p 643-55.

YOSHIDA, N., MITA, K., YAMASHITA, M. (2000). Function of the Mos/MAPK pathway during oocyte maturation in the Japanese brown frog Rana japonica. *Mol Reprod Dev*, **57**, p 88-98.

YOSHITOME, S., FURUNO, N., SAGATA, N. (1998). Overexpression of the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2, but not of cyclin B1, inhibits bipolar spindle formation in Xenopus oocytes. *Biol Cell*, **90**, p 509-18.

YOSHIZAKI, N., YONEZAWA, S. (1998). Cysteine proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of Xenopus laevis. *Dev Growth Differ*, **40**, p 659-67.

YUE, J., FERRELL, J.E., JR. (2006). Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol Cell Biol*, **26**, p 5300-9.

YUJIRI, T., SATHER, S., FANGER, G.R., JOHNSON, G.L. (1998). Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science*, **282**, p 1911-4.

ZHANG, B.H., GUAN, K.L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J*, **19**, p 5429-39.

ZHANG, F., STRAND, A., ROBBINS, D., COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 A resolution. *Nature*, **367**, p 704-11.

ZHAO, X., SINGH, B., BATTEN, B.E. (1991). The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene*, **6**, p 43-9.

ZHAO, Y., CHEN, R.H. (2006). Mps1 phosphorylation by MAP kinase is required for kinetochore localization of spindle-checkpoint proteins. *Curr Biol*, **16**, p 1764-9.

ZHAO, Y., HACCARD, O., WANG, R., YU, J., KUANG, J., JESSUS, C., GOLDBERG, M.L. (2008). Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell*, **19**, p 1317-27.

ZHOU, H.R., ISLAM, Z., PESTKA, J.J. (2005). Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol Sci*, **87**, p 113-22.

ZHU, L., OHAN, N., AGAZIE, Y., CUMMINGS, C., FARAH, S., LIU, X.J. (1998). Molecular cloning and characterization of Xenopus insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced Xenopus oocyte maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinology*, **139**, p 949-54.

ZHU, Y., BOND, J., THOMAS, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, p 2237-42.

ZIMMERMANN, S., MOELLING, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, **286**, p 1741-4.

ANNEXES

PUBLICATION 3

(Submitted to Journal of Cellular Physiology)

"Nitric Oxide (NO)-donor SNAP induces Xenopus eggs activation." Ješeta Michal, Tichovska Hana, Beaujois Rémy, Melicharova Petra, Lescuyer-Rousseau Arlette, Petr Jaroslav, Sedmikova Marketa and Bodart Jean-François



Journal of Cellular Physiology

Nitric Oxide (NO)-donor SNAP induces Xenopus eggs activation

Journal:	*Journal of Cellular Physiology*
Manuscript ID:	JCP-10-0689
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	12-Oct-2010
Complete List of Authors:	Ješeta, Michal; Veterinary Research Institute, Genetics and reproduction Tichovská, Hana; Czech University of Life Sciences in Prague Beaujois, Rémy; Université de Lille1; Interdisciplinary Research Institute USR 3078 CNRS Melicharová, Petra; Czech University of Life Sciences in Prague Lescuyer-Rousseau, Arlette; Université de Lille1 Petr, Jaroslav; Research Institute of Animal Production Sedmíková, Markéta; Czech University of Life Sciences in Prague BODART, Jean-François; Université de Lille1; Interdisciplinary Research Institute USR 3078 CNRS
Key Words:	nitric oxide, SNAP, Xenopus, cell cycle, meiosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: Nitric Oxide (NO)-donor SNAP induces *Xenopus* eggs activation

Authors: Ješeta Michal[1,*], Tichovska Hana[2], Beaujois Rémy[3,4], Melicharova Petra[2], Lescuyer-Rousseau Arlette[3], Petr Jaroslav[5], Sedmikova Marketa[2] and Bodart Jean-François[3,4]

[1]Veterinary Research Institute, Department of Genetics and Reproduction, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic

[2]Czech University of Life Sciences in Prague, Department of Veterinary Science, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchdol, Czech Republic

[3]Université de Lille1, Laboratoire de Regulation des Signaux de Division, EA 4479, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

[4]Interdisciplinary Research Institute USR 3078 CNRS, F-59658 Villeneuve d'Ascq, France

[5]Research Institute of Animal Production, Přátelství 815, 104 00 Prague 10 - Uhříněves, Czech Republic

* Corresponding author: Ješeta Michal, Department of Genetics and Reproduction, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic.
Tel.: +420 533 331420; fax: +420 541 211229, E-mail address: jeseta@vri.cz

Running head: SNAP-induced parthenogenesis

Keywords: Nitric Oxide, SNAP, *Xenopus*, cell cycle, meiosis, calcium, parthenogenesis

Total number of figures: 4

Total number of tables: 2

Contract grant sponsor: Czech Science Foundation; Contract grant number: 523/08/H064.

Contract grant sponsor: Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic; Contract grant number: MSM 6046070901.

Contract grant sponsor: Ministry of Agriculture; Contract grant number: MZE 0002716202.

Contract grant sponsor: Econet; Contract grant number: 18857PA.

For Peer Review

Abstract:

Nitric oxide (NO) is identified as a signaling molecule involved in many cellular or physiological functions. We observed that nitric oxide donor SNAP induced parthenogenetic activation of *Xenopus* eggs. NO-scavenger CPTIO impaired the effects of SNAP, providing evidence for the effects of the latter to be specific upon NO release. NO induced pigment rearrangement, pronucleus formation and exocytosis of cortical granules. SNAP exposure lead to MAPK and Rsk inactivation within 30 minutes. In contrast to A23187, SNAP induced MPF inactivation in absence of Cyclin B degradation. NO effects were also impaired in calcium-free medium suggesting NO-effects are calcium-dependent.

For P

1. Introduction

As an important signaling molecule, Nitric oxide (NO) plays a role in many physiological processes (Moncada et al., 1991), being produced by Nitric Oxide Synthase (NOS) from L-Arginine from molecular oxygen, through a process that can also generates L-citruline (Lamas et al., 1992). NOS is expressed in three isoforms, which are dimers of identical subunits (Lamas et al., 1992; Xie et al., 1992). Constitutional isoforms of NOS, neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS), are calcium and calmodulin dependent and produce small amounts of NO for a short time lapse (Moncada et al., 1991; Xie et al., 1992). An inducible isoform of NOS (iNOS) drives sustained NO production (Nathan, 1992; Moncada et al., 1991), which is independent on calcium or calmodulin (Bian and Murad, 2003). More than one isoform of NOS might be detected in one cell type (Mehta et al., 1995).

NOS have been isolated and expressed in a variety of mammalian reproductive tissues like ovary, uterus, testis or epididymis. NO's role has been emphasized in many physiological processes including reproduction (Biswas et al., 1998). Nitric oxide is involved in the regulation of follicle growth and ovulation (Sengoku et al., 2001), oocyte maturation (Chmelikova et al., 2001; Sengoku et al., 2001; Pandey et al., 2010), spermatogenesis (Zini et al., 1996), and embryo implantation in the uterus (Moncada et al., 1991). Free radical nitric oxide was first reported as a potential signaling messenger responsible for parthenogenetic activation in sea urchin oocytes and proposed as a potential universal

trigger for egg activation (Kuo et al., 2000). This proposal has been shaded by the fact that nitric oxide did not appear as a key factor for fertilization in mice and ascidians. Sperm or sperm extract injection induce strong calcium response without affecting nitric oxide level (Hyslop et al., 2001). Nevertheless, nitric oxide donors induce increase of intracellular levels of free calcium in mouse, ascidian (Hyslop et al., 2001) and sea urchin eggs (Leckie et al., 2003), suggesting NO potentially acts through calcium mobilization. In porcine oocytes NO donors were explored as potent parthenogenetic inducers (Petr et al., 2005a), and egg activations were prevented by use of calcium chelators (Petr et al., 2005b). Thus, NO is rather not a primary stimulus for oocyte activation, though it drives parthenogenesis through calcium mobilization in this mammalian model.

