

Université de Lille1
U. F. R. de Biologie

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2009 par

Monsieur RUSSO Christophe

En vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille1

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

École Doctorale Biologie-Santé Lille1-Lille2

Dynamique et modularité de la voie Mitogen Activated Protein
Kinase dans les ovocytes de Xénope : modélisation et approches
expérimentales

Le jury est constitué par :

Monsieur Jean-Claude MICHALSKI	Président
Monsieur Jacques-Alexandre SEPULCHRE	Rapporteur
Monsieur Georges BAFFET	Rapporteur
Monsieur Albert GOLDBETER	Examinateur
Monsieur Jean-François BODART	Directeur de Thèse
Monsieur Ralf BLOSSEY	Directeur de Thèse

À Hélène et Claire.

Remerciements

Le meilleur ami de "merci" est "beaucoup". (Michel Bouthot)

Je remercie Monsieur J.-C. Michalski d'avoir accepté de présider le jury lors de ma soutenance.

Je remercie Monsieur J.-A. Sepulchre et Monsieur G. Baffet pour avoir accepté de consacrer du temps à analyser ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie Monsieur A. Goldbeter d'avoir accepté de siéger dans ce jury en qualité d'examineur.

Je remercie Monsieur J.-F. Bodart et Monsieur R. Blossey tant pour leurs qualités scientifiques qu'humaines. Le mot interdisciplinaire a pris une autre ampleur depuis nos discussions. Mon insertion au sein de chaque équipes m'a invité à penser de différentes manières un problème identique.

Je remercie Claudiu Giuraniuc pour sa contribution scientifique et sa vision toujours juste de la situation. Ta rencontre m'a enseigné que la richesse culturelle de l'Europe s'accroît avec l'apport de la Roumanie.

Je remercie Rémy Beaujois pour avoir usé de patience à m'apprendre les "manips" et d'avoir amené sa contribution à ce travail. Ton humour, parfois caustique, a été utile pour rendre les journées agréables.

Je remercie Monsieur J.-P. Vilain pour avoir accepté de relire ma thèse et pour son aide lors de la préparation de la présentation orale. Votre enthousiasme et votre talent de pédagogue suscite un grand respect.

Je remercie Franck Riquet pour avoir accordé de son temps à la relecture de ma thèse.

Merci à Claude Cocquerelle, Matthieu Marin, Katia Maggio, Edith Browaeys et Anne-Frédérique Paul pour m'avoir bien accueilli au laboratoire de Régulation des Signaux de Division. Je tient à remercier Arlette pour son aide technique précieuse lors des expériences.

Merci à l'ensemble des chercheurs de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire, spécialement à Dave Trinel et Pierre-Emmanuel Morant qui ont pris de leur temps pour m'apprendre des astuces informatiques. Un grand merci à Laurence Labaeye, Ines Bonet et Sonia Nuez pour leur soutien administratif.

"Grazie mille" à toute la "famiglia" de m'avoir soutenu moralement et concrètement.

Cette thèse a été financée par l'Institut National du Cancer (INCa).

Elle a été préparée, dans le cadre de deux unités, sous la direction de :

- Monsieur Bodart, directeur du laboratoire de Régulation des Signaux de Division de l'Université de Lille1, bâtiment SN3, 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex ;
- Monsieur Blossey, directeur de recherche CNRS au sein du groupe "biological nano-systems" à l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI), Parc de la Haute Borne 50, avenue de Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq Cedex.

Résumé

Le contexte scientifique de cette thèse considère l'étude de la voie de signalisation Mos-MEK-MAPK dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* au cours de la transition G2/M du cycle cellulaire. Une approche interdisciplinaire a conduit à l'élaboration d'une analyse, tant expérimentale que théorique de la voie Mos-MEK-MAPK.

Une étude bibliographique du sujet a permis d'identifier des articles de référence dans ce domaine. Les articles de Huang, Ferrell (1998) et Angeli *et al.* (2004) ont procuré une base théorique pour la description des interactions au sein de la voie. Une approche critique du modèle proposé par Angeli et collaborateurs a été produite, au moyen d'une résolution analytique des équations différentielles qui le constitue. Ainsi, 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 Mos. De plus, nous avons démontré que le comportement de la cascade Mos-MEK-MAPK peut être interprété *via* une approche analytique dans un cadre particulier de valeurs de paramètres.

En outre, des résultats inédits quant à l'évolution temporelle de Mos sur de longues périodes de culture après stimulation par la progestérone, ont été observés en présence d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. Par ailleurs, la maturation des ovocytes de *Xenopus laevis* a été stimulée par injection de cytoplasme contenant du MPF en présence ou non de U0126. Des analyses par western blot ont permis d'évaluer l'accumulation au cours du temps de la protéine Mos, et des états de phosphorylation de MEK, MAPK, ainsi que de la cycline B2. Il a été mis en évidence l'importance de l'activation du MPF pour l'accumulation de Mos. Le MPF peut être activé en absence de MAPK et jouer un rôle prépondérant pour l'initiation de la voie de signalisation.

Aussi, suite à ces observations expérimentales et l'analyse des modèles existants, un nouveau modèle de la cascade a été proposé, qui prend en compte trois formes différentes de la protéine kinase Mos : une forme inactive instable, une forme active instable et une forme active stable. Aux côtés de la boucle de rétro-contrôle de MAPK qui stabilise la forme active instable, l'interaction entre la forme active instable de Mos et le MPF, qui le stabilise, a été considérée. Cette dernière n'avait jamais pas été utilisée auparavant pour la modélisation de la cascade Mos-MEK-MAPK. Cette approche constitue la première proposition de modèle biologiquement et physiquement réaliste de ce réseau. La paramétrisation du modèle s'est fondée sur trois sources distinctes : (1) des mesures expérimentales trouvées dans la littérature, (2) un choix arbitré par la connaissance du comportement du modèle, (3) des estimations théoriques, à partir de plages fixées expérimentalement.

Une analyse des équilibres du modèle par bifurcation a permis de discuter de l'influence des valeurs des paramètres sur le comportement de la cascade. Cette approche permet de produire une prédiction sur le comportement de la cascade en fonction de la variation de concentration de MPF ainsi que sur l'influence de l'intensité de l'interaction entre MAPK et la forme active instable de Mos.

Les résultats de simulation obtenus avec le modèle ont été confrontés aux observations issues des expériences. Une bonne corrélation a été observée dans une optique qualitative.

Title : Dynamics and modularity of the Mitogen Activated Protein Kinase signaling pathway in *Xenopus* oocytes : modeling and experimental approaches.

Summary

The scientific context of this thesis is based on the study of the signaling pathway Mos-MEK-MAPK in *Xenopus laevis* ovocytes during the G2/M transition of the cell cycle. An interdisciplinary approach from the biological and physical sciences led us to an experimental and theoretical analysis of the pathway.

A bibliographical study identified the key articles related to this field. The articles of Huang, Ferrell (1998) and Angeli et al. (2004) gave us a theoretical basis to describe the interactions within the pathway. A critical analysis of the latter paper has been performed by means of an analytical solution of the differential equations defining the model proposed by Angeli and colleagues. Thus, the importance of the kinetic formulation type and the choice of the mathematical terms of the equations has been underlined ; especially in regard to the time variation of the Mos protein. Moreover, we have proposed an interpretation of the Mos-MEK-MAPK cascade behavior *via* an analytical approach within the context of the experimental parameter values given by Angeli.

In addition, new results regarding to the long time evolution of Mos protein have been recovered when the ovocytes are stimulated with progesterone in presence of MEK inhibitor U0126. Furthermore, ovocytes of *Xenopus laevis* were stimulated by MPF in presence or absence of U0126. Western blot analysis gave information about the time evolution of Mos accumulation and the states of MEK, MAPK and cyclin B2 phosphorylation. Data showed the importance of MPF in Mos accumulation. In absence of MAPK, MPF is produced and plays an important role in the initiation of the signaling pathway. In contrast to other models, our model has been proposed to take into account three forms of the Mos protein : an unstable inactive state, an unstable active state and a stable active state. The model considers the influence of either MPF and MAPK on the accumulation of the active stable of Mos. The influence of MPF has never been used in previous model of the Mos-MEK-MAPK signaling pathway. Our model is based on a biological and physical point of view. The parametrization of the model is based on : (1) experimental values found in literature, (2) arbitrary values constraints by the known system behavior, (3) theoretical estimations from interval of experimental values.

Bifurcation analysis of the system indicated the influence of the parameters values on the system behavior and equilibrium states. This approach produces a prediction for the behavior of the cascade in function of the MPF concentration value. It produces also a discussion for the strength of the interactions between MAPK and the active non-stable form of Mos protein.

Simulation results from our model were compared with the experimental observations from our experiments. A good qualitative agreement was found.

Mots clés :

- ultrasensibilité ;
- bistabilité ;
- modélisation ;
- MAPK ;
- oncoprotéine Mos ;
- kinase ;
- *Xenopus* ;
- ovocyte ;
- voie de signalisation.

Keywords :

- ultrasensitivity ;
- bistability ;
- modeling ;
- MAPK ;
- Mos oncoprotein ;
- kinase ;
- *Xenopus* ;
- oocyte ;
- signaling pathway.

Table des matières

Résumé	9
Summary	11
Mots clés - Keywords	13
Liste des figures	19
Liste des tableaux	23
Abréviations	25
Glossaire	27
Introduction générale	33
I Ovocyte de Xénope : un modèle d'étude du réseau moléculaire des MAPK à la transition G2/M du cycle cellulaire	37
1 L'ovocyte de Xénope	37
1.1 Le cycle cellulaire	37
1.2 L'ovocyte de Xénope	39
1.2.1 Modèle animal : <i>Xenopus laevis</i>	39
1.2.2 Le gamète femelle : une cellule bloquée au cours du cycle cellulaire .	39
1.2.2.1 Le blocage du cycle cellulaire dans les ovocytes	39
1.2.2.2 Les propriétés physiques du cycle cellulaire des ovocytes de Xénope	40
1.2.3 La reprise de la méiose : modèle de transition G2/M du cycle cellulaire	40
1.2.3.1 La progestérone stimule la reprise de méiose	41
1.2.3.2 La reprise de méiose dépend de l'activité des protéines kinases	42
1.2.3.3 La reprise de méiose dépend de la synthèse protéique	45
Synthèse protéique globale	45
Synthèse des cyclines B	47

	Autres protéines synthétisées	48
2	La voie de signalisation Mos-MEK-MAPK	49
2.1	Généralités	49
2.2	Les MAPKKK/MEKK : Raf et Mos	49
2.2.1	Raf	49
2.2.2	Mos	50
2.2.3	MAPKK/MEK	54
2.2.4	MAPK/ERK2/Mpk1	54
2.2.5	Rsk	55
2.3	Mécanismes de régulation de la voie Mos - MEK - MAPK	55
2.3.1	MAPK phosphatases	55
2.3.2	Motif de régulation de rétro-contrôle positif au sein de la voie Mos - MEK - MAPK	55
2.3.3	Interactions entre les voies MAPK et MPF	58
2.3.3.1	Régulation positive du MPF par MAPK	60
2.3.3.2	Régulation positive de MAPK par MPF	60
2.4	Méthodes d'inhibition sélective des interactions dans le réseau des MAPK .	61
2.5	Rôles physiologiques de la voie MAPK dans les ovocytes de Xénope	64
2.5.1	Le facteur cytotatique	64
2.5.2	La formation du fuseau de méiose	65
2.5.3	Suppression de la phase S lors de la transition G2/M	66
3	Modularité du réseau des MAPK	67
3.1	Notion de modules et de modularité - Généralités	67
3.2	Modularité et cascade MAPK	68
3.3	Robustesse et redondance du réseau MAPK	69
3.4	MAPK/ERK et formation du fuseau méiotique de division des ovocytes d'amphibien	71
II	Modélisation	77
4	Introduction	77
5	Le modèle MPF-Mos-MAPK	85
6	Paramétrisation du modèle	89
6.1	Valeurs des concentrations	89
6.2	Valeurs des paramètres de la cascade $Y_{1,2,3}/Z_{1,2,3}$	90
6.3	Valeurs des paramètres pour X , X_a et X_{as}	91
7	Analyse de bifurcations	93
7.1	Introduction	93
7.2	Variation d'un paramètre et comportement du système	95
7.3	Variation des paramètres k_3 et k_4 simultanément	100

8 Conclusion	105
III Accumulation de la forme active de Mos : aspects <i>in vivo</i> et <i>in silico</i>	109
9 Introduction	109
10 Évolution temporelle de Mos <i>in vivo</i>	111
10.1 Méthode d'analyse par immuno-empreinte (western blot)	111
10.2 Stimulation des ovocytes par la progestérone	111
10.3 Stimulation des ovocytes par injection de MPF	115
11 Évolution temporelle de Mos <i>in silico</i>	119
11.1 Introduction	119
11.2 Stimulation <i>in silico</i> par la progestérone	120
11.3 Stimulation <i>in silico</i> par injection de MPF	121
12 simulation et expériences	123
12.1 Stimulation hormonale en absence de rétro-contrôle exercé par MAPK . . .	123
12.2 Accumulation de Mos après stimulation de la boucle d'auto-amplification du MPF	125
12.3 Discussion	127
13 Perspectives	129
13.1 Régulation des phosphatases par Mos	129
13.2 Régulation de la protéine Emi2 par la voie Mos - MEK - MAPK	131
13.3 Régulation dynamique de MPF en amont de la voie Mos - MEK - MAPK .	131
13.4 Approche stochastique de notre modèle	132
Conclusion générale	135
Annexes	139
A Équilibre de la cascade MAPK	139
A.1 Introduction	139
A.2 Un modèle avec cinétique de type Michaelis-Menten pour la cascade MAPK	141
A.3 Bistabilité : reconsidérer le modèle de Angeli	146
B Articles publiés	149
C Article accepté	173

TABLE DES MATIÈRES

D	Dynamique d'activation de MAPK induite par 1,10-PA	211
D.1	Introduction	211
D.2	Analyse des effets de la 1,10-PA	212
D.3	Nature de la réponse des MAPK à la 1,10-PA	214
D.4	Discussion	214
	Bibliographie	217