Our current understanding of meiosis regulation in vertebrate oocytes largely benefited from studies performed in amphibian models such as *Xenopus laevis*. Oocytes from this animal model offer several advantages including year-around availability, cell cycle synchronicity and ease of amenability for manipulation and large amount of protein, enabling biochemical studies on $1/10^{th}$ of cells. Fully-grown oocytes resume meiosis upon hormonal stimulation and arrest at metaphase II as mature oocytes, or eggs, in anticipation to fertilization (Bodart et al., 2002). Entry in M-phase depends upon the activation of the MPF (Meiotic or M-Phase Promoting Factor), which is made up of catalytic subunit, Cdk1, and a regulatory sub-unit, Cyclin B (Norbury and Nurse, 1990). The activity of the heterodimer is regulated by inhibitory phosphorylation on Thr14 and Tyr15, achieved by Wee1 and Myt1 kinases (Fataey and Booher, 1997) and by regulating the level of Cyclin B, which can be degraded through the ubiquitin pathway (Rolfe et al., 1997). Metaphase II arrest is due a cytostatic factor (CSF), whose function is to prevent Cyclin B degradation and thus keep high levels of MPF activity within the cells. Though the nature of CSF has remained elusive for decades, it involved the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) cascade, whose components are also involved in the prevention of Cyclin B degradation, and Emi2, which acts as an inhibitor of an Ubiquitin Ligase, the Anaphase Promoting Complex (APC). Recently, Emi-2 has been demonstrated to be the ultimate target of the cascade, being a substrate for Rsk, a MAPK-Activated Protein Kinase (Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007).

For Peer Review

Maintenance of MPF activity is broken by the interaction of sperm with the egg membrane, which leads to egg activation (Yanagimachi, 1988). Exit from metaphase II is mediated by a transient increase in intracellular calcium, which induces cortical granule exocytosis and fertilization membrane formation. These effects can be mimicked and stimulated by the calcium ionophore A23187 or by kinase inhibitors (Steinhardt and Epel, 1974; Bodart et al., 1999). Completion of meiosis is attested by the extrusion of the second polar body and pronucleus formation. Following fertilization as well as following parthenogenetic activation, both MPF and MAPK activities disappear (Bodart et al., 1999; Flament et al., 2000).

Present study aimed to evaluate the effect of nitric oxide donors on metaphase II block in *Xenopus laevis* oocytes and eggs**.** We tested the potential effects of NO donors on the activation of *Xenopus laevis* oocytes and thereby determine their effect on cortical exocytosis, cortical reaction, pronuclear formation and both MPF and MAPK inactivation. Here we report for the first time a parthenogenetic activation induced by NO donor in lower vertebrates: nitric oxide donor - SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) drives parthenogenetic activation of *Xenopus* eggs through Ca^{2+} dependent-mechanisms, specifically upon NO release.

For Peer Review

2. Material and Methods

2.1. *Handling of frogs and oocytes*

After anesthetizing *Xenopus* females (purchased from the University of Rennes I, France) by immersion in 1 g/l MS222 solution (tricaine methane sulfonate; Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Hepes–NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes were isolated and defolliculated by partial collagenase treatment for 30 min (1 mg/ml collagenase A, Roche Applied Science) followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments. Meiotic resumption were induced by incubation oocytes at 19 °C in ND96 medium containing 10 µM of progesterone (Sigma–Aldrich). Maturation process (or M-Phase entry) was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte.

Calcium limited medium (120 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 500 µM $MgSO_4$, 150 µM $CaCl_2$, HEPES 22.5 µM, EDTA 400 µM, pH 7.4) and calcium free medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, HEPES 5 mM, EGTA 500 µM, pH 7.4) were prepared 1 hour before using. Stock solution of Ca(2+)-ionophore A23187 (Boehringer Mannheim) (100 mM) were made in DMSO and stored at -20 °C.

2.2. *Microinjections*

The NO-scavenger CPTIO and egg extracts were micro-injected into immature oocytes, by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo) in ND96. After injection of NO-scavenger (15 nl of 40 mM stock solution), oocytes were allowed to recover for at least 1 hour and were stimulated by progesterone for overnight maturation. For cytoplasm microinjection, metaphase II arrested oocytes were rinsed from progesterone and use as donors for crude lysates. Crude lysates were then microinjected into immature recipient oocytes (50 nl per oocyte). Maturation ratios were scored by appearance of white spots.

For Peer Review

2.3. *Cytological analysis and cortical granule lectins secretion assay*

For cytological analysis, oocytes were fixed overnight in Smith´s fixative, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (7 µm thickness) were stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes and with picroindigo carmine that reveals cytoplasmic structures (Bodart et al., 2005).

Cortical granule lectins secretion in response to SNAP was assayed using SDS-PAGE (Gundersen et al., 2002). For gel analysis (unless otherwise stated), individual oocytes were incubated in 15 µl of ND96 medium with SNAP at the concentration 5 mM. After 60 min all solution was collected and mixed with Laemli sample buffer (with β-mercaptoethanol) and incubated for 5 min at 95 ^{o}C. Samples were resolved on 12.5% gels using molecular weight markers from Bio-Rad and either stained using SYPRO®Ruby.

2.4. *Electrophoresis and western-blotting*

Eggs were lysed in homogenization buffer and centrifuged for 5 min at 10 000x*g* (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were added with one volume of Laemmli 2X buffer 4% beta-mercaptoethanol, heated at 100 ^{o}C for 3 min and stored at -20 ^{o}C until analysis. Proteins from oocytes were separated by SDS-PAGE (15-17%) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom). Blots will be blocked with 5% low fat dry milk and incubated with specific antibody. p90^{Rsk} was detected using the polyclonal rabbit antibody (p90^{Rsk1} C-21 sc231, Santa Cruz Biotechnology, 1/1000), Xp42^{MPK1} was detected using mouse monoclonal antibody (Erk2 D-2 sc1647, Cruz Biotechnology, 1/500), Cyclin B was detected using mouse monoclonal antibody (sc-53239, Santa Cruz Biotechnology, 1/1250) and P-Tyr15 cdc2 using overnight incubation with mouse monoclonal antibody (A17, Sigma, 1/1000).

Then the nitrocellulose membrane with bounded primary antibody were be incubated with appropriate secondary antibodies (1/2500). The signal were be detected using an ECL blotting detection kit, Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom).

For Peer Review

2.5. *Statistical analysis*

The number of experimental replicates is indicated in the figure legends. Data are presented as means ± S.E.M. The data were analysed by analysis of variance (Scheffe´s test) using statistical software (STATISTICA 8.0 StatSoft). A value of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. *NO Donors SNAP induces the morphological events of egg activation.*

The results of the analysis of nitrosothiol derivative (SNAP) – NO donor on eggs from 19 different females are summarized in Tab. 1. Concentrations of SNAP were chosen according to concentrations previously used in porcine oocytes (Petr et al., 2005a, 2005b). No effects were observed with low concentrations of SNAP (1 mM and 2 mM). Pigment rearrangement were observed in 40% of 2.5 mM SNAP-treated eggs while 77.1% of eggs treated with 5 mM SNAP exhibited pigment rearrangement typical of those observed with control calcium ionophore A23187 (Fig. 1B vs 1C). Using Gundersen et al's methods, we assessed cortical granules lectins presence in 5 mM-treated eggs (Fig. 1D). SNAP induced secretion of cortical granule lectins in metaphase II-blocked eggs but had no effect on immature oocytes arrested in prophase I since no lectins were found in the incubating medium (Fig. 1D). Thus, SNAP induces morphological changes close to those of cortical reaction, which are also observed for egg activation induced by calcium ionophore A23187.

Other NO donors were tested, including NOR and SNP, but were discarded because of (1) being respectively less potent to induce NO release, (2) producing CN^- ions production, which can have secondary effects (data not shown + Betts and Madan 2008; Reyes et al., 2004), (3) the toxicity of DMSO vehicle and (4) being less cell-permeant than SNAP.

3.2. *SNAP induces MAPK cascade and MPF inactivation*

To further characterize the effects of NO donor SNAP, western blotting analysis of the key components involved in metaphase II block was performed (Fig. 2). We noted that the external signs of SNAP-induced egg activation were observed after longer time exposure in comparison to calcium ionophore (Fig. 2A) (delay 70.17+/-20.11 min). While metaphase II arrested eggs exhibited $Xp42^{MPK1}$ and its downstream effector $p90^{Rsk}$ under their phosphorylated and active isoforms, SNAP exposure drives the inhibition of both proteins within 30 min after the addition of the NO donor (Fig. 2B). In contrast to A23187-treated eggs, where Cyclin B degradation and Cdc2 rephosphorylation on Tyrosine 15 were observed, no change in the profiles of the components of MPF was observed: Cyclin B was still detected during the 2 hours treatment and no degradation was observed while Cdc2 remain

For Peer Review

unphosphorylated on its residue Tyrosine 15. We tested MPF activity in SNAP-treated eggs through cytoplasm transfer from SNAP-treated eggs into immature recipient oocytes (Masui and Market, 1971). In this set of experiments, we observed a dramatic decrease in the percentage of recipient oocytes undergoing maturation when cytoplasm is taken from SNAP-treated oocytes in comparison to control eggs blocked in metaphase II exhibiting high levels of MPF (37.2+/-14.45 vs 73.26+/-5.38 respectively, Fig. 2C;). Nevertheless, cytoplasm from A23187 (control for MPF inactivation) and SNAP-treated eggs exhibited similar properties and poorly induced maturation when microinjected (35.2+/-2.45 vs 37.2+/-14.45 respectively, Fig. 2C). These results suggested that NO donor induced atypical exit from meiotic block without Cyclin B degradation, but through MPF inactivation.

3.3. *SNAP effects are dependent upon NO release*

We investigated effect of NO scavenger (CPTIO) microinjection on NO-induced eggs activation. To efficiently overcome the effects of NO-donor SNAP, CPTIO was added in ND96 prior to the stimulation of maturation by progesterone. NO scavenger did not impact maturation in these conditions (10 mM, data not shown). When 5 mM SNAP were applied on CPTIO microinjected eggs, no morphological changes were observed (Fig. 3A) and both $Xp42^{MPK1}$ and $p90^{Rsk}$ remained phosphorylated (Fig. 3B). Furthermore, classical histological analysis revealed that after injection by CPTIO, SNAP-treated eggs remained in metaphase II (Tab. 2; Fig. 3C-F). In SNAP-treated eggs, pronuclei were observed (11.4% at membrane and 34.3% pronuclei migrated in the subcortical area, Tab. 2) but no metaphase spindle has been detected, suggesting that the latter has been disorganized due to NO release effects. Then, while CPTIO did not block the effects of A23187 but suppresses the effects of SNAP, both morphological and biochemical changes observed in SNAP treated oocytes have to be attributed to NO release and not to non-specific effects of SNAP itself.

3.4. *SNAP effects depend upon calcium increase*

Finally we tested the hypothesis that the activation of *Xenopus* eggs via the NO-donor SNAP was mediated through calcium increase or mobilization. To this purpose, two different medium were tested, calcium free medium (CaFree) and calcium limited medium (CaLim), the latter being lest

For Peer Review

drastic for calcium deprivation and known to prevent mechanical and spontaneous parthenogenetic activations. In our hands, both medium impaired eggs activation induced by SNAP (57.2+/-5.9**,** 11.9+/-2.9 and 0+/-0, respectively for SNAP incubation in ND96, calcium free medium and calcium limited medium (Fig. 4A). Western blot analyses confirmed that $p90^{Rsk}$ and $Xp42^{MPK1}$ remained phosphorylated and under an active state after 2 hours treatment in calcium free or calcium limited medium (Fig. 4B).

For Peer Review

4. Discussion

The role of NO-dependent signaling cascade in egg activation remains unclear and is subjected to intensive research, due to its sensitivity of mammalian oocytes and early embryos towards oxidative stress (Cetica et al., 2001; Betts and Madan, 2008). Nevertheless, NO donors have been considered as potential mean to promote parthenogenetic activation in different modes, such as sea urchin (Kuo et al., 2000) and porcine oocytes (Petr et al., 2005a), while NO may be also involved in mechanisms of fertilization in bovine oocytes (Reyes et al., 2004). NO signaling molecules and NO levels have become issues in parthenogenetic activation and *in vitro* cultivation of oocytes in vertebrates models. Here we took advantages of the amphibian model to test the hypothesis that the NO-donor (SNAP) could induce parthenogenetic activation and exit from the metaphase II block in lower vertebrate eggs.

Several nitric oxide donors were tested: SNAP (S–nitroso-N-Acetyl-D,L-penicillamine), SNP (Sodium nitroprusside) and NOR (±)-2-((E)-4-Ethyl-3[(Z)-hydroxyimino]6-methyl-5-nitro-heptenyl)-3-pyridinecarboxamide). SNP and NOR were rapidly discarded, and SNAP was chosen due to its effects on *Xenopus* eggs and its ease of use in this context. NOR and SNP did not exert any effects on metaphase II block (data not shown); SNP is regarded as less potent than SNAP to induce NO release (Marks et al., 1995; M. Jeseta, personal observations), has to be exposed to light for nitric oxide release (Butler and Glitwell, 1987) and finally may produce cyanide CN- ions following its breakdown (Marks et al., 1995; Bates et al., 1991). The absence of effects of NOR at the concentrations used (2 mM) may be due to the fact that this compound is believed to be less permeant than SNAP. Its injection into *Xenopus* eggs was not considered because of NOR being solubilized in DMSO, which could exert deleterious effects on metaphase II block (Flament et al., 2000).

SNAP is a stable analogous of endogenous S-nitrosothiols, and NO is released from it by endogenous enzymes after the penetration of SNAP into the cell (Yamamoto et al., 2000; Megson, 2000). On a physiological note, endogenous NO may be produced by three different isoforms of NOS. The presence of eNOS and iNOS isoforms was observed in fully-grown rat (Jablonka-Shariff and Olson, 1997), mouse (Nishikimi et al., 2001), porcine (Hattori et al., 2000; Chmelikova et al., 2009) and cattle oocytes (Pires et al., 2009). In *Xenopus*, only nNOS was detected (Peunova et al., 2001). Similarly to porcine eggs, SNAP long time exposures were requested to observe external signs of

For Peer Review

parthenogenetic activation, as attested by pigment rearrangement (Petr et al., 2005a). Eggs permeability to NO-donors or NO releasing rates may be determining and limiting factors in the slow dynamic of cortical reaction observed in these models. In our hands, SNAP induced cortical granules exocytosis, in contrast to porcine oocytes treated with NO-donor, which did not exhibit the exocytosis of cortical granules (Petr et al., 2005a).

Because cortical reactions can be considered as deconnected from metaphase II exit *per se*, we checked for the activity and activation status of MPF and MAPK. Both activities decreased within 30 minutes: MAPK and its downstream effector p90rsk were dephosphorylated within 30 minutes post-addition of SNAP; MPF activity was noticeably reduced after 30 minutes, as attested by the microinjection of crude extracts from treated cells into immature recipient oocytes, which mostly remained in prophase I. Then, decreases in MPF and MAPK activities occured in SNAP treated eggs at the similar time in comparison to calcium ionophore treated eggs. The metaphase II exit occurs then faster than external signs of parthenogenetic activation. Noteworthy, the isoforms of Cdk1 and cyclin B were not affected following SNAP addition: Cdk1 remained unphosphorylated on its residue Tyr15 while cyclin was still detected and not degraded in these conditions. Inhibition of MPF activity may be driven in these conditions by the dissociation of Cdk1 from its regulatory subunit. The Cdk1-Cyclin B dissociation is sufficient to dramatically impair MPF activity (Lorca et al.,1991; Chesnel et al., 2006). Absence of cyclin B degradation can be explained by the inhibition of the catalytic activity of the 26S proteaseome subunit, driven by NO through S-nitrosylation. Such reversible inhibition has been observed in vascular smooth cells (Kapadia et al., 2009). The decreases of MPF and MAPK activities were correlated to the disorganization of spindle in SNAP-treated eggs, which exhibited phenotypes similar to those of calcium ionophore-activated eggs: pigments trails from pronucleus migration and pronuclei were observed in these conditions.

CPTIO was successfully used in *Helisoma* embryonic cells to block NO-release (Doran et al., 2003). It has been previously reported in mammalian oocytes that NO could inhibit (Hattori et al., 2000) or stimulate (Nishikimi et al., 2001) the nuclear maturation, depending on its concentration. In our conditions, NO-scavenging appeared not to impair the progression of M-phase entry and maturation in *Xenopus* oocytes, because CPTIO-treated oocytes treated with progesterone resumed

For Peer Review

and completed meiosis like control one. Nevertheless, microinjection of NO scavenger blocked the effects of SNAP on eggs, enabling us to discard the hypothesis that SNAP effects are non specific: indeed, MAPK inactivation, spindle disorganization and pronuclei formation induced by SNAP were severely impaired by CPTIO.

From literature, calcium- and NO-dependent signaling pathways are clearly interconnected in oocytes and eggs with calcium playing a pivotal and main role (Kuo et al., 2000; Leckie et al., 2003; Petr et al., 2005b). The NO-dependent signaling cascade is regulated by calcium. The important role of calcium for NO induced activation was also confirmed by our study, which demonstrated that NO-induced parthenogenetic activation is impaired in calcium limited or calcium free medium. Production of NO in the cell depends on activation of NOS by Calmodulin, which is itself activated by calcium ions (Lamas et al., 1992; Nathan, 1992). Mainly, NO influences the levels of intracellular calcium through the regulation of calcium ion channels and pumps, which modulate the influx and efflux of calcium between the cell and extracellular space (Berridge et al., 2000). NO could also regulate the mobilization of calcium ions from their intracellular stores. Calcium from this source is released through either Ryanodine (RYR) or inositol triphosphate receptors (IP_3R) (Clapham, 1995). Interestingly NO-dependent activation of pig oocytes depends only on mobilization of intracellular calcium stores from RyRs. The mobilization of endogenous calcium stores through IP_3R is not necessary for SNAP parthenogenetic activation in porcine (Petr et al., 2005b). In *Xenopus* oocytes, RyR are poorly expressed and located near nucleus. Therefore, the role of RyR is rather considered as modest for endogenous calcium release mechanisms in contrast to pig oocytes (Erickson et al., 2004). Our results suggest that nitric oxide specifically induces parthenogenetic activation in *Xenopus laevis* eggs, through a calcium dependent mechanism. Nevertheless, further studies are needed for precise elucidation of Ca-dependent pathway in *Xenopus* oocytes activated by nitric oxide release. Because parthenogenetic activation induced by NO donor SNAP share similar signatures in porcine and amphibian eggs, the latter open new perspectives for the in vitro fertilization procedures, and their optimization in vertebrates.