Table des figures

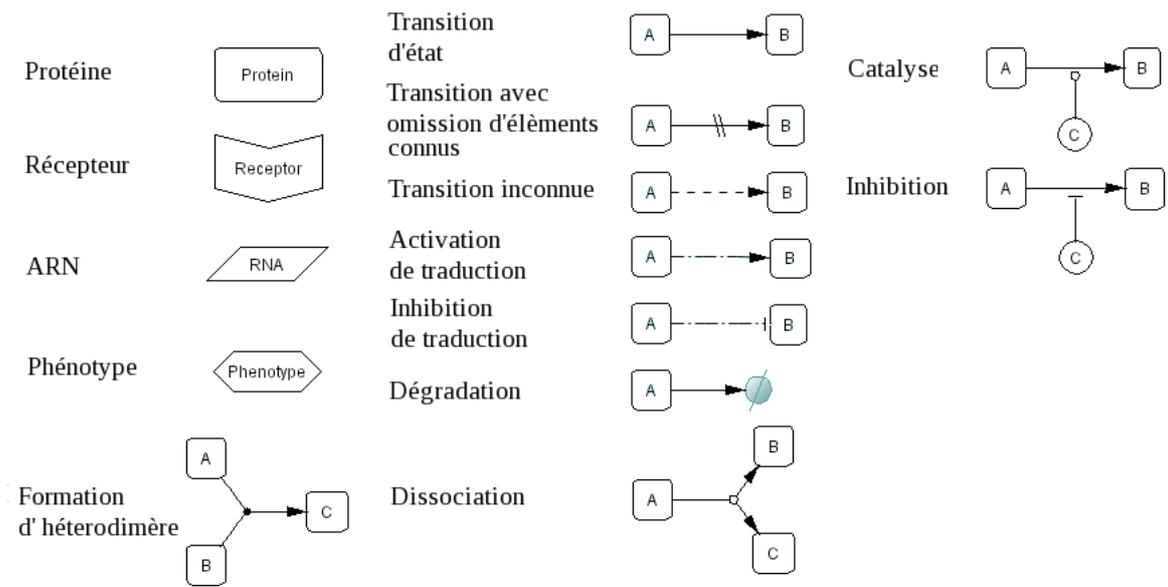
1.1	Les quatre phases du cycle cellulaire.	38
1.2	Les six stades de la croissance de l'ovocyte.	40
1.3	La maturation méiotique et les deux étapes d'arrêt en méiose.	41
1.4	Mécanismes de régulation structurel du MPF.	43
1.5	Principe des expériences menées par Masui et Markert.	44
1.6	Principaux régulateurs de l'activation du complexe MPF.	46
2.1	Polyadénylation de l'ARN de Mos.	51
2.2	États de phosphorylation de Mos.	53
2.3	Représentation schématique de la voie Mos-MEK-MAPK.	56
2.4	Variation de la concentration en MAPK/ERK actif (doublement phospho- rylé) selon le type cellulaire.	58
2.5	Schéma de l'interaction entre la cascade Mos-MEK-MAPK et la voie de synthèse de MPF.	59
3.1	Modèle modulaire de la voie MAPK dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	70
3.2	Morphogenèse du fuseau en absence d'activité MAPK.	72
3.3	Les motifs de régulation et modules.	74
4.1	Fonction de Hill.	79
4.2	Illustration du phénomène d'hystérèse.	81
5.1	Représentation du réseau étudié dans CellDesigner.	86
7.1	Évolution de la concentration de X_{as} en fonction du temps.	94
7.2	Diagramme de bifurcations avec variation des paramètres $k_{1,3,4}$	96
7.3	Diagramme de bifurcations avec variation des paramètres $k_{5,6,7}$	97
7.4	Diagramme de bifurcations avec variation du paramètre k_2	99
7.5	Diagramme de bifurcations avec variation des paramètres k_3 et k_4	100
7.6	Diagramme de bifurcations avec variation du paramètre MPF.	101
7.7	Diagramme de bifurcations avec variation du paramètre MPF dans le cas d'une transition irréversible de type I.	102
7.8	Diagramme de bifurcations avec variation des paramètres MPF et k_4	103
10.1	Valeurs normalisées de concentration de Mos par immuno-empreinte.	113

TABLE DES FIGURES

10.2	Analyse cellule par cellule par western blot des états de Mos, MAPK (ERK2), la cycline B2, la Phospho-Tyrosine 15 cdc2 et l'Actine.	113
10.3	Accumulation de Mos actif suivant la stimulation par la progestérone en présence d'U0126.	114
10.4	Dynamique d'accumulation de Mos en absence d'U0126.	116
10.5	Dynamique d'accumulation de Mos en absence de MAPK.	117
11.1	Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$. Stimulation par la progestérone en présence d'U0126.	120
11.2	Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$. Stimulation par MPF en présence d'U0126.	121
11.3	Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$. Simulation par MPF sans U0126.	122
12.1	Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentales de Mos actif. Stimulation par la progestérone en présence d'U0126.	124
12.2	Variation théorique de MPF selon un profil de deux gaussiennes successives.	125
12.3	Superposition des courbes issues des expériences <i>in vivo</i> et <i>in silico</i> dans le cas d'une injection de MPF (absence de stimulation par la progestérone et présence de la boucle de rétro-contrôle positif).	126
12.4	Superposition des courbes issues des expériences <i>in vivo</i> et <i>in silico</i> dans le cas où l'injection de MPF se déroule en présence d'U0126 et en absence de progestérone.	127
13.1	Diagramme de bifurcation avec variation des paramètres P_y et P_z et leur influence sur le comportement du système.	130
A.1	Schéma de la cascade MAPK dans le modèle simplifié proposé par Angeli (Angeli <i>et al.</i> , 2004) dans sa version étendue.	140
A.2	Concentration de w_1 en fonction de X.	145
A.3	z_1 et ses formes phosphorylées z_2 et z_3	145
A.4	Variation du taux de synthèse et dégradation en fonction de X. Avec deux points d'intersections.	147
A.5	Variation du taux de synthèse et dégradation en fonction de X. Avec trois points d'intersection.	147
D.1	Analyse par immunoempreinte du profil électrophorétiques de MAPK/Erk ,cellule par cellule, traités par la 1,10-PA.	212
D.2	Pourcentage de MAPK activé en fonction de la concentration de 1,10-PA.	213
D.3	Variation de la proportion théorique et expérimentale de MAPK phosphorylé	215

Légende des diagrammes CellDesigner

Liste des principaux symboles utilisés dans les diagrammes représentant les processus traités par CellDesigner.



Liste des tableaux

2.1	Effets des stratégies d'inhibition de la cascade MAPK sur l'accumulation de l'oncoprotéine Mos.	62
2.2	Valeurs des concentrations disponibles des protéines utilisées pour la modélisation de la voie MAPK.	63
2.3	Valeurs des concentrations disponibles des ARN messagers chez <i>Xenopus laevis</i> et leur polyadénylation.	63
6.1	Valeurs des concentrations totales des protéines kinases et phosphatases . .	89
6.2	Valeurs des paramètres pour la cascade $Y_{1,2,3} / Z_{1,2,3}$	91
6.3	Valeurs des paramètres liés à la régulation de X , X_a et X_{as}	92

Abréviations

1,10-PA 1,10-phénanthroline monohydrate	malE-mos <i>Escherichia coli</i> maltose-binding protein fusion with <i>Xenopus</i> c-mos protein kinase
APC Anaphase promoting complex	MAPK Mitogen-activated protein kinase
ARNm Acide ribonucléique messenger	MAPKKK Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
CaMKII Calcium dependent calmoduline kinase II	MAPKK Mitogen-activated protein kinase kinase
Cdc Cell division cycle	MEK MAPK / ERK protein kinase
CDK Cyclin dependent kinase	Mkp MAPK phosphatase
CPE Cytoplasmic polyadenylation element	Mos une oncoprotéine de type MAPKKK
CPEB Cytoplasmic polyadenylation element binding protein	Mos - MoAS Morpholinos Oligonucléotides antisens contre la synthèse de mos
CSF Cytostatic factor	Mos - POAS Phosphodiester Oligonucléotides antisens contre la synthèse de mos
DMSO Dyméthyl sulfoxide	Mos - PTAS Phosphorothioates Oligonucléotides antisens contre la synthèse de mos
DUSP Dual Specificity Protein Phosphatase	MRA Modular Response Analysis
ERK Extracellular regulated protein kinase	PKA Protéine kinase A
GSK-3β Glycogene synthase kinase 3 β	Rsk Ribosomal S6 subunit protein kinase
GVBD Germinal vesicle breakdown (rupture de l'enveloppe nucléaire)	SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Hsp90 Heat shock protein 90	WS White spot
IGF1 Insulin-like growth factor 1	
JNK Jun N-terminal protein kinase	
LF Lethal factor	

Glossaire

Anaphase : étape de la division cellulaire durant laquelle les chromatides soeurs sont séparées par le fuseau de division.

Aneuploïdie : caractéristique d'une cellule dont le noyau possède un nombre anormal de chromosomes.

Bistabilité d'un système : un système est bistable lorsqu'il a la possibilité de se trouver dans un de ses deux états d'équilibre stable. De manière dynamique, il se déplace au travers d'un état d'équilibre instable accessible entre les deux états d'équilibre stable. Par exemple, une balance à bascule symétrique 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 car un petit surplus d'un côté conduit le système vers l'état stable de ce côté.

Boucle d'auto-amplification : motif de régulation au sein d'un réseau d'interactions. Ce motif désigne l'ensemble des interactions qui influence la production d'un substrat par lui-même.

Boucle de pro-action : (feed-forward loop or one-two punch) motif de régulation au sein d'un réseau d'interactions. Ce motif affecte un substrat en aval par deux moyens : un lien direct et un lien indirect (nécessitant un intermédiaire).

Boucle de rétro-contrôle négative : motif de régulation au sein d'un réseau d'interactions, dans lequel l'un des composants active, après délai, son inhibiteur. Cela induit l'oscillation de l'activité de ce composant ou mène à l'extinction de l'activité.

Boucle de rétro-contrôle positive : motif de régulation au sein d'un réseau d'interactions, dans lequel l'un des composants active, après délai, son activateur. Par conséquent, le processus d'activation est renforcé et produit un comportement stable de l'activité du composant.

Complexe de promotion de l'anaphase : enzyme de type E3. Il s'agit d'une ubiquitine ligase qui catalyse la liaison d'une ubiquitine à certaines protéines mitotiques. Ainsi marquées, ces dernières sont reconnues et ensuite dégradées par le complexe protéolytique du protéasome.

Cytokinèse : dernière étape de la phase M durant laquelle les noyaux dupliqués et les composants du cytoplasme sont distribués dans les cellules filles lors de la division de la cellule mère.

Gamète : cellule germinale haploïde, ovule ou spermatozoïde, qui lors de la fécondation, fusionne avec un autre gamète pour former une cellule diploïde appelée zygote.

Hystérèse (cycle d'hysteresis) : propriété non-linéaire d'un système qui tend à conserver un état après avoir subi une stimulation. Dans le cas d'un système bistable, la réponse à un stimulus identique est différente en fonction de l'état initial du système. Ainsi, les courbes de réponses/stimuli montrent deux valeurs distinctes de stimuli pour réaliser une transition d'état.

Maturation ovocytaire : chez l'amphibien, processus durant lesquels le gamète femelle acquiert les compétences nécessaires à la fécondation et au développement précoce.

Méiose : processus de division cellulaire dont la particularité est de produire des cellules dont le nombre de chromosomes est divisé par deux. Cela aboutit à la production de cellules sexuelles haploïdes, ou gamètes pour la reproduction.

Métaphase : étape de la phase M durant laquelle les chromatides soeurs sont attachées et alignées au niveau du fuseau de division.

Mitogène : caractéristique d'une molécule extracellulaire qui induit la prolifération cellulaire.

Mitose : division cellulaire d'une cellule mère en deux cellules filles qui possèdent un nombre de chromosomes identique à la cellule mère.

Oncogène : un gène dont la protéine induit la formation d'une cellule cancéreuse suite à une mutation ou un réarrangement produit à partir d'un gène normal (proto-oncogène)

Phosphorylation : modification post-traductionnelle d'une protéine par l'ajout d'un groupe phosphate sur un ou plusieurs de ses résidus.

Plaqué métaphasique du fuseau : plateau formé à l'intersection de faisceaux bipolaire de microtubules qui séparent les chromatides soeurs de part et d'autre du plateau. Ce dernier indique l'emplacement de la séparation entre les deux cellules filles.

Point de contrôle du cycle cellulaire : point de transition dans le cycle cellulaire où la progression des événements du cycle peut être stoppée, après contrôle, par un ensemble de mécanismes moléculaires.

Prométaphase : étape de la phase M durant laquelle l'enveloppe nucléaire se désagrège. Les chromatides soeurs continuent leur condensation au niveau du plateau de division et s'ancrent aux microtubules pour former des centromères.

Pronucleus : Lors de la fécondation, le pronucleus désigne les deux noyaux haploïde du mâle et de la femelle situés dans l'ovocyte avant leur fusion.

Prophase : étape de la phase M durant laquelle l'ADN débute sa condensation. À partir de centrosomes de part et d'autre du noyau, des fuseaux de microtubules commencent à se former.

Protéasome : enzyme formée de plusieurs sous-unités qui dégrade les protéines en petits peptides.

Télophase : étape de la phase M durant laquelle les chromatides soeurs séparées progressent l'une et l'autre vers les centres des deux cellules filles. Les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme.

Ultrasensibilité : caractéristique d'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. En biochimie, elle caractérise une cinétique où le coefficient de Hill est supérieur à 5.

Introduction générale

Contexte de travail

Le contexte scientifique de ma thèse a été l'étude de la voie de signalisation Mos-MEK-MAPK dans l'ovocyte de l'espèce *Xenopus laevis* lors de la transition G2/M du cycle cellulaire. Financé par l'Institut National du Cancer (INCa), l'objectif était de permettre à un doctorant avec une formation mathématique, physique ou informatique de mener une approche interdisciplinaire autour d'un sujet biologique donné. Mon travail s'est ainsi focalisé sur une analyse tant expérimentale que théorique de la voie Mos-MEK-MAPK.

La voie MEKK-MEK-MAPK est une voie de signalisation étudiée de manière approfondie dans le cadre de la régulation du cycle cellulaire. Cette voie joue un rôle crucial dans des aspects de la vie cellulaire tels que

- le bon déroulement de la méiose/mitose ;
- la différenciation ;
- la prolifération.

Le modèle biologique de l'ovocyte de *Xenopus laevis* a permis historiquement de déterminer la nature biochimique des protéines qui régulent le cycle cellulaire tel que le MPF et permet encore à l'heure actuelle d'explorer les interactions mutuelles des régulateurs du cycle cellulaire, en particulier lors de la transition G2/M du cycle cellulaire. De part la disponibilité de nombreux résultats expérimentaux et les propriétés favorables de cet organisme modèle pour en obtenir de nouveaux, il a été développé plusieurs modèles mathématiques utiles pour décrire la voie Mos-MEK-MAPK et interpréter les observations obtenues. Les résultats de ces travaux indiquent que la cascade Mos-MEK-MAPK, soumise à un stimulus hormonal par la progestérone, produit une réponse sigmoïde ultrasensible de type tout-ou-rien. En fonction d'un certain niveau seuil de concentration en progestérone, la concentration de MAPK est stable soit avec une valeur minimale, soit avec une valeur maximale. Il a été proposé l'existence d'une interaction entre MAPK et Mos, nommée boucle de rétro-contrôle pour expliquer cette bistabilité des concentrations des protéines de la cascade.

Résultats majeurs

Dans le cadre de cette thèse, il est proposé un nouveau modèle qui prend en compte, en plus de l'hypothèse de la boucle de rétro-contrôle entre MAPK et Mos, la présence de formes diverses de la protéine Mos telle qu'elles ont été observées lors d'expériences rapportées dans la littérature. De plus, ce modèle introduit une influence directe du MPF au niveau de la stabilisation de la protéine Mos, d'une manière analogue à l'interaction proposée entre MAPK et Mos.

L'analyse du modèle avec une méthode d'analyse par bifurcation des paramètres permet de déterminer l'influence de la valeur de chaque paramètre sur le comportement du modèle ; et donc de produire une prédiction qualitative sur le comportement de la cellule lorsque les valeurs des paramètres sont perturbées. Ainsi, on obtient une estimation de la robustesse de la cellule vis-à-vis des modifications des conditions phyco-chimiques qui influent sur la valeur des paramètres (e.g. le pH, la température, ...).

Les résultats de la simulation mathématique produits par le modèle sont confrontés

aux nouveaux résultats expérimentaux obtenus par Rémy Beaujois, doctorant au sein du laboratoire de Régulation des Signaux de Division.

L'analyse par bifurcation des paramètres nous indique que le comportement de notre modèle de la cascade est en accord avec le comportement de type tout-ou-rien fourni dans la littérature. À l'instar d'autres modèles, la présence de la boucle de rétro-contrôle est nécessaire pour obtenir la propriété de bistabilité de la cascade. Cependant, notre modèle fournit une contrainte sur le niveau minimum de spécificité de l'interaction entre MAPK et Mos.

Au sujet de la transition entre les deux états stables, l'analyse du modèle montre que cette transition est soit réversible, soit irréversible. Ces différents types de transition sont obtenus en fonction de la valeur de la constante de spécificité de l'interaction entre MAPK et Mos.

Concernant l'apport de la prise en compte de la concentration de MPF, l'analyse indique que cette dernière induit une variation du niveau de Mos actif et stable. Ainsi, MPF tient un rôle non négligeable dans la régulation de la cascade.

Il y a un relatif bon accord entre les expériences réalisées au sein de notre laboratoire et les résultats théoriques. Alors que le type de cinétique des réactions choisi pour le modèle est linéaire. De plus, au niveau de la synthèse protéique de Mos le degré réaliste du modèle est restreint par l'absence de prise en compte des régulations à ce niveau. Ce modèle prend comme hypothèse que la vitesse de traduction et de synthèse de Mos est constante en présence de MPF et/ou MAPK. Bien que l'ensemble des interactions qui règle la polyadénylation et la traduction des ARNm ne sont pas suffisamment connues, il a été déterminé que MPF et MAPK tiennent un rôle dans l'initiation de la polyadénylation de l'ARN messager de Mos.