For Peer Review

5. Acknowledgments

We thank Jean-Pierre Vilain and Matthieu Marin for reading and fruitful discussions. This work was supported by a grant from GACR 523/08/H064, MSM 6046070901, MZe 0002716202 and Econet grant 18857PA.

For Peer Review

6. References

Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG. 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochem Pharmacol 42:157-165.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 1:11-21.

Betts DH, Madan P. 2008. Permanent embryo arrest:molecular and cellular concepts. Mol Hum Reprod 14:445–453.

Bian K, Murad F. 2003. Nitric oxide (NO) – Biogeneration, regulation, and relevance to human diseases. Front Biosci 8:264-278.

Biswas S, Kabir SN, Pal AK. 1998. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. J Reprod Fertil 114:157-161.

Bodart JF, Beart FY, Sellier S, Duesbery NS, Flament S, Vilain JP. 2005. Differential roles of p39(Mos)-Xp42(Mpk1) cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Dev Biol 283:373-383.

Bodart JF, Bechard D, Bertout M, Gannon J, Rousseau A, Vilain JP, Flament S. 1999. Activation of Xenopus eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(mos)proteolysis. Exp Cell Res 253:413-421.

Bodart JF, Flament S, Vilain JP. 2002. Minireview: Metaphase arrest in amphibian oocytes: Interaction between CSF and MPF sets the equilibrium Mol Reprod Dev 61:570-574.

Butler AR, Glitwell C. 1987. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. Chem Soc Rev 16:361-380.

Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte in vitro maturation. IUBMB Life 51:57–64.

Chesnel F, Bazile F, Pascal A, Kubiak JZ. 2006. Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of Xenopus laevis embryos. Cell Cycle 5:1687-1698.

Chmelikova E, Jeseta M, Sedmikova M, Petr J, Tumova L, Kott T, Lipovova P, Jilek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Zygote 29:1-10.

Chmelikova E, Sedmikova M, Petr J, Kott T, Lanska V, Tumova L, Tichovska H, Jeseta M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. Czech J Anim Sci 54:137-149.

Clapham DE. 1995. Calcium signaling. Cell 80:259-268.

Doran SA, Tran CH, Eskicioglu C, Stachniak T, Ahn K-Ch, Goldberg JI. 2003. Constitutive and permissive roles of nitric oxide activity in embryonic ciliary cells. Am J

For Peer Review

Physiol Regul Integr Comp Physiol 285:348-355.

Erickson ES, Mooren OL, Moore-Nichols D, Dunn RC. 2004. Activation of ryanodine receptors in the nuclear envelope alters the conformation of the nuclear pore complex. Biophys Chem 112:1-7.

Fattaey A, Booher RN. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. Prog Cell Cycle Res 3:233-240.

Flament S, Bodart JF, Bertout M, Browaeys E, Rousseau A, Vilain JP. 2000. Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on Xenopus oocytes and eggs. Zygote 8:3-14.

Gundersen CB, Kohan SA, Chen Q, Iagnemma J, Umbach JA. 2002. Activation of protein kinase C^{η} triggers cortical granule exocytosis in Xenopus oocytes. J Cell Sci 115:1313-1320.

Hattori MA, Nishida N, Takesue K, Kato Y, Fujihara N. 2000. FSH suppresion of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. J Mol Endocrinol 24:65-73.

Hyslop LA, Carroll M, Nixon VL, McDougall A, Jones KT. 2001. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. Dev Biol 234:216-230.

Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T, 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.

Jablonka-Shariff A, and Olson ML. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell- specific expression during follicular development in the rat ovary. Endocrinology 138:460-468.

Kapadia MR, Eng JW, Jiang Q, Stoyanovsky DA, Kibbe MR. 2009. Nitric oxide regulates the 26S proteasome in vascular smooth muscle cells. Nitric Oxide-Biol Ch 20:279-288.

Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. Nature 406:633-636.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc Natl Acad Sci USA 89:6348-6352.

Leckie C, Empson R, Becchetti A, Thomas J, Galione A, Whitaker M. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. J Biol Chem 278:12247-12254.

Lorca T, Fesquet D, Zindy F, Lebouffant F, Cerruti M, Brechot C, Dechauchelle G, Doree M. 1991. An okadaic acid-sensitive phosphatase negatively controls the cyclin degradation pathway inamphibian eggs. Mol Cell Bio 11:1171-1175.

Marks GS, McLaughlin BE, Jimmo SL, Poklewskakoziell M, Brien JF, Nakatsu K. 1995.

For Peer Review

Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilatation induced by sodium-itropruside, 3-morpholinosydnonimine, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryl trinitrate. Drug Metab Dispos 23:1248-1252.

Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool 177:129–146.

Megson IL. 2000. Nitric oxide donor drugs. Drug Future 25:701-715.

Mehta JL, Chen CY, Kone BC, Mehta P, Turner P. 1995. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. J Lab Clin Med 125:370-377.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 43:109-142.

Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6:3051-3064.

Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, Ikeda S, Kira Y, Sato EF, Inoue M, Yamada M. 2001. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. Reprod 122:957-963.

Nishiyama T, Ohsumi K, Kishimoto T. 2007. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. Nature 446:1096-1099.

Norbury C, Nurse P. 1990. Controls of cell proliferation in yeast and animals. Ciba Found Symp 150:168-173.

Pandey AN, Tripathi A, PremKumar KV, Shrivastav TG, Chaube SK. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. J Cell Biochem 111:521-528.

Petr J, Rajmon R, Lanska V, Sedmikova M, Jilek F. 2005b. Nitric oxide-dependent activation of pig oocytes: Role of calcium. Mol Cell Endocrinol 242:16-22.

Petr J, Rajmon R, Rozinek J, Sedmikova M, Jeseta M, Chmelikova E, Svestkova D, Jilek F. 2005a. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. Mol Reprod Dev 71:115-122.

Peunova N, Scheinker V, Cline H, Enikolopov G. 2001. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in Xenopus brain. J Neurosci 21:8809-8818.

Pires PRL, Santos NP, Adona PR, Natori MM, Schwarz KRL, de Bem THC, Leal CLV. 2009. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. Anim Reprod Sci 116:233-243.

Rolfe M, Chiu M, Pagano M. 1997. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. J Mol Med 75:5-17.

Reyes R, Vázquez ML, Delgado NM. 2004. Detection and bioimaging of nitric oxide in bovine oocytes and sperm cells. Arch Androl 50:303-309.

For Peer Review

Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K. Ishikawa M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. Mol Reprod Dev 58:262-268.

Steinhardt RA, Epel D. 1974. Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. Proc Natl Acad Sci USA 71:1915-1919.

Yanagimachi R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil, editors. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press. p 230-278.

Yamamoto T, Bing RJ. 2000. Nitric oxide donors. P Soc Exp Biol Med 22:200-206.

Xie Q, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science 256:225-228

Zini A, O`Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. Biol Reprod 55:935-941.

For Peer Review

Figure legends

Fig. 1 **Nitric oxide donor SNAP induces cortical reaction typical of parthenogenetic activation *Xenopus laevis* eggs.** (A-C) Representative pictures of *Xenopus laevis* oocytes (A) control oocyte arrested in metaphase II (B) parthenogenetic activation after A23187 treatment (C) parthenogenetic activation after SNAP treatment. Scale bars represents 200 µm. (D) SNAP treatment induce secretion of cortical granule lectins from *Xenopus* oocytes. Oocytes were incubated without or with 5 mM SNAP and A23187. After 1 hour the fluid surrounding oocytes (15 µl) was collected for analysis by SDS-PAGE and SYPRO Ruby staining. Mobility of molecular weight standards is indicated in kDa.