Plan de travail

Le plan général de cette thèse est constitué sous forme d'un triptyque. La première partie concerne les aspects biologiques, théoriques et expérimental, de la régulation de la voie Mos-MEK-MAPK lors de la transition G2/M. La seconde partie introduit le modèle mathématique composé du système d'équations différentielles ordinaires. Nous proposons des résultats originaux de l'analyse de bifurcation sur les paramètres du modèle. Parmi ces résultats, on note l'importance des valeurs de paramètres, liés à la stabilisation de Mos par MPF et MAPK, sur la possibilité d'avoir un comportement bistable de la cascade. La troisième partie discute la confrontation de résultats théoriques et expérimentaux.

**Ovocyte de Xénope : un modèle
d'étude du réseau moléculaire des
MAPK à la transition G2/M du
cycle cellulaire**

Chapitre 1

L'ovocyte de Xénope : un gamète pour l'étude du cycle cellulaire

1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire d'une cellule eucaryote est défini par une succession d'événements qui conduisent à la division d'une cellule mère en deux cellules filles. Chaque étape nécessite l'accomplissement de l'étape précédente. Quatre grandes étapes constituent ce cycle (figure 1.1) : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M. L'ensemble de G1, S et G2 constitue l'interphase ; la phase M est la phase de division cellulaire proprement dite. Durant la phase G1, le volume cellulaire augmente et la cellule prépare la phase suivante, dite S. La phase S correspond au moment où se déroule la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN). La phase G2 est une phase analogue à la phase G1 dans la mesure où elle constitue une phase de préparation mais prépare quant à elle la division proprement dite. La phase M correspond à la ségrégation du matériel génétique répliqué, suivant quatre étapes successives : Prophase, Métaphase, Anaphase et Télaphase. À l'issue de ces étapes, la cellule fille peut engager un nouveau cycle de division ou entrer dans un état d'inactivité temporaire de division, que l'on dénomme quiescence ou phase G0.

Les mécanismes moléculaires essentiels au contrôle du cycle cellulaire sont similaires dans toutes les cellules eucaryotes. Les événements de division cellulaire et de ségrégation du matériel génétique sont gouvernés par l'activation périodique de kinases dépendantes de cyclines (Cdk), de leurs partenaires régulateurs (cyclines), ainsi que des enzymes qui modulent positivement ou négativement leur(s) activité(s). Le contrôle biologique du cycle cellulaire a fait l'objet de travaux récompensés par un prix Nobel de médecine en 2001 (Tim Hunt, Leland Hartwell et Paul Nurse).

La machinerie moléculaire garantit le bon déroulement du cycle cellulaire complexe qui effectue ses tâches sous la dépendance d'un ensemble particulier de contraintes physico-chimiques qui doivent être satisfaites :

- Le respect de la compartimentation de l'espace et de la séparation physique des fonctions : le noyau, les mitochondries, etc.
- La cellule doit conserver sa capacité de réponse aux stimuli externes qui influencent son comportement : le maintien des interactions avec l'environnement.

- La mémoire des réactions chimiques doit être transmise aux cellules filles.
- La transmission correcte du matériel génétique aux cellules filles.

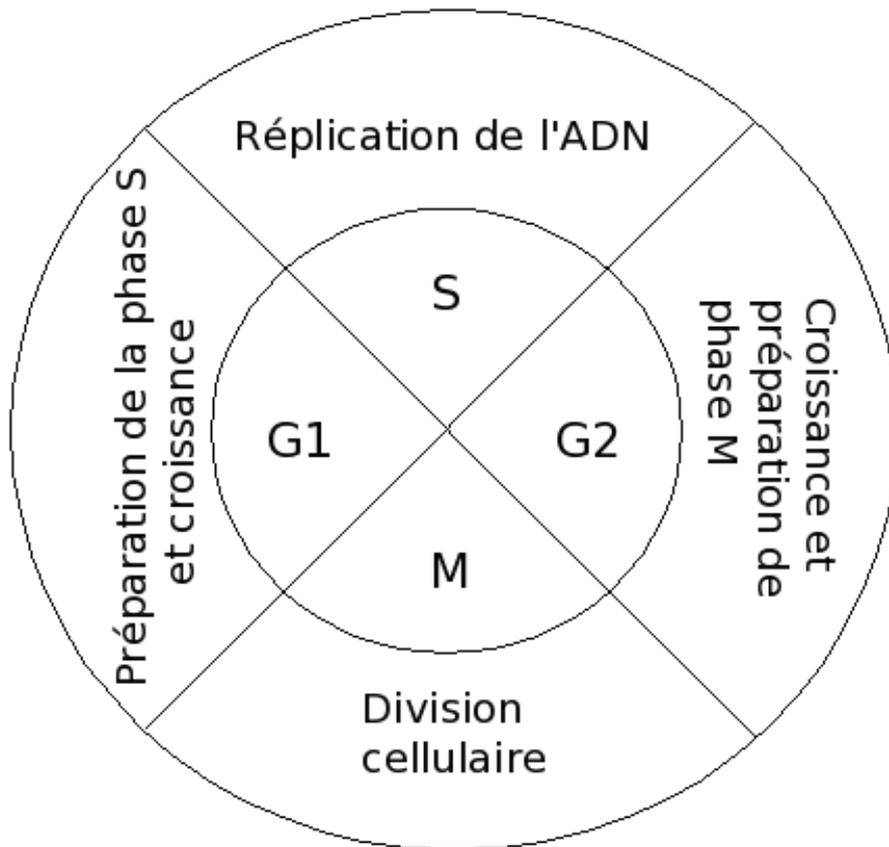


FIG. 1.1 – Les quatre phases du cycle cellulaire.

Des mécanismes de contrôle sont présents durant la phase M pour permettre de vérifier le bon déroulement de la réplication. D'autres types de "contrôles de qualité" se déroulent également en dehors de la phase M. On distingue trois points de contrôle où le cycle cellulaire peut être interrompu : lors de la transition G1/S si l'ADN est endommagé, lors de la transition G2/M si la réplication n'a pas eu lieu correctement, lors de la transition métaphase-anaphase si les chromosomes ne sont pas bien alignés au niveau de la plaque métaphasique.

La réalisation de chaque phase du cycle et son éventuel arrêt est subordonné à un système de contrôle du cycle, composé d'un réseau de protéines en interactions. Le plus grand ensemble de ces protéines provient de la famille des enzymes Cdk. Celles-ci sont notamment régulées par leurs interactions avec des cyclines et des inhibiteurs de Cdk, les CKI (Cdk Inhibitors) comme p27, p21 ou encore p16. La variation de concentration des cyclines produit des oscillations d'activité des Cdk avec qui elles sont associées en

complexe, et contrôlerait majoritairement la progression du cycle cellulaire (Evans *et al.*, 1983).

D'autres kinases participent également à la progression du cycle cellulaire parmi laquelle se trouve la famille des kinases "Mitogen-activated protein kinases" (MAPK). Les MAPK tiennent un rôle important lors de la transition G1/S mais exercent également des fonctions non génomiques lors de la transition G2/M. De plus, elles jouent un rôle crucial dans la bonne formation du fuseau de division.

1.2 L'ovocyte de Xénope

1.2.1 Modèle animal : *Xenopus laevis*

Parmi les modèles de biologie du développement, l'ovocyte de l'amphibien *Xenopus laevis* ou dactylère du Cap est particulièrement adapté à l'étude du cycle cellulaire, de part ses propriétés physiologiques et biochimiques : la synchronicité physiologique (blocage en G2 ou blocage en métaphase II), une grande capacité de synthèse protéique (200 à 400 ng / jour) et la taille des cellules (1,2-1,4 mm de diamètre) qui facilite leur manipulation (micro-injection, électrophysiologie).

L'espèce *Xenopus laevis* se classe parmi les pipidés. Vivant en Afrique du Sud, cette espèce est exclusivement aquatique ; son adaptation est telle que l'espèce n'a pas conservé de langue et d'yeux mobiles. Son mode de reproduction est externe : les oeufs sont pondus en grappes et fécondés.

1.2.2 Le gamète femelle : une cellule bloquée au cours du cycle cellulaire

Un gamète femelle est également appelée ovocyte et possède la capacité d'être fécondé par le spermatozoïde. Cette cellule est haploïde.

1.2.2.1 Le blocage du cycle cellulaire dans les ovocytes

Les ovocytes extraits de l'ovaire présentent divers stade de croissance illustrés figure 1.2. Les ovocytes de stade VI sont les plus grands (1,2 mm de diamètre minimum) et présentent un pôle animal pigmenté, un hémisphère végétatif peu pigmenté et un anneau équatorial dépigmenté ; les ovocytes de stade I, II, III, IV et V ont des tailles respectives de 50-300, 300-450, 450-600, 600-1000 et 1000-1200 μm (figure 1.2) ; les stades I et II sont dépigmentés. La pigmentation est homogène dans les ovocytes de stade III, tandis que la différence animal-végétatif apparait au stade IV et devient nette au stade V. Seuls les ovocytes de stades V et VI sont compétents pour répondre à la progestérone (voir section 1.2.3).

Les ovocytes de stade VI (classification de Dumont (Dumont, 1972)) sont arrêtés et synchronisés en prophase de première division de méiose (figure 1.3). La méiose constitue un processus particulier de division cellulaire, elle comprend deux divisions successives (réductionnelle et équationnelle) en absence de synthèse d'ADN. A chaque division, les

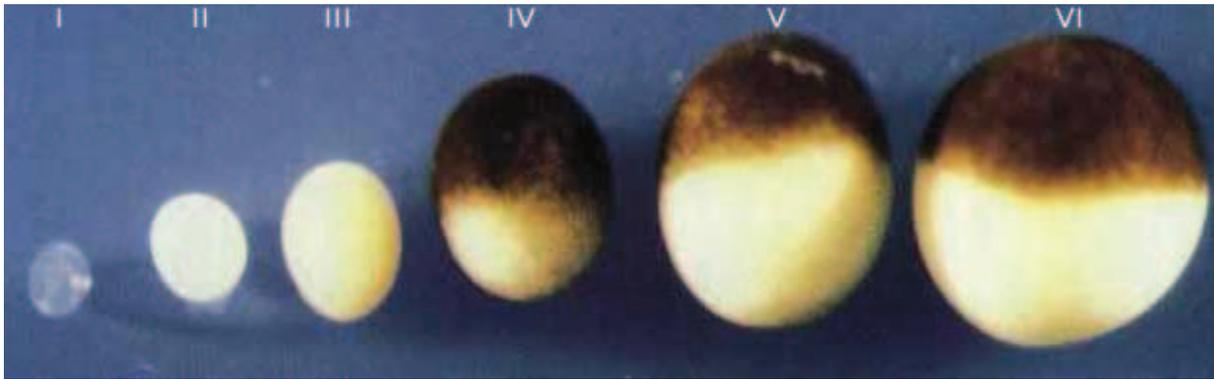


FIG. 1.2 – Les six stades de la croissance de l’ovocyte (d’après www.nd.edu/~huberlab/home.html).

cellules filles produites contiennent un nombre plus faible de chromosomes. Cela est dû à l’absence de phase S.

1.2.2.2 Les propriétés physiques du cycle cellulaire des ovocytes de Xénope

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 X.J., 2006).

Le franchissement de la transition G2/M et l’entrée en phase M sont aisément obtenus par la sur-expression de MEK (MAPK Kinase) (Bodart *et al.*, 2002b) ou par stimulation des voies Ras dépendantes (ces cellules expriment de façon endogène un seul type de récepteur tyrosine kinase à l’insuline et à l’IGF1) ou par stimulation d’une voie Ras indépendante (progestérone) (Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2002b).

Ce modèle offre par ailleurs d’impressionnantes possibilités quant aux études biochimiques ; les ovocytes contiennent des taux élevés de protéines. Chaque cellule contient par exemple de 50 à 70 ng de la sous-unité catalytique de la PKA (1 ovocyte = 50 000 cellules somatiques). Ainsi, l’activité de la protéine kinases MAPK peut être détectée par western blot sur $\frac{1}{10}$ du volume d’une cellule, permettant la réalisation d’étude de motif de régulation de type rétro-contrôle dans une seule cellule (Ferrell et Machleder, 1998).

1.2.3 La reprise de la méiose : modèle de transition G2/M du cycle cellulaire

Le cadre de ce travail s’est intéressé à l’arrêt au point de transition G2/M qui correspond à l’arrêt en prophase méiotique. Comme précédemment mentionné, les ovocytes de stade VI sont bloqués et synchronisés en prophase de méiose I. Cet état cellulaire caractérise l’état initial des ovocytes quant à la maturation, qui est stimulée par des hormones stéroïdes.

L'ensemble des événements nucléaires et cytoplasmiques qui assure la progression d'un ovocyte de la prophase I à la métaphase II est appelé maturation ovocytaire (figure 1.3).

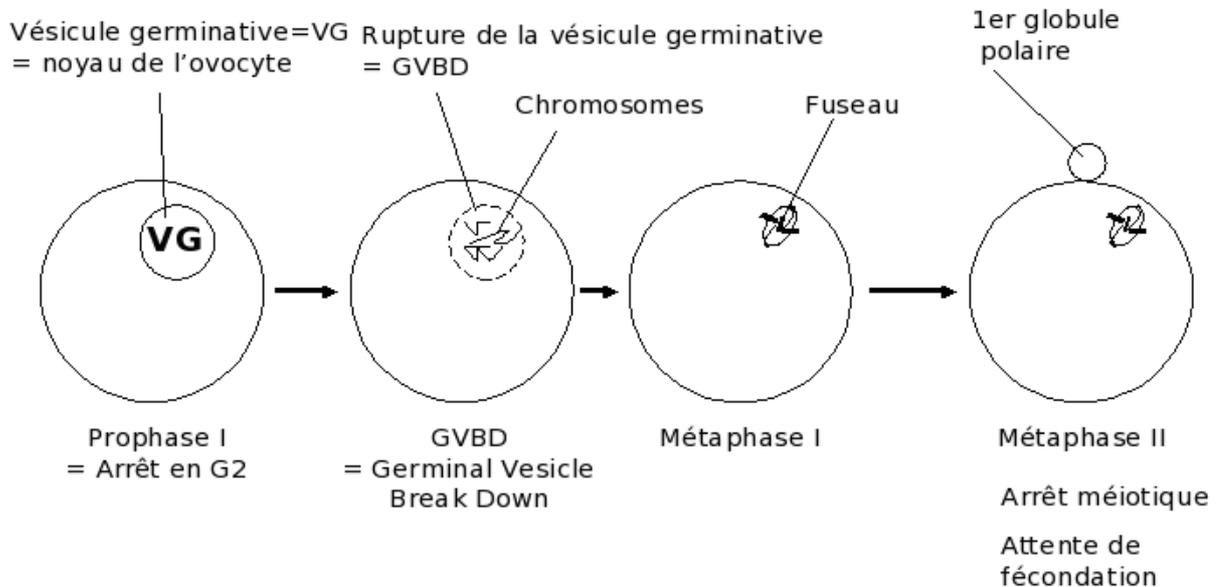


FIG. 1.3 – La maturation méiotique et les deux étapes d'arrêt en méiose. (Modifié d'après "Le cycle cellulaire", Galas, De boeck édition. 2008)

1.2.3.1 La progestérone stimule la reprise de méiose

La reprise du cycle cellulaire est stimulée en incubant les ovocytes dans des solutions contenant de la progestérone. À l'issue de la première division de méiose, la deuxième division s'engage mais s'arrête aussitôt en métaphase.

En 1968, Dennis Smith a rapporté que les cellules folliculaires produisent un facteur capable d'induire l'ovulation : il a proposé que la progestérone soit ce facteur, dans la mesure où la progestérone induit la maturation *in vitro* à des concentrations inférieures au micromolaire (Smith et Ecker, 1968). L'identification claire d'un récepteur aux stéroïdes reste toujours soumise à controverse. Ce récepteur doit être membranaire ou très proche de la surface cellulaire :

- des stéroïdes liés de façon covalente à des polymères de haut poids moléculaire sont capables d'induire la maturation (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Godeau *et al.*, 1978) et les injections de progestérone n'induisent pas la reprise méiotique (Drury et Schorderet-Slatkine, 1975) ;
- des sites de haute affinité pour les stéroïdes ($10 < K_d < 100$ nM) sont détectés dans les préparations de membranes ovocytaires (Liu et Patino, 1993; Lutz *et al.*, 2000; Morrill *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2002).

La rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD), et par conséquent l'entrée en phase M, est observable au niveau macroscopique par l'apparition d'une tâche de maturation en surface du pôle animal. Après stimulation hormonale, la vésicule germinative (GV) migre

en direction du pôle animal. Au cours de ce déplacement, la vésicule repousse les pigments situés à proximité de la surface ce qui produit une zone dépigmentée qui forme la tâche de maturation. L'apparition de cette tâche permet d'attester de la transition de la phase G2 vers la phase M.

La stimulation par la progestérone de l'ovocyte induit une maturation indépendante de toute transcription (Baltus *et al.*, 1973, Schorderet et Drury, 1973), c'est pourquoi il est possible d'étudier les voies de transduction dans leur fonction non-génomique. Cette propriété est très importante dans le cadre de ce travail, puisque nous nous intéressons aux fonctions non-génomiques des protéines MAPK, car elle permet de nous émanciper des effets des MAPK au niveau de la régulation transcriptionnelle. La présence de stocks d'ARNm et de protéines et l'absence de production de nouveaux matériaux biologiques permettent de réaliser des inhibitions sélectives de forte amplitude appliquées aux entités biologiques étudiées (ARNm et protéines).

1.2.3.2 La reprise de méiose dépend de l'activité des protéines kinases

L'utilisation d'inhibiteurs de kinases à large spectre, tels que la roscovitine, l'olomoucine et la 6-Diméthyl aminopurine (6-DMAP) inhibe la maturation ovocytaire (Maller *et al.*, 1977; Flament *et al.*, 2000).

Comme précédemment mentionné, des cyclines et les Cdks sont des acteurs majeurs de la progression du cycle cellulaire. Les Cdks forment des complexes hétérodimériques avec des cyclines, dans un assemblage qui est nécessaire pour activer la Cdk. Les phases d'activation et désactivation de la Cdk durant le cycle sont régulées par la présence intermittente des cyclines.

Les kinases Cdks sont des sérine-thréonine kinases partageant un domaine catalytique commun. Leur liaison avec une cycline, accompagnée souvent d'une phosphorylation d'un résidu thréonine, produit un complexe actif. Les Cdks actifs phosphorylent leurs substrats spécifiques sur des séquences consensus (S/T-P-X-K/R). Ces substrats phosphorylés sont considérés comme des effecteurs du cycle cellulaire. Le premier complexe de cycline-Cdk qui fut caractérisé est celui qui régule la transition G2/M.

Lorsque le cytoplasme d'un ovocyte de *Rana pipiens* préalablement incubé dans un milieu contenant de la progestérone, est injecté dans un ovocyte immature receveur, ce dernier subit une maturation rapide (Masui et Markert, 1971). Ce facteur a été appelé MPF pour "Maturation Promoting Factor" ; l'activité de ce dernier est clairement dépendante de son état de phosphorylation (Wu et Gerhart, 1980). Sa purification a montré qu'il est composé de deux sous-unités (Lohka *et al.*, 1988). Le MPF est un facteur universel d'entrée en phase M, indépendant de l'espèce ou du phylum considéré. En effet, des injections croisées entre ovocytes d'espèces différentes (amphibiens, souris, étoile de mer) déclenchent l'entrée en phase M (Reynhout et Smith, 1974; Wasserman et Smith, 1978). Responsable également de l'entrée en mitose (Sunkara *et al.*, 1979), le MPF est constitué d'une sous-unité catalytique de type Ser-Thr kinase, Cdk1 (ou Cdc2), et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B (Masui, 1996; Masui, 2001; Nurse, 2001; Nurse, 2002) (figure 1.4). Cdk1, initialement identifiée par l'étude de mutants thermosensibles chez les levures (mutants Cdc), est le premier membre d'une famille de kinases portant un motif de 16 acides aminés (PSTAIRE), dont l'activité nécessite leur liaison à une cycline ou une

“cyclin-like protein”. Au contraire des Cdks, le taux des cyclines varie en fonction des phases du cycle cellulaire (Evans *et al.*, 1983).

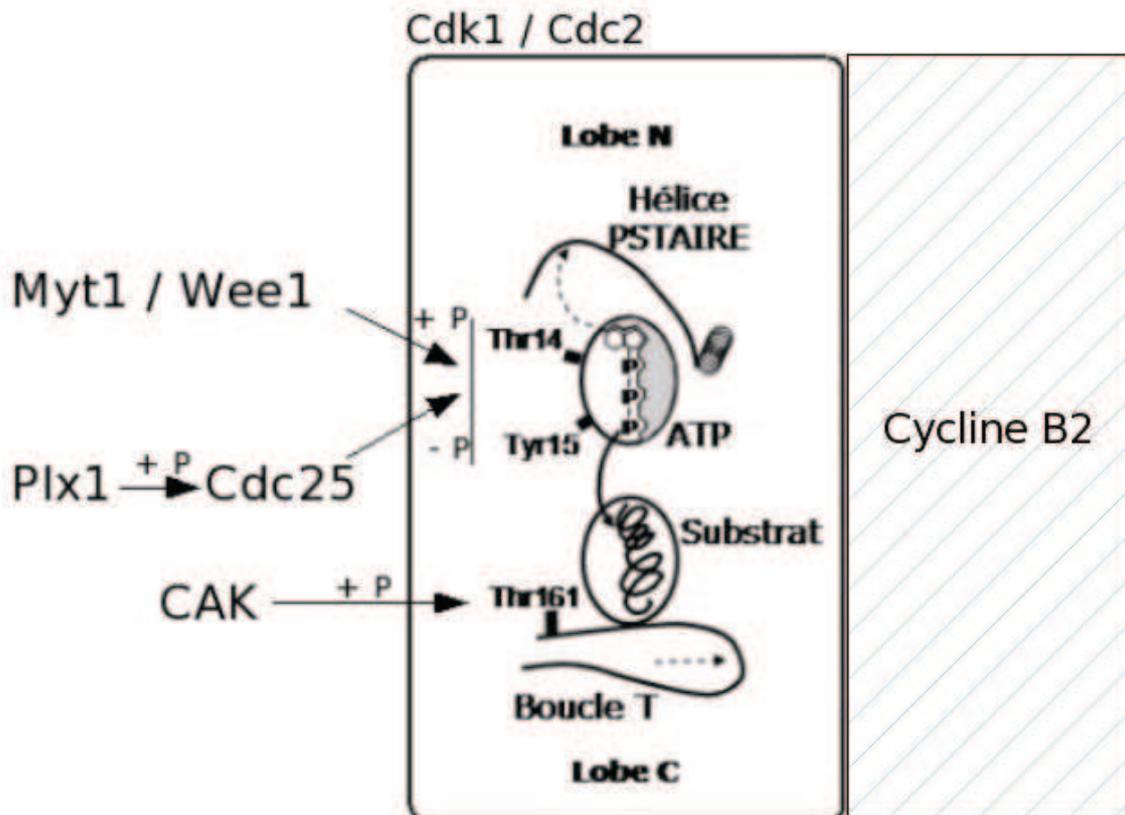


FIG. 1.4 – Mécanismes de régulation structurel du MPF. Hélice PSTAIRE : hélice α dans la partie N-terminale des Cdks, qui interagit avec la cycline. Après liaison avec la cycline, cette hélice est réorientée. La séquence de cette hélice est conservée dans la majorité des Cdks. Boucle T (d’activation) : boucle flexible adjacente du site actif, qui contient un site de phosphorylation requis pour atteindre une activité maximale. L’étude structurale de l’activation des Cdks repose principalement sur les études menées sur Cdk2. +P : phosphorylation ; -P : déphosphorylation.

La figure 1.5 illustre le principe de la méthode utilisée lors des expériences menées par Masui et Markert. Des ovocytes sont stimulés par la progestérone et la maturation ovocytaire se déroule jusqu’au blocage en métaphase II. Une faible quantité de cytoplasme est alors prélevée de ces ovocytes (20 à 50 nl) et est injectée dans un ovocyte bloqué en prophase I. On observe que l’ovocyte receveur de l’injection entame un processus de maturation ovocytaire en absence de stimulation hormonale. Les propriétés du MPF ont été déterminées au moyen de plusieurs expériences qui ont utilisé cette méthode avec

divers traitement du cytoplasme contenant du MPF soit par des DNases, des RNases, et par dialyse, soit par des protéases ou encore la chaleur.

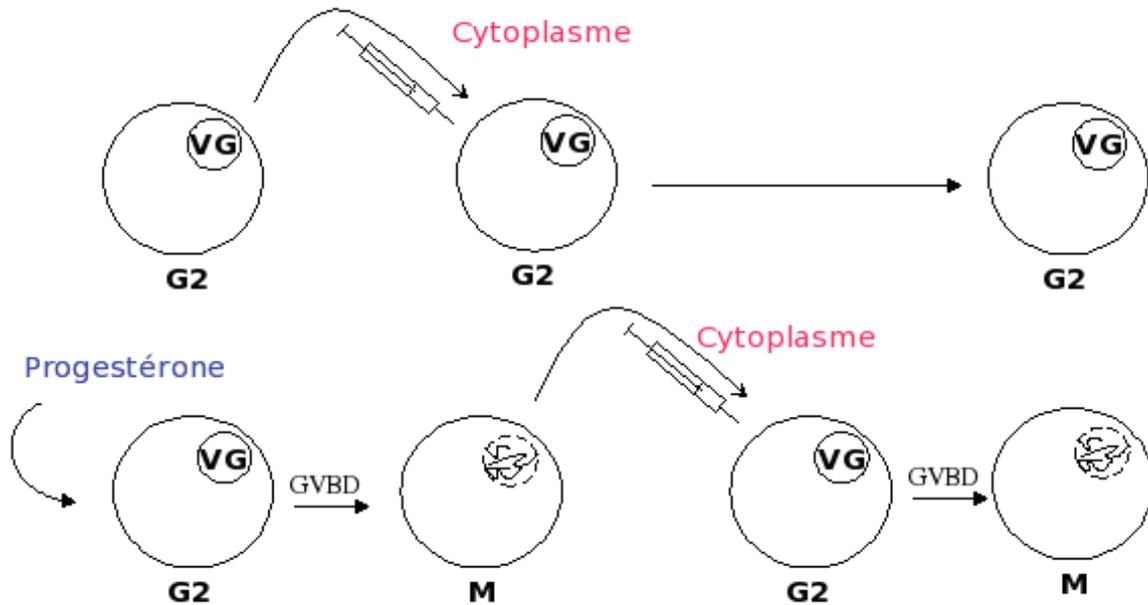


FIG. 1.5 – Principe des expériences menées par Masui et Markert. (Modifié d'après "Le cycle cellulaire", Galas, De boeck édition. 2008)

Dans les extraits cytoplasmiques de Xénope, les concentrations de cycline B évolue de manière cyclique (Murray et Kirschner, 1989 ; Murray *et al.*, 1989). Si la synthèse protéique est inhibée, l'apparition des cyclines est supprimée. Par ailleurs, après traitement à la RNase, l'activité MPF réapparaît de façon cyclique après injection d'un ARNm de cycline B d'oursin. Les cyclines B possèdent trois domaines essentiels :

- une "cyclin box", région consensus d'une centaine d'acides aminés qui intervient dans la liaison aux Cdk ;
- la "destruction box", séquence composée de neuf résidus située en région N-terminale, responsable de la dégradation de la protéine lors de la transition métaphase-anaphase ;
- un signal de rétention cytoplasmique, situé entre les "cyclin" et "destruction box", qui permet le maintien de la cycline dans le compartiment cytoplasmique.

La liaison de la cycline B génère un changement de conformation qui démasque le site catalytique de Cdk1 et favorise son activité sérine / thréonine kinase (De Bondt *et al.*, 1993). Dans les ovocytes arrêtés en prophase I, environ 10 % des Cdk1 sont associées avec le stock maternel de cyclines B (essentiellement les cyclines B2 et B5). Cdk1 est phosphorylée sur le résidu thréonine 161, mais elle est maintenue inactive par phosphorylation sur les résidus tyrosine 15 et thréonine 14. 90% du stock de Cdk1 est sous forme libre, présentant une activité kinasique faible (Lorca *et al.*, 1992). Son activité dépend de sa liaison avec la cycline B ainsi que des modifications de son état de phosphorylation (Solomon, 1993 ;

Solomon *et al.*, 1990). Toutes les cyclines s'associent avec les Cdks par l'intermédiaire de la région "cyclin box" (Kobayashi *et al.*, 1992). La micro-injection de ce domaine de liaison est suffisante pour induire la reprise méiotique des ovocytes de Xénope (Lees et Harlow, 1993). La partie N-terminale de la "cyclin box" stabilise le complexe Cdk/Cyc (Endicott *et al.*, 1999).

Si l'activation du MPF déclenche l'entrée en phase M, il est admis que 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 MPF est concomitante avec la sortie de première division de méiose (Kobayashi *et al.*, 1991 ; Ohsumi *et al.*, 1994). L'activité kinasique résiduelle du MPF est essentielle à l'absence d'interphase et de réplication de l'ADN entre les deux divisions (Furuno *et al.*, 1994 ; Iwabuchi *et al.*, 2000 ; Picard *et al.*, 1996). Lors du blocage en métaphase II, l'activité MPF reste élevée et ne disparaît qu'au moment de la fécondation, permettant la sortie de méiose II et la formation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus femelle (Lorca *et al.*, 1992).

Différentes protéines kinases et protéines phosphatases, ou de protéines néosynthétisées, sont impliquées dans la régulation du MPF lors de la reprise méiotique. Dès sa synthèse, la cycline B interagit avec Cdk1 pour former un complexe : le pré-MPF ; ce dernier est maintenu inactif par la phosphorylation de Cdk1 sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 (Solomon *et al.*, 1990 ; Solomon *et al.*, 1992). La phosphorylation de ces deux résidus, situés au coeur du domaine de fixation à l'ATP, inhiberait la liaison de l'ATP (Gould et Nurse, 1989).

Les principaux régulateurs de MPF sont Myt1 et Cdc25 (voir figure 1.6). Myt1 est une kinase de la famille Wee1. Son rôle consiste à inhiber par phosphorylation la protéine Cdk1 (Cdc2). La phosphatase PP2A tient également un rôle de régulateur qui inhibe la production de MPF au travers de son interaction avec Cdc25 (Karaiskou *et al.*, 1999). Son activation résulte de la déphosphorylation de Cdc2 par la phosphatase Cdc25, couplée à l'inhibition de Myt1. Il a été démontré l'importance de la présence de Plx1, lors de la phase de transition G2/M, pour obtenir une activation et une auto-amplification du MPF (Karaiskou *et al.*, 2004).

Une autre famille de kinases jouent un rôle lors de la transition G2/M, les MAPK/ERK que nous verrons plus en détail au chapitre suivant.

1.2.3.3 La reprise de méiose dépend de la synthèse protéique

Synthèse protéique globale

Afin de montrer l'importance du rôle de la synthèse protéique dans la reprise méiotique, des expériences ont été menées en présence de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique. Les expériences menées par John Gerhart en 1984 indiquent que le MPF injecté dans l'ovocyte ne nécessite pas de synthèse pour activer *de novo* le stock de pré-MPF, *via* la boucle d'auto-amplification (Gerhart *et al.*, 1984). Celles-ci est définie comme la capacité que montre le MPF à ne pas se diluer et conserver l'ensemble des propriétés à induire la maturation méiotique lorsque l'on transfère en série une partie du cytoplasme (contenant du MPF) d'un ovocyte mature pour l'injecter dans un ovocyte immature.