Fig. 2 **Kinetic of SNAP induced activation** (A) Kinetic of parthenogenetic activation after SNAP treatment. Matured oocytes were cultured with 5 mM SNAP or 10 µM A23187, cortical reaction was scored at 10 minutes time intervals. Data are shown as mean percentage of activation ±SEM of five independent experiments. (B) Western blot analysis. Each time 5 ocytes were taken off, homogenized in lysis buffer, and immunoblotted with antibodies against Cyclin B, P-Tyr15 cdc2, $Xp42^{Mpk1}$ and $p90^{Rsk}$. (C) Cytoplasm from SNAP-activated oocytes scarcely induce meiotic maturation of oocytes in GV stage. Oocytes in GV stage were injected 50 nl of crude extract from oocytes in metaphase II, GV stage and oocytes after 120 min treatment in ND96 with 5 mM SNAP or 10 µM A23187. In control group are oocytes in GV stage with progesteron. Data are shown as mean percentage of white spots of minimally four independent experiments. Error bands represent ±SEM values. Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

Fig. 3 **NO scavenger suppresses SNAP effects.** (A) Histogram showing percentages of parthenogenetic activated oocytes after 2 hours treatment with 5 mM SNAP, 10 mM CPTIO or 10 µM A23187 injected or non-injected 40 mM NO scavenger CPTIO. Error bands represent ±SEM values. Different superscripts indicate significant diferences ($P < 0.05$). Data are shown as mean percentage of activation of five independent experiments. (B) Western blot analysis. After 2 hours ocytes were taken off, homogenized in lysis buffer, and immunoblotted with antibodies against $Xp42^{Mpk1}$ and $p90^{Rsk}$. (C) Control oocyte in metaphase II arrested oocytes exhibits typical bipolar spindle with chromosomes and the first polar body (nuclear red/picro-indigo carmine staining). (D) Activation after A23187

For Peer Review

treatment: typical structure of pronucleus (E) Oocyte activated by SNAP (F) Oocyte after SNAP&CPTIO treatment in metaphase II. Scale bars represents 300 μm.

Fig. 4 **SNAP induced parthenogenetic activation is calcium-dependent.** (A) Percentages of parthenogenetic activated oocytes after 2 hours treatment with 5 mM SNAP in ND96 medium, calcium free medium (CaFree) and calcium limited medium (CaLim). Error bands represent ±SEM values. Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). Data are shown as mean percentage of activation of minimally four independent experiments. (B) Western blot analysis. After 2 hours oocytes were taken off, homogenized in lysis buffer, and immunoblotted with antibodies against $Xp42^{Mpk1}$ and $p90^{Rsk}$.

For Peer Review

Table 1

Effect of nitric oxide donor SNAP on parthenogenetic activation matured ocytes

Treatment	Number of oocytes (number of females)	% oocytes with pigment rearrangement	±SEM
Control	255 (19)	0^{A}	0
SNAP 2.5 mM	312 (12)	40.04^{B}	6.27
SNAP 5 mM	540 (17)	77.12^{C}	3.02
A23187 10 µM	414 (19)	95.59^{D}	1.03

^{A,B,C,D} Statistically significant differences ($P<0.05$) in the ratio of activated oocytes are indicated by different superscripts.

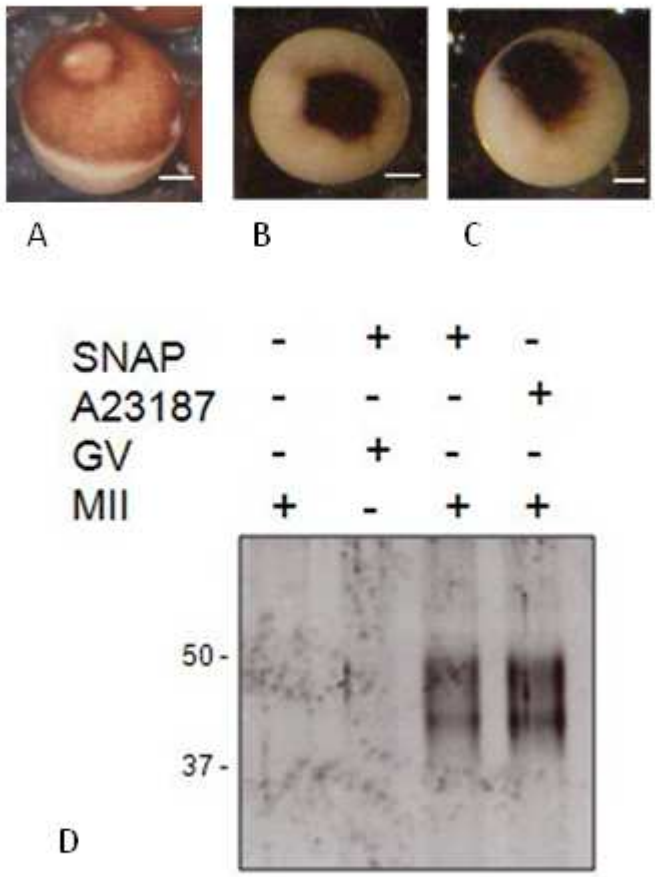
For Peer Review

Table 2

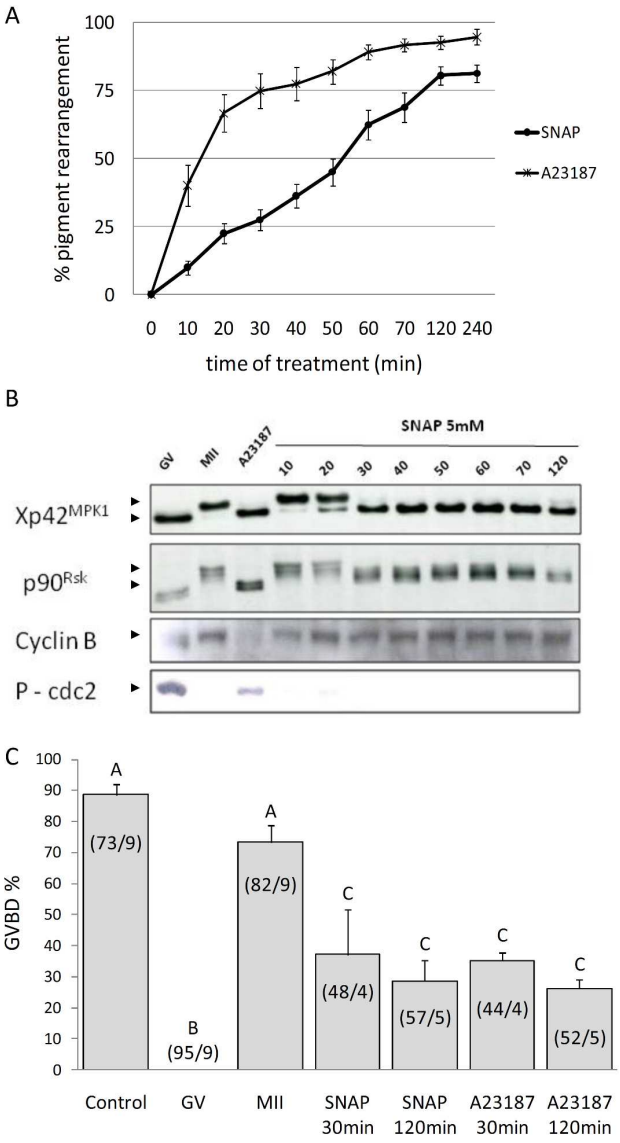
Effect of SNAP, A23187 and SNAP+CPTIO on spindle morphogenesis and pronuclear formation following progesterone-induced maturation

Treatment	Number of oocytes (number of females)	Metaphase spindle		Pronucleus migration		Pronucleus		No structure	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Control	15(3)	11	73.4	0	0	0	0	4	26.6
SNAP 5 mM	35(4)	1	2.8	12	34.3	4	11.4	18	51.5
SNAP 5 mM/CPTIO 40 mM	23(3)	18	78.3	0	0	0	0	5	21.7
A23187 10 µM	18(3)	0	0	2	11.1	12	66.7	4	22.2