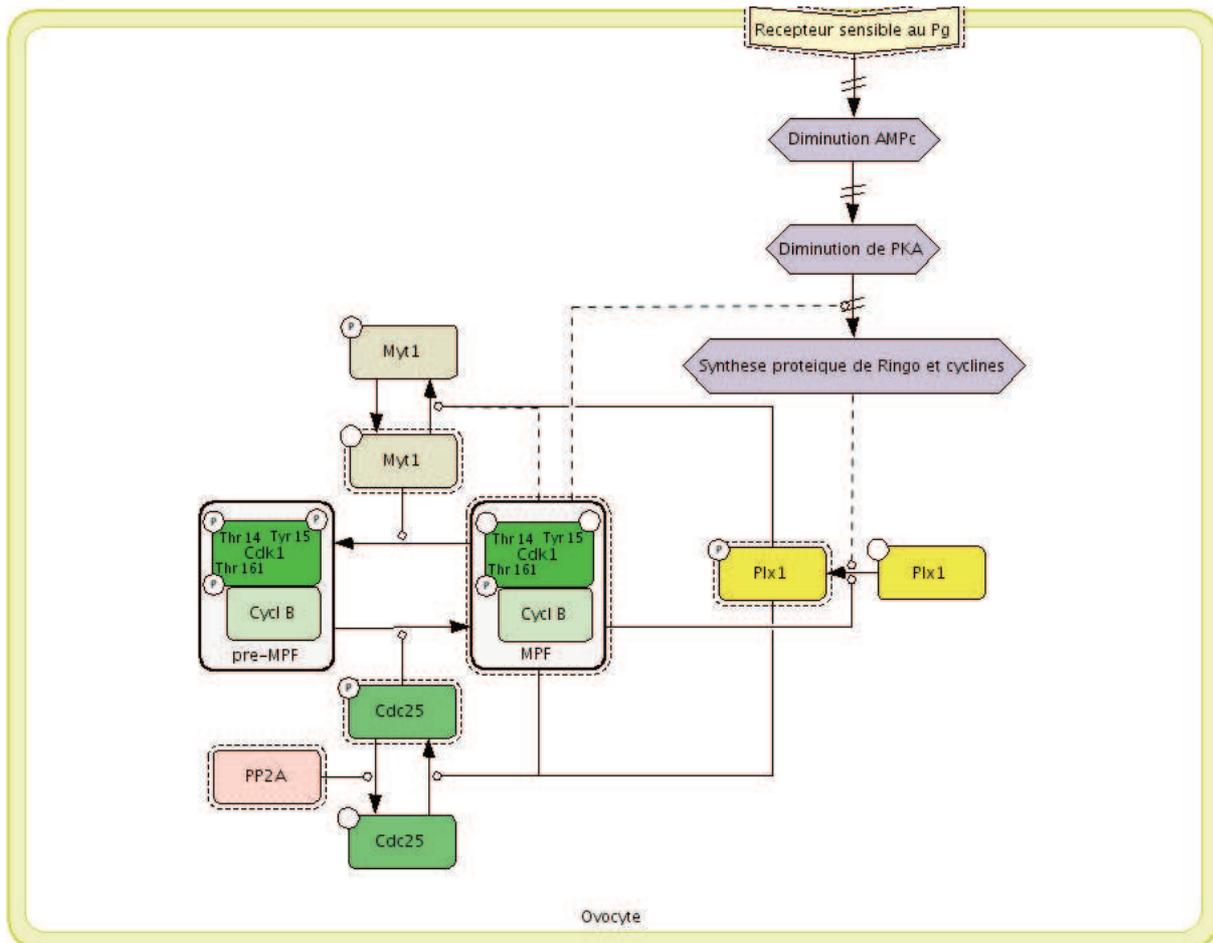


FIG. 1.6 – Principaux régulateurs de l'activation du complexe MPF. Les flèches en pointillés indiquent une interaction indirecte. MPF interagit également avec Cdc25 et influe indirectement sur la synthèse protéique constituant de la sorte une boucle d'auto-amplification. (CellDesigner)

Le traitement d'ovocytes en cours de maturation par du cycloheximide, pendant une durée de 1 heure, après la stimulation par progestérone indique que la GVBD se déroule avec un délai par rapport aux ovocytes non-traités. Lorsque l'inhibition est initiée juste avant la GVBD, une anomalie du cytosol est constatée, cela indique l'importance de la synthèse protéique pour la production de MPF (Brachet *et al.*, 1975). D'ailleurs l'induction de la maturation ovocytaire par la progestérone est totalement inhibée par la présence continue de cycloheximide (Brachet *et al.*, 1975b).

Synthèse des cyclines B

Cinq types de cyclines B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Brandeis *et al.*, 1998), et deux sous-types de cyclines, les cyclines B1 et B2, sont majoritairement présentes dans les ovocytes et les embryons de Xénope. La cycline B2 est présente dès le stade I, et sa quantité augmente fortement à partir du stade IV (Furuno *et al.*, 2003). Les cyclines B2 et B5 sont stockées dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF. En présence de progestérone, les cyclines B1 et B4 sont synthétisées *de novo* juste avant la GVBD (Hochegger *et al.*, 2001 ; Kobayashi *et al.*, 1991 ; Rime *et al.*, 1994). 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 de la cycline B1 contiendraient dans leur UTR3' un à plusieurs éléments répresseurs de la polyadénylation (Barkoff *et al.*, 2000). La synthèse des cyclines B1 et B4 se fait en deux phases : la première juste avant la GVBD et la seconde, plus importante, en métaphase II (Hochegger *et al.*, 2001 ; Kobayashi *et al.*, 1991). Bien que les ovocytes contiennent des ARNm codant la cycline B3, ceux-ci ne semblent pas traduits et la cycline B3 ne jouerait aucun rôle dans la reprise méiotique (Hochegger *et al.*, 2001).

La phosphorylation de la séquence d'export nucléaire située dans la partie N-terminale de la cycline B est nécessaire, d'une part, pour l'accumulation de la cycline B dans la vésicule germinative et d'autre part, pour l'activité du complexe Cdk1/Cyc B1 (Hagting *et al.*, 1999 ; Pines et Hunter, 1994 ; Yang *et al.*, 1998), ainsi que du complexe Cdk1/Cyc B2 (Yoshitome *et al.*, 1998). Le MPF est responsable de la phosphorylation de la cycline B intracomplexe chez l'Etoile de mer (Borgne *et al.*, 1999). Dans l'ovocyte de Xénope, la phosphorylation de la cycline B se produit au même moment que l'activation du MPF (Minshull *et al.*, 1991). *In vivo*, Cdk1 phosphoryle la cycline B2 sur son résidu sérine 90 (Gautier *et al.*, 1990 ; Izumi et Maller, 1991). Une forme particulière de la Calcium/calmoduline dépendante protéine kinase II (CaMKII), appelée Cyk, a été identifiée dans les ovocytes. Cette kinase, impliquée dans la phosphorylation de la cycline B2, serait activée avant le MPF et phosphorylerait, *in vitro*, la cycline B2 sur les résidus thréonine 41 et sérine 53. Cependant, une mutation inhibitrice ou activatrice de ces sites de phosphorylation ne révèle aucune implication de la phosphorylation dans la reprise méiotique ou la dégradation de la cycline (Derua *et al.*, 1997 ; Stevens *et al.*, 1999).

La quantité de cycline B stockée dans les ovocytes immatures, sous forme de pré-MPF, est suffisante pour permettre la GVBD, indépendamment de la synthèse de nouvelles cyclines. La micro-injection d'antisens empêchant la synthèse des cyclines B n'inhibe pas l'activation du MPF et la GVBD induites par la progestérone (Hochegger *et al.*, 2001 ;

Minshull *et al.*, 1991). Cependant, dans les ovocytes de Xénope, la micro-injection de cycline B, sous forme d'ARNm ou de protéines, est suffisante pour induire la GVBD en l'absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique (Huchon *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1991; Swenson *et al.*, 1986). Ainsi, en réponse à la progestérone, la formation de nouveau complexe MPF actif par association de Cdk1 monomérique et de cycline nouvellement formée pourrait jouer un rôle important dans le recrutement du stock de pré-MPF et dans l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF.

La quantité de cyclines B et l'activité H1 kinase diminuent de 50 à 70% entre les deux divisions de méiose (Kobayashi *et al.*, 1991; Ohsumi *et al.*, 1994). Cependant, la dégradation des cyclines B est partiellement masquée par la synthèse de nouvelles cyclines. L'ubiquitination puis la dégradation des cyclines B par le protéasome conditionnent la sortie de phase M (Zachariae, 2004). L'ubiquitylation est réalisée par l'interaction d'une ubiquitine-ligase avec une séquence consensus, la "destruction box". La délétion des 90 acides aminés N-terminaux ou des mutations de la "destruction box" empêche la dégradation de la cycline. La micro-injection d'une forme non dégradable de cycline B dans les ovocytes de Xénope déclenche la reprise de la méiose mais les ovocytes restent bloqués en métaphase I (Huchon *et al.*, 1993). La présence de formes non dégradables de la cycline B empêche la sortie en phase M dans des extraits d'oeufs non fécondés de Xénope (Murray et Kirschner, 1989; Murray *et al.*, 1989).

Autres protéines synthétisées

D'autres protéines sont synthétisées pendant la transition G2/M, des stocks d'ARNm non-polyadénylés sont présents en attente de la stimulation hormonale. Parmi ces protéines on peut citer la protéine Ringo, la paxiciline ou encore l'oncoprotéine Mos, dont la fonction sera détaillée au chapitre suivant.

Chapitre 2

La voie de signalisation Mos-MEK-MAPK dans les ovocytes de Xénope

2.1 Généralités

Parmi les nombreux facteurs de transduction mobilisés par les signaux mitogéniques, la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) kinase kinase - MAPKK / MEK - MAPK / ERK (Extracellular Regulated Kinase) joue un rôle crucial dans de nombreux aspects de la vie cellulaire, tels que le cycle cellulaire, la différenciation, la survie ou l'angiogenèse. Cette voie est considérée comme une cible de choix dans les stratégies anticancéreuses (Bodart *et al.*, 2002 ; Kohno et Pouyssegur, 2006).

Les mécanismes précoces de l'activation des MAPKs sont le résultat de l'activation des voies de transduction Ras-dépendantes et indépendantes initiées par les récepteurs tyrosine kinase. La cascade MAPK/ERK en elle-même est composée de plusieurs niveaux où chaque kinase activée phosphoryle une kinase en aval. Les principaux membres de cette cascade dans les cellules somatiques incluent Ras, Raf, MEK (-1 et -2) et ERK (-1 et -2). Ces membres sont régulés positivement ou négativement par d'autres protéines : les protéines phosphatases et les protéines chaperonnes régulent par exemple de manière spatio-temporelle cette voie (Ebisuya *et al.*, 2005 ; O'Neill et Kolch, 2004).

La description des protéines qui composent cette voie est proposée ci-après, ainsi que les fonctions exercées par cette voie lors de la méiose.

2.2 Les MAPKKK/MEKK : Raf et Mos

2.2.1 Raf

La protéine Raf a été initialement identifiée comme une oncoprotéine rétrovirale à activité sérine / thréonine kinase (Moelling *et al.*, 1984 ; Rapp *et al.*, 1983). Elle présente trois régions conservées dans les différentes isoformes. La région CR1, localisée en position N-terminale, contient le domaine de liaison à p21Ras lorsque celui-ci est associée au GTP.

La liaison de p21Ras à Raf permet le recrutement de Raf à la membrane et son activation (Morrison et Cutler, 1997 ; Nassar *et al.*, 1995 ; Vojtek *et al.*, 1993). Egalement localisée en N-terminale, la région CR2 est un domaine riche en sérines et thréonines phosphorylables et responsables d'interactions protéiques affectant la localisation et l'activation de Raf (Guan *et al.*, 2000 ; Morrison et Cutler, 1997 ; Morrison *et al.*, 1993 ; Yao *et al.*, 1995 ; Zhang et Guan, 2000 ; Zimmermann et Moelling, 1999). Le domaine CR3, localisé dans la région C-terminale, contient le domaine d'activité kinasique (Heidecker *et al.*, 1990).

Au cours de la reprise méiotique, Raf-1 est phosphorylée et activée dans les ovocytes de Xénope par Ras (Fabian *et al.*, 1993 ; Muslin *et al.*, 1993). La micro-injection d'une protéine Raf oncogénique entraîne la phosphorylation de Xp42Mpk1 (une MAPK appelée également ERK2) et la GVBD (Muslin *et al.*, 1993) alors que des dominants négatifs de Raf empêchent l'activation de Xp42Mpk1 lors d'une stimulation par la progestérone ou par la microinjection d'une forme oncogénique de p21Ras (Fabian *et al.*, 1993 ; Muslin *et al.*, 1993). La micro-injection d'une protéine Raf constitutivement active stimule l'activation de la voie MAPK malgré l'inhibition de la synthèse de Mos par des oligonucléotides phosphodiester antisens (Fabian *et al.*, 1993). Ces observations suggèrent que Raf est nécessaire à l'activation de la voie MAPK et qu'elle agit en aval de Mos. Cependant, d'autres travaux sont en contradiction avec ces résultats. Dans des extraits acellulaires, l'activation de la voie MAPK par une protéine Mos purifiée n'est pas bloquée par l'ajout d'un dominant négatif de Raf (Shibuya *et al.*, 1996). L'activation de la voie Xp42Mpk1 stimulée par la progestérone ou l'insuline semble dépendre uniquement de l'accumulation de Mos. L'inactivation de la voie Mos- Xp42Mpk1 retarde la GVBD mais n'inhibe pas la reprise méiotique, par contre, la phosphorylation complète de Raf requiert l'activation de MEK1- Xp42Mpk1. Des travaux plus récents ont souligné le rôle crucial de la voie PI3 kinase dans les mécanismes par lesquels les voies p21Ras déclenchent la GVBD, minimisant tout rôle physiologique de Raf dans la reprise méiotique (Gaffre *et al.*, 2006), même lorsque cette dernière est activée de manière Ras-dépendante *via* l'insuline (Baert *et al.*, 2003). La reprise de la méiose est déclenchée par l'activation d'un récepteur membranaire tyrosine kinase à l'IGF1 qui reconnaît IGF1 et l'insuline (Hainaut *et al.*, 1991 ; Janicot *et al.*, 1991 ; Zhu *et al.*, 1998).

2.2.2 Mos

Le proto-oncogène Mos est l'homologue cellulaire de l'oncogène v-mos du virus responsable du sarcome murin de Moloney (Oskarsson *et al.*, 1980). Protéine à activité sérine / thréonine kinase, Mos active une MAPK kinase, laquelle active MAPK/Xp42Mpk1 (Nebreda et Hunt, 1993 ; Posada *et al.*, 1993 ; Sagata *et al.*, 1988). La protéine Mos est absente dans les ovocytes arrêtés en prophase I, et n'est détectée que durant la reprise méiotique de l'ovocyte (Freeman *et al.*, 1989 ; Sagata *et al.*, 1988 ; Sagata *et al.*, 1989b). Mos est stockée dans les ovocytes matures, où elle est rapidement dégradée après la fécondation (Sagata *et al.*, 1988 ; Watanabe *et al.*, 1991 ; Watanabe *et al.*, 1989).

Au cours de la reprise méiotique, l'accumulation de Mos résulte, d'une part, de sa synthèse et d'autre part, de sa stabilisation. Dans l'ovocyte en prophase I, l'absence de queue poly(A) sur les ARNm de Mos empêche leur traduction. Après stimulation par

la progestérone, l'ARNm codant Mos est l'un des premiers à être polyadénylé et traduit (Gebauer et Richter, 1997; Sheets *et al.*, 1995). La polyadénylation de ce dernier nécessite la phosphorylation précoce de la CPEB sur la sérine 174 par Aurora A / Eg2 (de Moor et Richter, 1997; Hake et Richter, 1994; Paris *et al.*, 1991) (figure 2.1). 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.*, 2000). Dans les ovocytes immatures, un faible niveau de CPEB phosphorylée est détecté. Elle devient hautement phosphorylée précocément durant la reprise méiotique, simultanément à la polyadénylation de l'ARNm Mos. La micro-injection d'une protéine CPEB mutante pour ce résidu, empêchant sa phosphorylation, agit comme un dominant négatif qui bloque la synthèse de Mos. A 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.*, 2000).