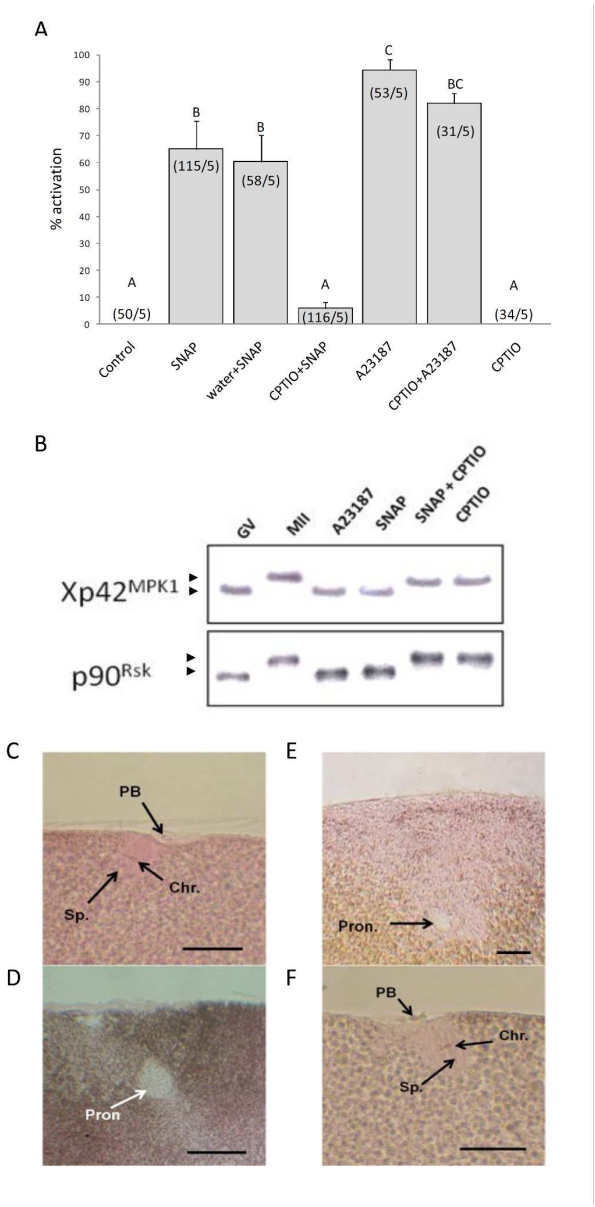
For Peer Review



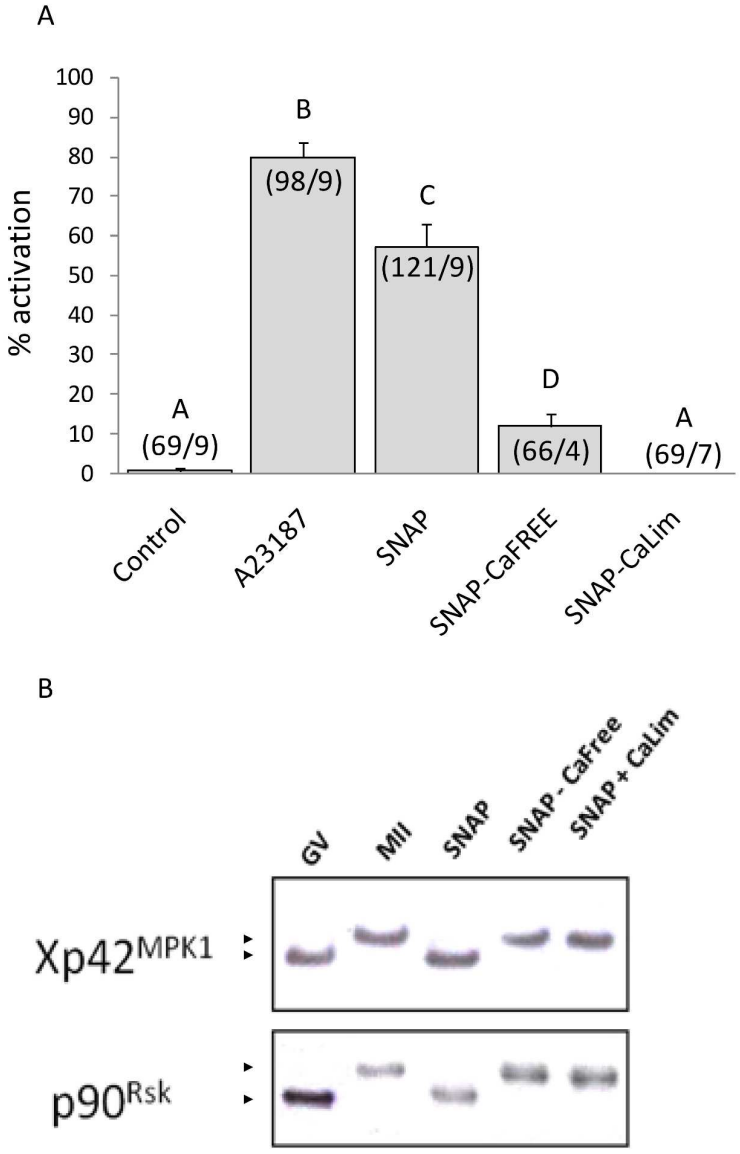
119x150mm (96 x 96 DPI)



109x210mm (500 x 500 DPI)



109x210mm (500 x 500 DPI)



139x202mm (500 x 500 DPI)

PUBLICATION 4

(Review published in Bionova)

"G2/M cell cycle transition monitoring by Zn2+ chelation in amphibian oocytes." Beaujois Rémy, Blossey Ralf, Panopoulos Evangelos,Vilain Jean-Pierre and Bodart Jean-François

G2/M cell cycle transition monitoring by Zn2+ chelation in amphibian oocytes

Beaujois Rémy[*], Blossey Ralf[-], Panopoulos Evangelos[*], Vilain Jean-Pierre[*] and Bodart Jean-François[*-1]

*EA 4020, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, Université des Sciences et Technologies de Lille, IFR 147, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

[-]Nanosystèmes Biologiques, Institut de Recherche Interdisciplinaire, USR 3087, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Modular approach within the protein-protein interaction network involved in G2/M transition

Oocytes of Xenopus species have become a widely used model to study cell cycle regulation and developmental biology in the last half-century Because of their large size, their year-around availability, their ease of manipulation and being largely relative to most mammalian [1] (figure 1). The paradigm of the amphibian oocyte has been advantageously used to analyze the role of the Mos - MEK (Mitogen Activated Protein Kinase kinase) - MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) / Erk (Extracellular Regulated Kinase) and MPF (M-Phase promoting Factor / Cyclin B-Cdk1) pathways, as well as the role of these pathways in the morphological events of M-phase (Germinal Vesicle BreakDown (GVBD), meiotic spindle formation and chromosomes condensation). G2 arrested-synchronized oocytes in ovaries can enter M-phase easily through hormonal stimulation, Mos or MEK overexpression and MPF injection. In these cells, MPF and the MAPK pathways activated by the oncoprotein Mos are intimately linked in a protein-protein interaction network, which is not dependent upon transcription and regulated at the post-translational level only (figure 2). This network, whose function is the orchestration of physiological processes at the onset of M-phase, exhibits redundancy and robustness [2]. It has appeared as a playground to model the MAPK cascade [3], whose stability for hours is required to perform several successive tasks during meiosis : (1) spindle morphogenesis, (2) DNA replication inhibition and (3) cytostatic activity establishment, which sets the arrest in metaphase II, characteristic of most vertebrates. While being strongly context-dependent, modules may be considered in this network [4, 5]. Functional modules might be defined as small fractions of the cell components or of a protein-protein interaction network, accomplishing a relatively autonomous function [6]. Modular approaches and mathematical tools are hoped to fill the gap between the molecular interactions in dynamic systems or protein-protein interaction network (PPIN) and the physiological consequences driven by oncogenes and oncoproteins. Such approaches will enable the understanding of dynamic network dysregulations occuring during tumorigenesis or cell cycle disruption.

Relative autonomy between modules in a protein-protein interaction network may be assessed by affecting their interconnections: deciphering the role of each module within the MAPK cascade requires tools to stimulate or inhibit each 'module box' ; in an attempt to activate the MAPK / Erk module itself to study its role in spindle formation and cascade dynamic, 1,10 phenanthroline was used. The latter compound reacts as a chelator of intracellular heavy metals (primarily zinc) and was reported as a successful activator of MAPK in Xenopus laevis oocytes [7]. At a molecular level, 1,10 phenanthroline induced in our experiments MAPK phosphorylation with a slow kinetics, which does not depend upon protein synthesis, oncoprotein Mos accumulation, or free radicals generation, but appeared to depend upon MEK activation.

Zinc and cell cycle progression

Zn2+ overload effects on several cell types is quite well documented. Indeed, the effects of Zn2+ increase have been reported in many animal cell types such as PC12 [8] and embryonic fibroblast IIC9 [9] or in vegetal cells such as in rice roots [10]. For instance, intracellular zinc overload leads to Jnk and Erk activation in PC12 cells,

where Zn2+-induced Erk activation contributes to cell death [8]. In human prostatic carcinoma cells, exposure to zinc leads to an increase in the cell population arrested at G2 and M phases of cell cycle [11]. G2/M arrests may rely on MPF inhibition: protein-kinase activity of the MPF was primarily reported to be inhibited by zinc [25] and Zn2+ acts like a potent inhibitor of MPF in Schizosaccharomyces pombe, presumably through the interaction of zinc with the p13suc1 subunit of MPF, which may modulate the availability of functional p34cdc2 [12, 13]. In contrast, increasing Zn2+ external concentration induces M-phase entry in absence of hormonal stimulation in amphibian oocytes [14]. Minimizing a role of Zn2+ per se, oocytes exposure to other divalent cations leads to spontaneous activation: M-phase entry in Rana temporaria and Xenopus laevis oocytes is induced by solutions containing Mn2+ or Co2+ ions [15], and spontaneous GVBD may occur when external Ca2+ or Mg2+ ions concentrations are raised in presence of ionophore [16]. Thus, the mechanisms leading to GVBD in these conditions remain to be elucidated, but they are not zinc-specific.