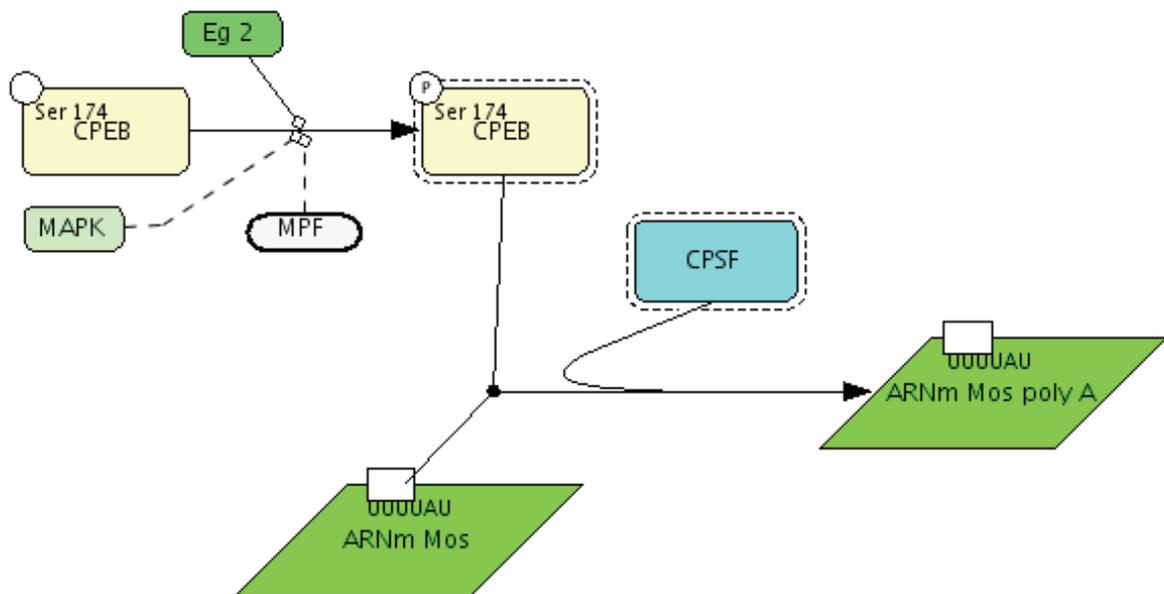


FIG. 2.1 – Polyadénylation de l'ARN de Mos. MAPK et MPF interviennent indirectement sur le processus. CPSF est recrutée à la suite de l'association de CPEB actif et l'ARNm au niveau du site de liaison UUUUUAU. CPSF se lie au domaine AAUAAA de l'ARNm de Mos.

La polyadénylation séquentielle des ARNm est régulée par le nombre de CPE présent au niveau 3'UTR des ARNm. L'ARNm de Mos, qui est polyadénylé précocément, présente

un seul CPE alors que les ARNm traduits tardivement, comme ceux codant l'histone B4 ou les cyclines B1 et A1, ont deux CPE. Les travaux de de Moor et Richter (de Moor et Richter, 1997) ont montré que, si un des deux CPE de la cycline B1 est retiré, la polyadénylation de l'ARNm devient indépendante de Mos et de Cdk1, et l'ARNm est polyadénylé précocément. 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.*, 2000). Une telle configuration de facteurs empêcherait l'interaction précoce de la CPEB avec le CPSF durant la reprise méiotique. La destruction partielle de la CPEB, induite par Cdk1, libèrerait une de ses molécules qui interagit avec le CPSF et permettrait la polyadénylation et la traduction des ARNm (Hake et Richter, 1994 ; Katsu *et al.*, 1999 ; Paris *et al.*, 1991).

Des travaux récents suggèrent que l'activation traductionnelle initiale de Mos implique un nouvel élément régulateur, le PRE (Polyadenylation Response Element) localisé dans le 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 est la cible des MAPK alors que la polyadénylation cytoplasmique dirigée par le CPE est stimulée par Cdk1. Ces résultats expliqueraient l'accumulation biphasique de Mos observée lors de la stimulation de la progestérone (Gotoh *et al.*, 1995). Cette dernière stimule très précocément et temporairement l'activation de la traduction de Mos par le PRE *via* la voie des MAPK indépendamment de la CPEB et de Aurora A/Eg2. Cependant, avant la GVBD, la régulation de la CPEB par Aurora A/Eg2 ainsi que l'activation de Cdk1 et la traduction des ARNm dépendantes du CPE sont nécessaires pour l'accumulation de Mos. Lors de l'absence de traduction des ARNm de Mos dépendant de la CPEB, la synthèse de Mos stimulée par le PRE n'est pas suffisante pour atteindre le niveau nécessaire pour déclencher la reprise méiotique. Ceci pourrait être dû à la nature transitoire de la polyadénylation induite par le PRE. Les séquences PRE et CPE pourraient fonctionner séquentiellement pour initier et maintenir l'accumulation de la protéine Mos *in vivo* en réponse à la progestérone (Charlesworth *et al.*, 2002). La protéine Musashi qui se lie aux ARN joue un rôle dans la régulation temporelle des traductions des ARNm lors de la progression de la reprise méiotique (Charlesworth *et al.*, 2006). La protéine MAPK interagit de manière précoce avec la protéine XGef pour activer CPEB (Keady *et al.*, 2007).

La protéine Mos synthétisée avant la GVBD présente un niveau partiel de phosphorylation associé à une certaine instabilité (Sagata *et al.*, 1989b ; Watanabe *et al.*, 1989) (figure 2.2). Cependant, cet état paraît suffisant pour stimuler la cascade MAPK et la GVBD (Freeman *et al.*, 1989 ; Sagata *et al.*, 1988 ; Sagata *et al.*, 1989b). Pendant et après la GVBD, la phosphorylation de Mos augmente progressivement, Mos est totalement phosphorylée et métaboliquement stable dans les ovocytes matures (Watanabe *et al.*, 1989). Quatre résidus de Mos, la sérine 3 (Freeman *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1992), la sérine 16 (Bai *et al.*, 1991 ; Pham *et al.*, 1999) , la sérine 25 (Yang *et al.*, 1996) et la sérine 105 (Yue et Ferrell, 2006), ont été identifiés comme des sites majeurs de phosphorylation.

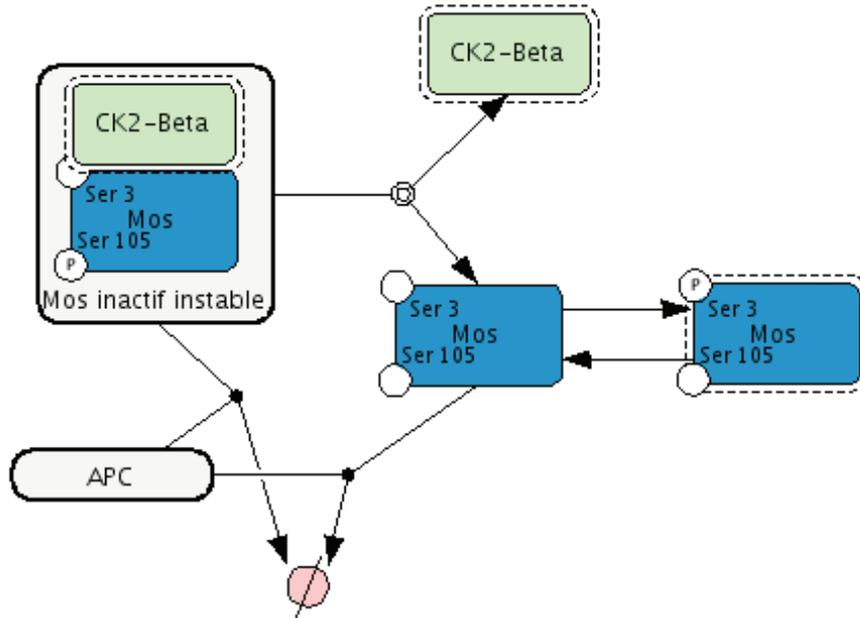


FIG. 2.2 – États de phosphorylation de Mos. La protéine Mos non active et non stable est inhibée par la phosphorylation de son résidu sérine 105, situé dans un domaine de type hélice α qui permet la liaison entre la protéine Mos et CK2 β (un régulateur négatif de la synthèse de Mos). Lorsque la protéine n'est pas phosphorylée sur son résidu sérine 3, Mos indique deux états (non actif non stable et actif non-stable). Ces derniers sont pris en charge par les processus de dégradation protéasomique, probablement au moyen de leur association avec le complexe "Anaphase Promoting Complex" (APC). La phosphorylation du résidu sérine 3 augmente l'activité catalytique de Mos envers MEK.

La phosphorylation de la sérine 3 facilite l'association de Mos avec MEK (Chen et Cooper, 1995). Ce résidu est une cible d'auto-phosphorylation (Nishizawa *et al.*, 1992) bien que sa phosphorylation soit toujours observée même si l'activité kinase de Mos est supprimée par mutation (Freeman *et al.*, 1992). *In vitro*, les MAPK phosphorylent également le résidu sérine 3 (Matten *et al.*, 1996). Au moment de la GVBD, la phosphorylation de la sérine 3 augmente la stabilité de Mos en empêchant la reconnaissance par une ubiquitine ligase du résidu proline 2 adjacent (Freeman *et al.*, 1992; Nishizawa *et al.*, 1993; Nishizawa *et al.*, 1992). La proline 2 n'interviendrait pas directement dans la stabilisation de Mos mais serait responsable d'une régulation négative de la phosphorylation de la sérine 3, qui inhibe la dégradation de la protéine (Sheng *et al.*, 2002).

Les MAPK (Matten *et al.*, 1996), ainsi que le MPF (Liu *et al.*, 1990), sont également capables, *in vitro*, de phosphoryler le résidu sérine 16. Dans les cellules COS transfectées exprimant Mos, la phosphorylation de la sérine 16 de Mos inhibe sa dégradation (Pham

et al., 1999).

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 Mos (Yang *et al.*, 1996). Pourtant, la phosphorylation de ce site pourrait inhiber l'activation de Mos induite par la phosphorylation de la sérine 3 (Yang *et al.*, 1998 ; Yue et Ferrell, 2006).

L'inhibition des mécanismes de dégradation de Mos facilite son accumulation. La micro-injection d'une protéine Cdk1 purifiée dont l'activité kinase est déficiente bloque l'accumulation de Mos sans affecter son taux de synthèse. Ceci suggère que la dégradation de Mos est régulée négativement par une voie dépendante du MPF (Nebreda *et al.*, 1995). *In vitro*, Cdk1 phosphoryle et stabilise Mos (Castro *et al.*, 2001).

Plusieurs travaux ont mis en évidence que Mos active la voie des MAPK kinases lors de la reprise méiotique stimulée par la progestérone. La microinjection d'oligonucléotides antisens de Mos bloque la synthèse de Mos, l'activation de Xp42Mpk1 et l'activation de la kinase Rsk (Barrett *et al.*, 1990 ; Dupré *et al.*, 2002 ; Sagata *et al.*, 1989b ; Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005). La micro-injection de Mos déclenche la reprise méiotique. Cependant, Mos ne semble pas essentielle à la GVBD, l'inhibition de sa synthèse par micro-injection d'oligonucléotides antisens de Mos de type Morpholine ne bloque pas la GVBD induite par la progestérone (Dupré *et al.*, 2002 ; Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005).

2.2.3 MAPKK/MEK

Les MAP kinase kinases (MAPKK) sont les kinases activatrices des MAPK. Chez l'espèce *Xenopus laevis*, Mpk1 est activée par la MAPKK MEK1 qui la phosphoryle sur les deux résidus Thr 183 et Tyr 185 (Kosako *et al.*, 1993). Les kinases ERK sont les principaux substrats identifiés des MEK (Cowley *et al.*, 1994 ; Mansour *et al.*, 1994). Mos phosphoryle directement la MAPKK MEK1 *in vivo* (Posada *et al.*, 1993). L'injection d'anticorps dont les MEK1 sont les cibles empêche la reprise méiotique initiée par injection de Mos (Kosako *et al.*, 1994). Par ailleurs, dans les ovocytes de Xénope, une boucle de rétro-contrôle a été mise en évidence, impliquant la phosphorylation de JNK par MEK, qui en retour phosphorylerait Raf (Adler *et al.*, 2005).

DéTECTABLE dans les ovocytes dès le stade I, MEK1 augmente en quantité au cours de l'ovogenèse (Furuno *et al.*, 2003).

2.2.4 MAPK/ERK2/Mpk1

Mpk1 est la première MAPK découverte dans les ovocytes de Xénope pour sa capacité à phosphoryler la protéine "microtubule-associated protein 2" (MAP2) lors de la reprise méiotique (Haccard *et al.*, 1990). Elle est l'homologue de la MPK mammalienne ERK2.

Cette kinase est activée par la phosphorylation par les MEK1 des résidus Thr 183 et Tyr 185. 160 substrats de MAPK ont été recensés dans divers modèles cellulaires (Yoon et Seger, 2006). Les protéines phosphorylées appartiennent à diverses catégories selon leur rôle physiologique : facteurs de transcription, protéines des cytosquelette, kinases et phosphatases, protéines apoptotiques et protéases, protéines de signalisation.

2.2.5 Rsk

La kinase Rsk (Ribosomal S6 subunit protein kinase) est un substrat de MAPK dont le rôle principal est d'être un relais de la voie MEK-ERK *in ovo* (Gross *et al.*, 2000). Elle 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). Elle est phosphorylée et activée pendant la reprise méiotique puis déphosphorylée et désactivée après la fécondation (Erikson et Maller, 1989). Deux isoformes, Xp90Rsk1 et Xp90Rsk2, sont exprimées, toutes deux substrats de phosphorylation de Xp42Mpk1 (Bhatt et Ferrell, 1999).

2.3 Mécanismes de régulation de la voie Mos - MEK - MAPK

2.3.1 MAPK phosphatases

Les MAPK sont inactivées par déphosphorylation de leurs résidus thréonines et/ou tyrosines à l'intérieur de la boucle d'activation par les MAPK phosphatases (MKP). Les MKP sont divisées en trois groupes selon leur spécificité à déphosphoryler le résidu tyrosine, le résidu tyrosine ou thréonine, les résidus thréonine et tyrosine. Ces dernières sont également appelées phosphatases à double spécificité (DUSP ou DSP). Une dizaine de MKP a été identifiée (Theodosiou et Ashworth, 2002). Les mécanismes de régulation des MKP dans les ovocytes demeurent peu connus. Dans les ovocytes de souris, une activité de type MAPK phosphatase est régulée négativement par l'accumulation de Mos (Verlhac *et al.*, 2000).

Seules les phosphatases Mkp1 et Mkp3 ont été étudiées dans l'ovocyte de Xénope. Mkp1 (DUSP1/CL100) déphosphoryle préférentiellement JNK et MAPK plutôt que ERK1 et ERK2 (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. *In vitro*, XCL100 recombinante déphosphoryle les résidus thréonines et tyrosines de Mpk1 (Lewis *et al.*, 1995). La micro-injection de Mkp1 dans les ovocytes de Xénope inhibe partiellement la synthèse de Mos qui pourrait être sous rétro-contrôle positif de Mpk1. Ce rétro-contrôle pourrait agir sur la polyadénylation puisque la micro-injection de Mkp3 bloque la polyadénylation de l'ARNm de Mos induite par micro-injection d'une MEK constitutivement active (Howard *et al.*, 1999). Mkp3 (DUSP6/PYST1/rVH6) est spécifique de ERK1 et ERK2 (Groom *et al.*, 1996; Muda *et al.*, 1996), mais son identification n'a pas été rapportée dans l'ovocyte de Xénope.

2.3.2 Motif de régulation de rétro-contrôle positif au sein de la voie Mos - MEK - MAPK

La voie Mos - MEK - MAPK a pour rôle de transmettre et amplifier un signal extérieur à la cellule vers des cibles cytosoliques ou nucléaires. La figure 2.3 représente la structure en cascade de cette voie.

Le stimulus de la voie n'interagit pas avec toutes les kinases mais uniquement avec Mos. Ensuite, cette protéine interagit avec la kinase en aval (MEK) pour l'activer. La procédure est identique entre MEK et ERK. La dynamique de production de chaque kinase dépendra des cinétiques de phosphorylation opposées aux cinétiques de déphosphorylations (pour une analyse mathématique voir Chapitre 5, Annexe A et B).

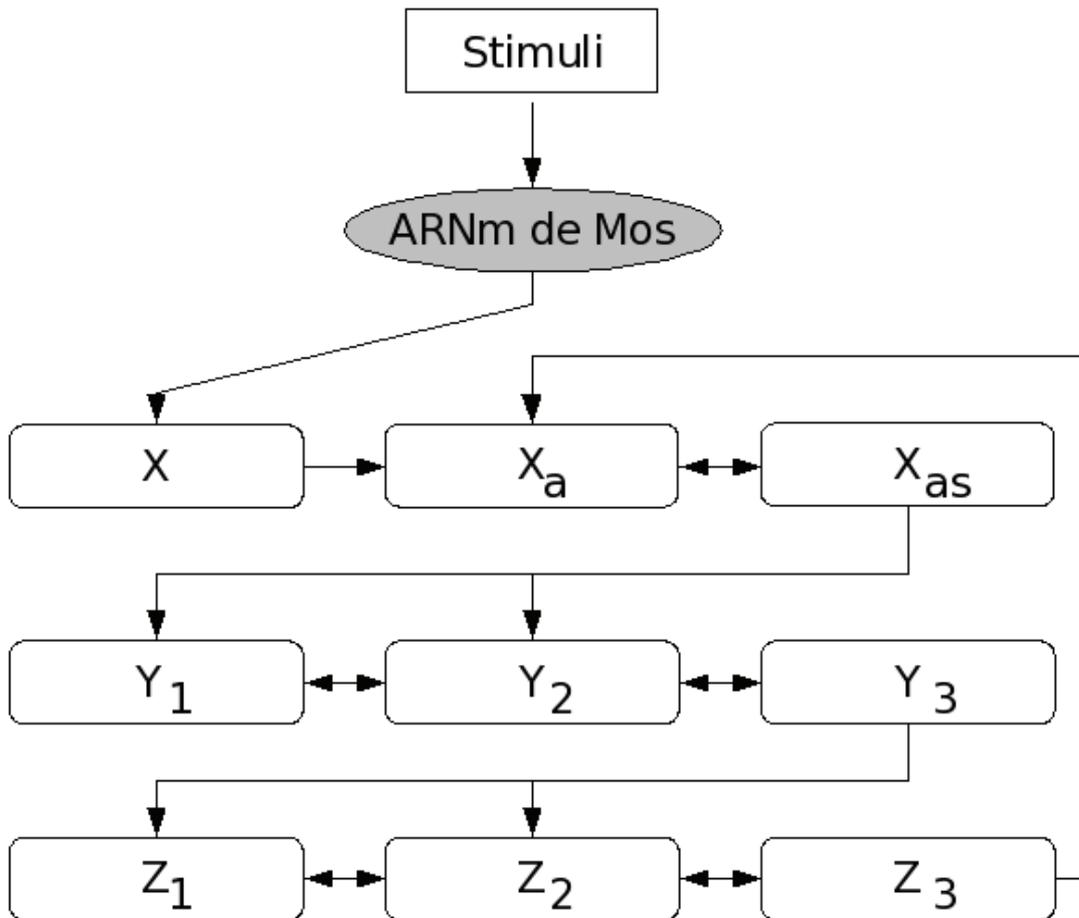


FIG. 2.3 – Représentation schématique de la voie Mos-MEK-MAPK. X = Mos inactif non stable, X_a = Mos actif non stable, X_{as} = Mos actif et stable, Y_1 = la forme non phosphorylée de MEK, Y_2 = forme mono-phosphorylée de MEK, Y_3 = forme bi-phosphorylée de MEK, Z_1 = la forme non phosphorylée de MAPK, Z_2 = forme mono-phosphorylée de MAPK, Z_3 = forme bi-phosphorylée de MAPK.

La structure en cascade des divers composants de la voie Mos - MEK - MAPK influence la dynamique de la réponse de cette cascade à un stimulus. L'observation de la variation de concentration des MAPK dans les ovocytes suit un profil sigmoïdal, équivalent à celui que l'on observe pour une enzyme coopérative avec un coefficient de Hill proche de 5 (Huang et Ferrell, 1996). Ce coefficient sera défini de manière plus détaillée dans la partie

II, il détermine le degré de non-linéarité de la courbe expérimentale obtenue. Les enzymes Mos, MEK et MAPK n'interagissent pas de manière coopérative. Aussi le caractère non-linéaire du profil de concentration en MAPK est décrit par Huang et Ferrell (1996) comme étant ultrasensible. Goldbeter et Koshland ont proposé ce terme pour décrire une courbe de réponse à un stimuli qui est plus abrupte que la courbe hyperbolique produite pour la cinétique d'une enzyme de type Michaelis-Menten (Goldbeter et Koshland, 1981). Au fur et à mesure de l'augmentation du degré d'ultrasensibilité, la variation de concentration des MAPK ressemble de plus en plus à une marche. Ainsi, lorsque le stimulus est inférieur à la valeur seuil, la réponse est faible, et inversement. Ce type de réponse est désigné par un comportement de type "tout ou rien" (figure 2.4). Cette ultrasensibilité proviendrait d'une part du fait que l'activation de MAPK requiert la phosphorylation de deux sites (Ferrell, 1996 ; Ferrell et Bhatt, 1997) et d'autre part à cause de la structure en cascade des activateurs de MAPK (Ferrell, 1997). Il est généralement admis que l'augmentation du nombre de sites de phosphorylation crée une réponse d'autant plus sensible (i.e. 6 sites de phosphorylation pour l'inhibiteur de Cdk Sic1, coefficient de Hill = 6, (Nash *et al.*, 2001)), même si cette idée a été récemment contestée (Thomson and Gunawardena, 2009). La réalité de la régulation de la voie MAPK et donc de sa sensibilité est hautement dépendante non seulement d'interactions biochimiques mais aussi de facteurs mécaniques ou électrophysiologiques. Les 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 ;
- l'existence de boucles rapide (autoamplification du MPF) et lente (activation de la cascade MAPK) au sein du réseau moléculaire qui contrôle la reprise méiotique lui conférerait la particularité de la réponse cellulaire observée de type "tout ou rien" (Brandman *et al.*, 2005).

Le comportement ultrasensible de la cascade Mos-MEK-MAPK met en correspondance à chaque valeur du stimuli une et une seule valeur de concentration de MAPK. Cependant, l'hypothèse d'observer uniquement deux valeurs de concentrations en MAPK, stable dans la durée, pour une variation graduelle en stimuli a été proposée par Ferrell et Machleder (Ferrell et Machleder, 1998). Leur objectif a été d'analyser la réponse individuelle des ovocytes, incubés dans des concentrations croissantes de progestérone. Ce comportement de la cascade est appelé la bistabilité. Leurs observations suggèrent que les MAPK répondent de manière binaire à la progestérone : les cellules montrent des MAPK actives (>90 %) ou non actives (<10 %) mais aucune ne montre un état intermédiaire de phosphorylation des MAPK. Une réponse graduelle des MAPK est observée lorsque la GVBD est stimulée par l'injection de Mos, en absence de synthèse protéique (Ferrell et Machleder, 1998). La perte de la réponse bistable a été attribuée par ces auteurs à la perte du rétro-contrôle positif exercé par MAPK mais pourrait résulter également de la perte d'un autre motif de régulation au sein de la cascade (boucle de pro-action ou pro-boucle, boucle de rétro-contrôle positif exercée par le MPF).

Une même réponse de type bistable a été observée pour les MAPK/JNK (Bagowski et Ferrell, 2001 ; Ferrell, 2002). Néanmoins, la phosphorylation de JNK étant dépendante

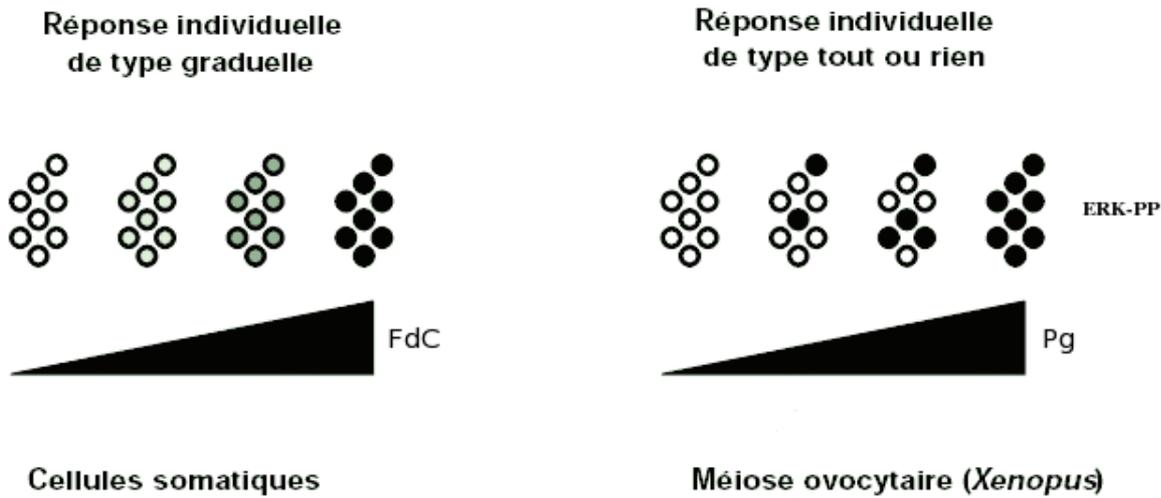


FIG. 2.4 – Variation de la concentration en MAPK/ERK actif (doublement phosphorylé) selon le type cellulaire.

de MEK *via* la boucle de rétro-contrôle identifiée par Adler 2005, la réponse binaire des signaux JNK pourrait trouver sa justification dans la bistabilité de la réponse ERK. Si l’injection de Mos induit une réponse de type “tout ou rien” quant à la GVBD, le caractère “tout ou rien” de la GVBD n’est pas supporté par la bistabilité de la voie MAPK. La GVBD peut en effet se produire en absence d’activité de la voie MAPK (Baert *et al.*, 2003 ; Dupré *et al.*, 2002 ; Gross *et al.*, 2000).

Le modèle de régulation de la cascade Mos-MEK-MAPK par la boucle de rétro-contrôle a été corroboré par Bagowski et Ferrell (Bagowski *et al.*, 2001), qui n’ont observé aucune accumulation de Mos en présence d’un inhibiteur chimique des MEK, l’U0126 (tableau 2.1). Néanmoins, deux groupes différents ont récemment rapporté que l’U0126 n’empêche pas l’accumulation de Mos, qu’elle soit stimulée par la progestérone (Bodart *et al.*, 2005 ; Gross *et al.*, 2000), l’insuline (Baert *et al.*, 2003) ou l’injection de MPF (Sellier *et al.*, 2006) (voir chapitre 10). Ces observations suggèrent que la boucle de rétro-action positive activée par MAPK n’est pas strictement nécessaire pour l’accumulation de Mos.

2.3.3 Interactions entre les voies MAPK et MPF

Haccard et Jessus ont démontré la redondance de la voie Mos - MEK - MAPK et de la voie indépendante des MAPK qui implique la Cdk1 et la cycline B (Haccard et Jessus, 2006). Si la synthèse de Mos est inhibée, le MPF reste fonctionnel et la GVBD se produit. Si la synthèse de cycline B est inhibée, Mos active les MAPK et la GVBD est observée. Finalement, si on inhibe la synthèse de Mos et de la cycline B, la GBVD ne se produit jamais.

2.3. MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA VOIE MOS - MEK - MAPK

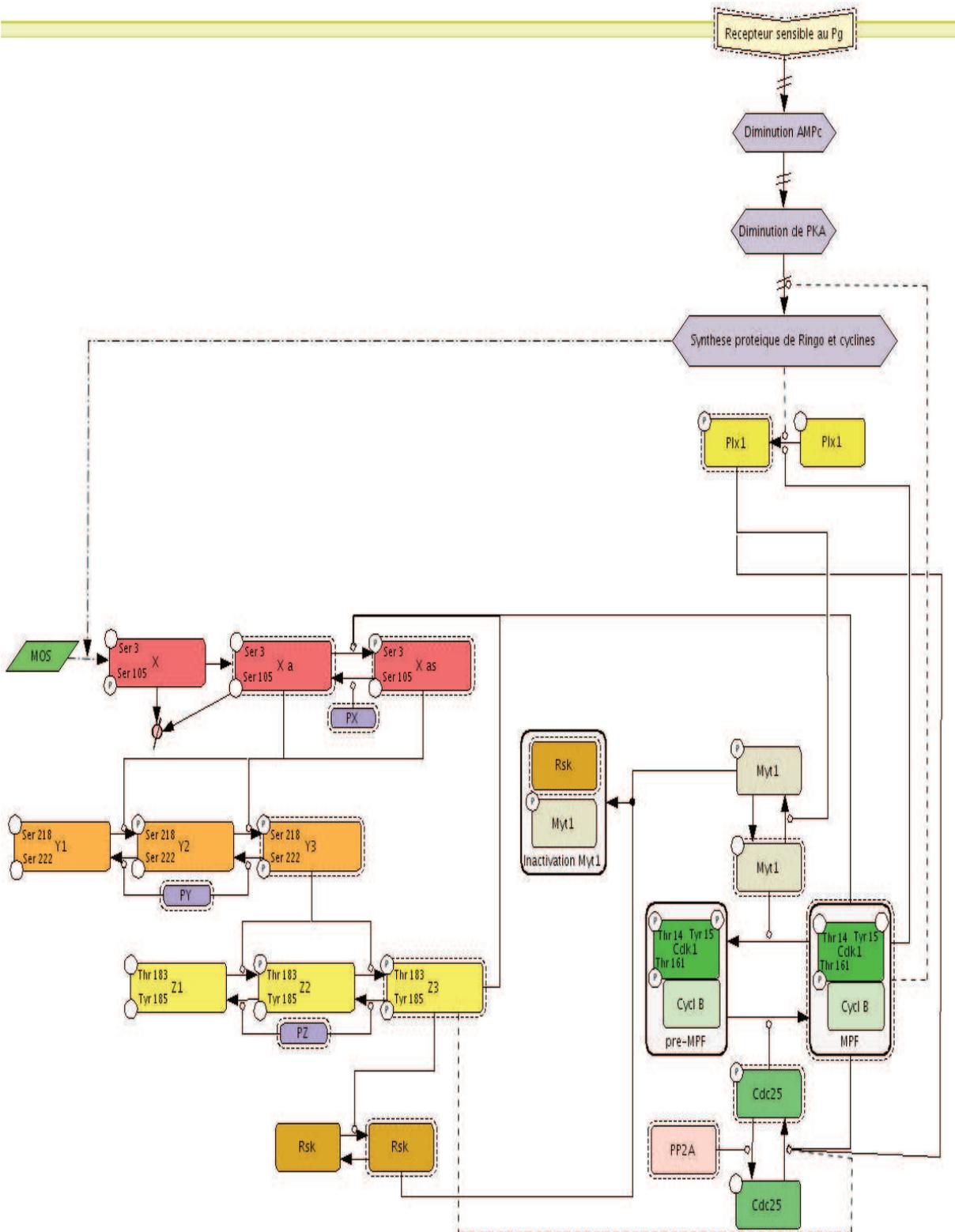


FIG. 2.5 – Schéma de l'interaction entre la cascade Mos-MEK-MAPK et la voie de synthèse de MPF. L'ensemble des interactions et des protéines sont représentée dans le format SBML. X : protéine Mos instable non active ; X_a : protéine Mos active dégradable ; X_{as} : protéine Mos stable et non dégradable. Discussion voir texte.