In contrast to zinc exposure, effects of transition metal chelation on cell cycle are less well documented. Nevertheless, depletion of zinc has been shown to inhibit growth in animals and proliferation of cultured cells and zinc was hypothesized to be crucial for cell cycle regulators [17]. Through its metal-chelating properties, 1,10 phenanthroline inhibits lymphoblast cells proliferation, an effect counteracted by Zn2+, Cu2+ or Fe2+ addition [18]. In these conditions, metal chelation inhibits proliferation by blocking the G1 to S transition. Zinc depletion also reduces the proliferative fraction (S and G2/M phases) of the cell cycle in Swiss 3T3 cells [19]. Another metal chelator, TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylene diamine) inhibits Pancreatic Cancer cell lines growth

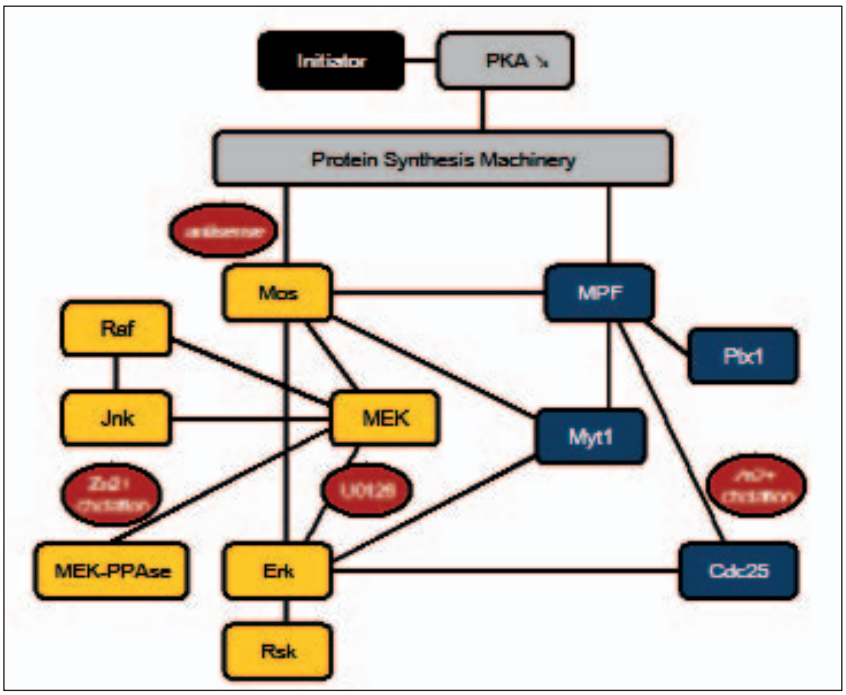


Figure 1. An initiator (progesterone, black square box) stimulates early events responsible for G2/M transition, including successively a decrease in PKA activity and the enhancement of selective protein synthesis (grey square boxes). Protein synthesis enables the activation of two pathways, one including the MAPK cascade members (yellow square boxes), the other one being made up with the MPF and its positive / negative regulators, dark blue square boxes). Each square box may be considered as a module exerting a function, through substrates / ultimates targets recruitment. Cascade or modules may be activated or inhibited through transition metal chelation, use of specific directed antisense strategies or chemical inhibitors (U0126 is a chemical inhibitor specific for MEK 1&2, impairing MEK activity but not its phosphorylation by oncoprotein Mos). In Xenopus oocytes, Zn2+ chelation appears to exert two apparently unrelated effects: (1) driving MEK activation and (2) inhibiting MPF activity. Nevertheless, both effects might be related to Zn2+ requirement for phosphatase activity and/or substrate recognition.

by arresting PaCa44 cells in G1, and promotes cell death [20]. Consistent with the hypothesis for a role of zinc in cell cycle regulation, depletion in zinc down-regulates transcripts expression of Cyclin A, cdk8 in HT-29 cells [21] and Cyclin A & B1 in PaCA44 [20]. Similarly, protein-tyrosine phophatases involved in signal transduction processes exhibited weak levels of expression under zinc low concentrations. Zinc depletion also appeared to up-regulate cdk inhibitors (Cyclin dependent kinase inhibitor 2d, p57 and p19) and gadd45a in the same cell lines.

In amphibian oocytes, TPEN was recently reported to block germinal vesicle / nuclear envelope breakdown induced either by progesterone, Protein Kinase A Inhibitor (PKI) or Mos oncogene but, strikingly, MAPK and Rsk activation induced by hormonal stimulation were not impaired [22]. Another metal chelator, the 1,10 phenanthroline was in contrast reported to induce GVBD through zinc chelation, whereas it has been previously observed that 1,10 phenanthroline incubation prevents progesterone-induced M-phase entry [7]. An exhaustive study of the 1,10 phenanthroline effects on immature amphibian oocytes revealed an atypical nuclear envelope dissolution, pigment rearrangement and cytoskeleton diso-rganisation leading to cell stratification, but no classical GVBD. In addition, the nuclear envelope dissolution induced by 1,10 phenanthroline in absence of hormonal stimulation was not altered by the chemical MEK-inhibitor U0126, leading to conclude that the 1,10 phenanthroline-induced phenotype observed in oocytes does not

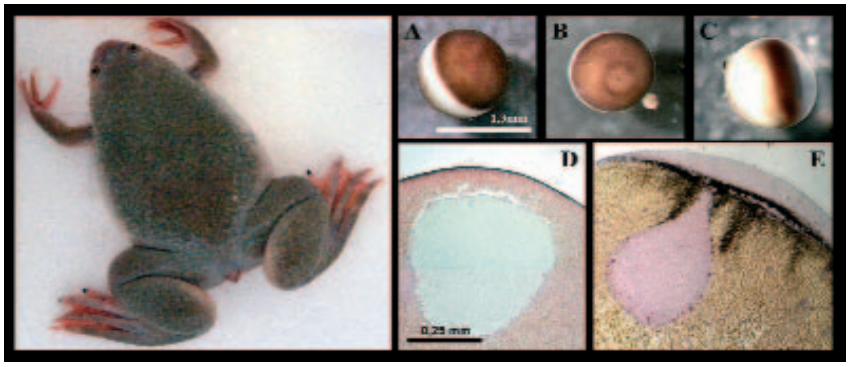


Figure 2. Left panel, Xenopus laevis female ; right panel : binocular observation of Xenopus oocytes arrested in prophase I (A) or stimulated by progesterone and arrested in metaphase II, (B) oocyte stratification induced by 1,10 phenanthroline (C) ; intact germinal vesicle are detected in immature oocytes (D) while atypical nuclear dissolution is observed upon zinc chelation (E).

depend upon MAPK phosphorylation (figure 1).

Phosphatases like Cdc25 have been shown to bind to Zn2+ in plants (Arabidopsis Cdc25 homologue [23]) and amphibian (Xenopus XCdc25C [22]). If zinc is bound to Cdc25C with a stoechiometry of Cdc25C: Zn2+ being 1:1, Cdc25C exhibits a conserved cys-(x)5-Arg motif in the catalytic core, whose activity does not rely on metal ions [24]. Thus, zinc appeared to be required as a structural regulator for Cdc25C substrate recognition and to be critical for MPF activation at the onset of M-phase [22]. How could Zn2+ chelation impairs MPF activation and promotes on its own MAPK/Erk in the same cell type? These two apparently unrelated effects might be both related to protein-phosphatase inability to dephosphorylate their substrates, as long as one considers a pivotal role for a protein-phosphatase upstream MAPK/Erk. While the identity of the phosphatase whose ability to activate MPF is impaired, is clearly defined [22], identity and precise roles played by phosphatases within the MAPK cascade network remain elusive. Following zinc chelation, phosphorylation of MAPK induced by 1,10 Phenanthroline relies on MEK activation. One might hypothesize that zinc chelation affects the substrate recognition of a MEK-upstream phosphatase, whose inhibition drives the activation of MEK (figure 2). A similar mechanism has been shown to occur when using a PP1 / PP2A inhibitor [26], the okadaic acid (OA) : OA activates MAPK in cell-free extracts from amphibian eggs, through MEK activation [27].

While it remains to be determined if Zn2+ changes are physiologically used for cell cycle regulation, several cell cycle regulators or signal transduction modulators are among the plethora of low abundance proteins associated with Zn2+. In our experimental and modular approaches, Zn2+ deprivation experiments provided us new insight in MAPK/Erk cascade regulation. ■

ABSTRACT

Potential roles for zinc in cell cycle progression are pointed out ; zinc chelator may be used to assess roles and dynamics of the MAPK / Erk pathway modules. From literature and our experiments, we hypothesize that in Xenopus oocytes, zinc chelation impairs the substrate recognition of both Cdc25C and a MEK-upstream phosphatase, thus on the one hand inhibits MPF activation and, on the other hand, promotes MAPK activation.

Acknowledgments

Our work is supported by the 'Ligue Régionale contre le Cancer'.

REFERENCES

1. Gurdon, J.B. and N. Hopwood, The introduction of Xenopus laevis into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. Int J Dev Biol, 2000. 44(1): p. 43-50.
2. Haccard, O. and C. Jessus, Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. Cell Cycle, 2006. 5(11): p. 1152-9.
3. Giuranic, C., Russo, C., Bodart, J.F., Blossey, R., On the equilibria of the MAPK cascade. arXiv, 2007: p. q-bio/0702051.
4. Bodart, J.F., et al., Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Dev Biol, 2005. 283(2): p. 373-83.
5. Blossey, R., Russo, C., Bodart, J.F., Modularity within the MAPK cascade network. Oncogene Proteins : New research. in press: Nova Science Publishers, Inc.
6. Hartwell, L.H., et al., From molecular to modular cell biology. Nature, 1999. 402(6761 Suppl): p. C47-52.
7. Watanabe, K., T. Tokumoto, and K. Ishikawa, 1,10-Phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in Xenopus oocytes. Cell Signal, 2003. 15(12): p. 1139-47.
8. Seo, S.R., et al., Zn2+-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. J Neurochem, 2001. 78(3): p. 600-10.
9. Klein, C., et al., Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. Apoptosis, 2006. 11(11): p. 1933-44.
10. Lin, C.W., H.B. Chang, and H.J. Huang, Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. Plant Physiol Biochem, 2005. 43(10-11): p. 963-8.
11. Liang, J.Y., et al., Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. Prostate, 1999. 40(3): p. 200-7.
12. Endicott, J.A., et al., The crystal structure of p13suc1, a p34cdc2-interacting cell cycle control protein. Embo J, 1995. 14(5): p. 1004-14.
13. Birck, C., et al., Is the function of the cdc2 kinase subunit proteins tuned by their propensities to oligomerize? Conformational states in solution of the cdc2 kinase partners p13suc1 and p9cksphy. Biochemistry, 1996. 35(17): p. 5577-85.
14. Wallace, R.A. and Z. Misulovin, The role of zinc and follicle cells in insulin-initiated meiotic maturation of Xenopus laevis oocytes. Science, 1980. 210(4472): p. 928-30.
15. Nikiforova, G.P. and M.N. Skoblina, [Oocyte maturation and activation in the common frog and the clawed toad under the action of divalent cations]. Ontogenez, 1992. 23(6): p. 644-9.
16. Wasserman, W.J. and Y. Masui, Initiation of meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. J Exp Zool, 1975. 193(3): p. 369-75.
17. Chesters, J.K. and R. Boyne, Nature of the Zn2+ requirement for DNA synthesis by 3T3 cells. Exp Cell Res, 1991. 192(2): p. 631-4.
18. Falchuk, K.H. and A. Krishan, 1,10-Phenanthroline inhibition of lymphoblast cell cycle. Cancer Res, 1977. 37(7 Pt 1): p. 2050-6.
19. Thornton, W.H., Jr., et al., Chelation of extracellular zinc inhibits proliferation in 3T3 cells independent of insulin-like growth factor-I receptor expression. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. 219(1): p. 64-8.
20. Donadelli, M., et al., Zinc depletion efficiently inhibits pancreatic cancer cell growth by increasing the ratio of antiproliferative/proliferative genes. J Cell Biochem, 2007.
21. Kindermann, B., et al., Identification of genes responsive to intracellular zinc depletion in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29. J Nutr, 2004. 134(1): p. 57-62.
22. Sun, L., et al., Zinc regulates the ability of Cdc25C to activate MPF/cdk1. J Cell Physiol, 2007. 213(1): p. 98-104.
23. Landrieu, I., et al., Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath;CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 322(3): p. 734-9.
24. Jackson, M.D. and J.M. Denu, Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry. Chem Rev, 2001. 101(8): p. 2313-40.
25. Erikson, E. and J.L. Maller, Biochemical characterization of the p34cdc2 protein kinase component of purified maturation-promoting factor from Xenopus eggs. J Biol Chem, 1989. 264(33): p. 19577-82.
26. Cormier, P., et al., Protein phosphatase activities in vivo in Xenopus laevis oocyte: inhibition by okadaic acid. Biol Cell, 1990. 69(3): p. 233-6.
27. Kosako, H., Y. Gotoh, and E. Nishida, Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation. Embo J, 1994. 13(9): p. 2131-8.

RÉSUMÉ

MOTIFS DE RÉGULATION ET DYNAMIQUE DE LA VOIE MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE LORS DE LA TRANSITION G2/M DES OVOCYTES DE XÉNOPE

Lors de la transition G2/M des ovocytes de Xénope, la voie p39Mos-MEK1-MAPK présente des propriétés dynamiques et physiques particulières telles que l'ultrasensibilité, la bistabilité, l'irréversibilité et un caractère tout-ou-rien. Ces propriétés sont considérées dans le contexte de la boucle de rétroaction positive qui existe au sein de cette voie. L'objectif de cette thèse s'est focalisé sur le rôle de l'oncoprotéine p39Mos dans le recrutement des motifs de régulation qui permettent la mise en place de ces propriétés.

Des approches expérimentales et *in silico* ont d'abord été menées pour réaliser un modèle physiquement et biologiquement réaliste de ce réseau. Le modèle développé tient compte de l'influence du MPF sur l'accumulation de p39Mos et ajuste le rôle de la boucle de rétrocontrôle positif. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que p90Rsk, cible des MAPK, est dégradée.

La voie MAPK a ensuite été activée en absence de p39Mos. Nos résultats montrent que la 1,10-Phénanthroline monohydrate (1,10-PA) active les MAPK suivant une réponse graduelle et ultrasensible. L'action de la 1,10-PA s'exerce en absence de synthèse protéique et de toute boucle de rétrocontrôle, et pourrait agir par l'intermédiaire de l'inactivation d'une MEK-phosphatase. Dans ce contexte, un modèle de pro-action est discuté et des inhibiteurs de phosphatases ont été utilisés pour activer les MAPK en absence de p39Mos.

Nos résultats discutent finalement du rôle de la boucle de rétroaction positive dans l'activation des MAPK et montrent que l'ultrasensibilité de réponse des MAPK peut être générée par des motifs de régulation de type pro-action.

Mots clefs : MAPK, Motifs de régulation, Ultrasensibilité, Transition G2/M, Protéine phosphatase, Ovocyte de Xénope, Modèle *in silico*, Boucle de pro-action/pro-boucle

SUMMARY

REGULATION MOTIFS AND DYNAMIC OF MITOGEN ACTIVED PROTEIN KINASE CASCADE DURING *XENOPUS LAEVIS* OOCYTES G2/M TRANSITION

During G2/M transition in Xenopus oocyte, p39Mos-MEK1-MAPK cascade harbors specific dynamic and physical properties, such as ultrasensitivity, bistability, irreversibility, and all-or-none responses. These properties are generally considered in the context of the positive feedback loop that embeds the p39Mos-MEK1-MAPK pathway architecture. The objective of this work was focused onto p39Mos oncoprotein and regulation motifs recruitment enabling together the generation of such properties.

Both experimental and *in silico* approaches were undertaken in order to yield a realistic model, physically and biologically relevant for this network. We developed a model that takes into account the influence of MPF onto p39Mos accumulation, and adjusts the role of the positive feedback loop. Also, we were able to show that p90Rsk, target of MAPK, was degraded.

This signaling pathway was activated in the absence of p39Mos. Our results show that 1,10-Phénanthroline monohydrate (1,10-PA) is able to induce gradual and ultrasensitive MAPK activation. 1,10-PA action is then exerted in the absence of protein synthesis or positive feedback loop, and may request MEK-phosphatase inhibition. In this context, a feed-forward loop model can be considered, and phosphatase inhibitors were used for MAPK activation in the absence of p39Mos.

Our results confront the role attributed to the positive feedback loop in MAPK activation, and show that this ultrasensitive response may be generated *in vivo* through feed forward regulation motifs.

Keywords : MAPK, Regulation motifs, Ultrasensitivity, G2/M transition, Protein phosphatase, *Xenopus* oocyte, *In silico* model-building, Feed-forward loop