La figure 2.5 illustre l'ensemble des interactions entre les protéines régulatrices de la voie MAPK et de l'activation du complexe MPF. La complexité du système est d'autant plus élevée que pour certaines transitions d'état plusieurs kinases tiennent un rôle. La stimulation par la progestérone produit d'une part l'activation de MPF *via* Plx1 et d'autre part la traduction de l'ARNm de Mos. MPF est synthétisé en absence de MAPK et s'auto-amplifie avec le renfort de Plx1. Pour obtenir un niveau de MPF élevé et stable, en accord avec les observations réalisées lors du blocage en métaphase II, la stabilisation de Mos sous forme active par MPF est importante. En effet, la cascade Mos-MEK-MAPK est alors activée et MAPK stabilise les protéines Mos actives. De plus, la cascade active produit du MPF actif à partir du stock de pré-MPF *via* l'interaction entre Rsk et Myt1 et entre MAPK et Cdc25.

2.3.3.1 Régulation positive du MPF par MAPK

Les travaux de Masui et Markert indique que l'injection de MPF produit l'activation de la cascade Mos-MEK-MAPK indépendamment de toute stimulation hormonale (Masui et Markert, 1971). Nous avons vu ci-avant que MAPK a un rôle stabilisateur de MPF *via* son substrat Rsk. De ce fait, il est nécessaire de considérer les interactions entre la voie MAPK et la régulation de MPF. L'évolution temporelle des concentrations de MAPK et MPF observable lorsque l'ovocyte du xénope est stimulé par la progestérone, ne permet pas de déterminer quelle est la voie qui précède l'autre et qui la stimule (Ferrell *et al.*, 1991).

Les MAPK participeraient à l'activation du MPF en inhibant Myt1, protéine kinase inhibitrice de Cdk1. Myt1 s'associe *via* son extrémité C-terminale à Rsk. *In vitro*, cette association entraîne la phosphorylation et l'inactivation de Myt1. Dans l'ovocyte, des complexes Myt1 - Rsk (de préférence hyperphosphorylée) ont été immunoprécipités. Ces observations suggèrent que Rsk participe à l'activation du MPF en inhibant Myt1 (Palmer *et al.*, 1998). Par ailleurs, Mos est également capable d'interagir directement avec Myt1 *in vitro*. Mos phosphorylerait Myt1 *in vivo* et faciliterait ainsi la conversion du pré-MPF en MPF, même en absence d'activation de la voie MAPK (Peter *et al.*, 2002). Bien que Mos et Rsk soient toutes deux inhibées en présence de geldanamycine, Myt1 subit un retard de mobilité électrophorétique sur immunoempreinte. Ces résultats suggèrent une régulation complexe de Myt1 par une autre voie que Mos-MEK1-MAPK-Rsk (Fisher *et al.*, 1999).

Les voies MAPK participent également à l'activation du MPF *via* la régulation positive de Cdc25. Le travail mené par Wang montre que durant la transition G2/M, Cdc25 est phosphorylée par p42 MAPK. Cette kinase cible les résidus thréonine 48, thréonine 138 et sérine 205 de Cdc25, accroissant son activité de phosphatase (Wang *et al.*, 2007).

2.3.3.2 Régulation positive de MAPK par MPF

En retour et de manière indirecte, l'activité du MPF soutient l'activité de la voie MAPK par la promotion de la synthèse de Mos (Hochegger *et al.*, 2001; Paris *et al.*, 1991) et la stabilisation de la protéine par phosphorylation (Castro *et al.*, 2001).

Il est important de noter que la production de MPF se réalise également de manière indépendante de MAPK. Karaiskou *et al.* proposent un processus d'activation du pré-

MPF en MPF, lorsque l'ovocyte est stimulé par la progestérone. Suite à ce stimuli, la phosphatase Cdc25 est activée par plusieurs kinases dont la Plx 1 (Karaiskou *et al.*, 2004). Cette dernière induit la formation de MPF *via* son interaction avec Cdc2 (Cdk1) (Abrieu *et al.*, 1998). De ce constat, Brandman et collègues analysent la dynamique d'activation des deux voies inter-dépendantes : la formation de MPF et la voie Mos-MEK-MAPK. Pour eux, l'activation de MPF est plus rapide que l'activation de MAPK (Brandman *et al.*, 2005).

2.4 Méthodes d'inhibition sélective des interactions dans le réseau des MAPK

En utilisant divers outils pour inhiber la voie MAPK il est possible d'étudier le rôle de chaque membre de la voie. Ces outils biologiques sont : les oligonucléotides antisens (de type phosphodiester, phosphorothioate ou morpholine), des inhibiteurs de protéines chaperonnes (i.e. geldanamycine, inhibiteur de Hsp90), des inhibiteurs chimiques de MAPKK/MEK 1 et 2 (PD98059 et U0126), des anticorps neutralisants (anti-MAPKK/MEK), des phosphatases (Mkp1 et Mkp3) et le facteur létal de l'anthrax (inhibiteur non-sélectif envers les MEK). Les résultats de ces différentes stratégies sont regroupés dans le tableau 2.1. Nous pourrions nous intéresser notamment à la variation de l'accumulation de Mos selon les perturbations expérimentales. Les tableaux 2.2 et 2.3 indiquent respectivement les valeurs des concentrations des protéines de la cascade et de l'ARNm de Mos.

L'inhibition de la voie MAPK a donné des résultats contradictoires en fonction des stratégies d'inhibition utilisées (tableau 2.1). Certains auteurs montrent que l'inhibition de la cascade des MAPK empêche l'activation du MPF et la GVBD. La reprise méiotique peut être bloquée par micro-injection d'anticorps anti-MEK (Kosako *et al.*, 1994), par de la toxine du facteur létal de l'anthrax (LF) qui clive les MAPK kinases sans distinction (Chopra *et al.*, 2003 ; Duesbery *et al.*, 1998), ou par l'incubation des ovocytes en présence de PD98059, un inhibiteur de MEK1 et MEK2 (Cross et Smythe, 1998) ; ce dernier résultat n'a pas pu être reproduit (Fisher *et al.*, 1999). Enfin, l'inhibition de Mpk1 par micro-injection de la phosphatase CL100 (Gotoh *et al.*, 1995) ou d'anticorps neutralisants (Gotoh and Nishida, 1995) empêche l'activation du MPF et la GVBD. A l'inverse, d'autres auteurs montrent que l'inhibition de la voie MAPK induit un simple retard de la GVBD lorsque les ovocytes sont traités par la progestérone. L'inhibition de la synthèse ou de l'activité de Mos, par micro-injection d'oligonucléotides antisens de type Morpholine (Dupré *et al.*, 2002) ou par incubation en présence de geldanamycine, inhibiteur de Hsp90 (Fisher *et al.*, 1999), n'empêche pas la GVBD mais la retarde. La présence d'U0126, inhibiteur de MEK1 et MEK2, conduit à des résultats similaires (Gross *et al.*, 2000). La micro-injection d'ARNm codant la phosphatase Mkp3 retarde également la GVBD (Fisher *et al.*, 1999).

L'inhibition de la synthèse protéique de Mos par l'ensemble des anti-sens (POAS, MoAS, PTAS) induit l'absence de protéine Mos suite à la stimulation de l'ovocyte par la progestérone. Cependant pour les Morpholines et les Phosphorothioates Oligonucleotides la transition G2/M a lieu, avec une dynamique non classique, puisque l'on observe que

Inhibiteur	Cible	A. M.	GVBD	Références
Mos - POAS	ARNm Mos	non	non	(Sagata <i>et al.</i> , 1988)
Mos - MoAS	ARNm Mos	non	retard	(Baert <i>et al.</i> , 2003 ; Dupré <i>et al.</i> , 2002)
Mos - PTAS	ARNm Mos	non	retard	(Bodart <i>et al.</i> , 2005)
Geldanamycine	X / Mos	oui	retard	(Fisher <i>et al.</i> , 1999)
PD98059	Y ₃ / MEK	n. d.	non	(Cross et Smythe, 1998)
		n. d.	retard	(Fisher <i>et al.</i> , 1999)
U0126	Y ₃ / MEK	oui	retard	(Baert <i>et al.</i> , 2003 ; Bodart <i>et al.</i> , 2005 ; Gross <i>et al.</i> , 2000)
		non	non	(Bagowski <i>et al.</i> , 2001b)
Anthrax LF	Y ₃ / MEK	non	non	(Duesbery <i>et al.</i> , 1998)
Anticorps anti-MEK	Y ₃ / MEK	n. d.	non	(Kosako <i>et al.</i> , 1994)
CL100	Z ₃ / MAPK	faible	non	(Gotoh <i>et al.</i> , 1995)
Mkp3	Z ₃ / MAPK	n. d.	non	(Fisher <i>et al.</i> , 1999)

TAB. 2.1 – Effets des stratégies d’inhibition de la cascade MAPK sur l’accumulation de l’oncoprotéine Mos (A. M.) et la rupture de la vésicule germinative (GVBD). Les symboles X, Y₃ et Z₃ sont définis dans la partie II. n. d. : non déterminé par les auteurs ; POAS : Phosphodiester Oligonucléotides ; MoAS : Morpholinos Oligonucléotides (Gene-tools™) ; PTAS : Phosphorothioates Oligonucléotides. CL100 est une MAPK-phosphatase/Mkp1 (DUSP1). Mkp3 est une MAPK-phosphatase (DUSP6, PYST, rVH6).

2.4. MÉTHODES D'INHIBITION SÉLECTIVE DES INTERACTIONS DANS LE RÉSEAU DES MAPK

Espèces	Concentration protéine	Demi-vie / Vitesse de dégradation
Mos	0,6 - 15 nM (Huang et Ferrell, 1996), 10^9 molécules / cellule ; 3 nM (Ferrell, 1996)	Xe-Mos : 30 minutes dans les cellules NIH3T3 ; Pro-Ser-(MOS) : demi-vie courte vs Pro-Ser PO3-(MOS) : demi-vie longue (plusieurs heures) (Sheng <i>et al.</i> , 2002)
MEK	0,24 - 6 μ M (Huang et Ferrell, 1996), 350×10^9 molécules / cellule , 1200 nM (Ferrell, 1996)	Pas de dégradation
MAPK / ERK2 / Xp42Mpk1	0,24 - 6 μ M (Huang et Ferrell, 1996), 100×10^9 molécules / cellule , 300 nM (Ferrell, 1996)	Pas de dégradation
MAPKP	24 - 600 nM (Huang et Ferrell, 1996)	Selon son identité

TAB. 2.2 – Valeurs des concentrations disponibles des protéines utilisées pour la modélisation de la voie MAPK. MAPKP symbolise les phosphatases de MAPK.

Symbole	Concentration en ARN messenger	Polyadénylation
ARNm Mos	5 ng / ovocyte	La polyadénylation se produit en 90 minutes (de Moor et Richter, 1997) ou en 2 heures (Charlesworth <i>et al.</i> , 2004). L'ARNm est présent jusque la gastrulation (Sagata <i>et al.</i> , 1988)
polyA-ARNm Mos	% poly-A non déterminé	La polyadénylation des ARNm est immédiatement suivie par la synthèse protéique (de Moor et Richter, 1997).
Autre	Actine = 1 ng ; HSP70 = 4 pg, Wee1 = 20 pg, Myt1 = 1 pg ; Chk1 = 4 pg (Furuno <i>et al.</i> , 2003)	Traduction au Stage VI : 10^{12} ribosomes (Hausen, 1991) ; PolyA + ARN : 80 ng.

TAB. 2.3 – Valeurs des concentrations disponibles des ARN messagers chez *Xenopus laevis* et leur polyadénylation.

GVBD est retardée. L'activation de la voie Mos - MEK - ERK n'est donc pas nécessaire pour la GVBD mais les travaux menés par Baert et Bodart (2005) indiquent qu'elle tient des rôles physiologiques lors de la reprise méiotique, notamment dans la formation du fuseau de méiose et la ségrégation du matériel génétique.

2.5 Rôles physiologiques de la voie MAPK dans les ovocytes de Xénope

2.5.1 Le facteur cytotatique

En fin de maturation méiotique, le cycle cellulaire s'arrête en métaphase II en attente de la fécondation. Cet arrêt est dû à un facteur cytotatique (CSF) identifié par Masui et Markert, qui n'existe pas dans les cellules somatiques (Masui et Markert, 1971). Ce facteur est concomitant à la présence de MPF mais apparaît plus tard au cours de la maturation et se dégrade plus vite que MPF au moment de la fécondation.

À la fin des années 90, l'identité du facteur cytotatique n'était pas clairement établie, mais il avait été démontré que cette activité ne dépendait pas d'un complexe protéique tel que le MPF. La capacité du CSF résulte de l'activité et de l'intervention de plusieurs protéines kinases distinctes. Les premières expériences de caractérisation du CSF au niveau moléculaire ont montré que le CSF dépend de la présence des ions Mg^{2+} , et qu'il est sensible à toute élévation de la concentration intracellulaire de calcium (Meyerhof et Masui, 1977). L'activité est en outre indépendante de la synthèse protéique (Murray *et al.*, 1989). En 1989, les travaux de Sagata et collaborateurs (Sagata *et al.*, 1989b) ont déterminé que l'oncoprotéine Mos était un des composants majeurs de l'activité CSF. Par la suite, les protéines en aval de Mos, telles que MEK, MAPK et Rsk ont été également déterminés comme des constituants majeurs du CSF (Bhatt et Ferrell, 1999; Gross *et al.*, 1999; Haccard *et al.*, 1993; Kosako *et al.*, 1994a; Sagata, 1997). L'arrêt en métaphase relayé par cette cascade de kinase est lié au maintien dans l'ovocyte d'une autre activité kinasique, celle du MPF (Abrieu *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 2000). Par des stratégies utilisant des oligonucléotides antisens, il a été montré que l'absence de Mos entraîne *in vivo* l'activation périodique du MPF, sans arrêt en métaphase II (Dupré *et al.*, 2002). En effet, Dupré *et al.*, indiquent que Mos est requis pour stabiliser Cdc 2 et son inhibition par antisens n'empêche pas l'activation de Cdc2 lors d'une stimulation par la progestérone (Dupré *et al.*, 2002).

Il est admis depuis 1993 que le signal calcique induit par la pénétration du spermatozoïde active la CaMK II dans les oeufs de xénope (Lorca *et al.*, 1993). Néanmoins, les mécanismes par lesquels la CaMK II contrecarre l'action du CSF sont mal identifiés. Un lien entre Plx1, le calcium et CaMK II a été récemment mis en lumière (Descombes et Nigg, 1998) : la CaMK II déclenche la dégradation de XErp1/Emi2, au travers du recrutement de Plx1 sur XErp1/Emi2. XErp1/Emi2 appartient à la famille des Emi/Erp ("Early Mitotic Inhibitor/Emi Related Protein"), qui comprend deux membres : Emi1 et Emi2, inhibant directement l'APC ("Anaphase Promoting Complex") grâce à leur domaine à doigt de zinc, localisé dans la région C-terminale. Ces protéines F-box peuvent interagir

avec l'ubiquitine ligase SCF β -TRCP, qui cible les régulateurs du cycle cellulaire pour leur dégradation (Reimann *et al.*, 2001 ; Schmidt *et al.*, 2005).

XErp1/Emi2 a été par la suite caractérisée comme un inhibiteur de l'APC, essentiel pour l'activité CSF (Rauh *et al.*, 2005 ; Schmidt *et al.*, 2005). La phosphorylation de XErp1/Emi2 par la CaMK II entraîne la liaison de Plx1 (Liu et Maller, 2005 ; Rauh *et al.*, 2005), qui phosphoryle une séquence DSG-X3-S dans la partie N-terminale de la protéine, créant un motif de reconnaissance pour l'ubiquitine ligase SCF β -TRCP : XErp1/Emi2 est rapidement dégradée. La mutation des sites sérine 194 et thréonine 195 rend XErp1 insensible au signal induit par l'augmentation de calcium.

Deux groupes ont récemment proposé un nouveau modèle de fonctionnement de l'activité cytotatique, offrant un lien entre la voie MAPK et XErp1/Emi2 (Inoue *et al.*, 2007 ; Nishiyama *et al.*, 2007). Cette dernière n'est pas détectée dans les ovocytes avant la fin de la méiose I et s'accumule en méiose II à une concentration estimée de 13 nM. Rsk phosphoryle directement XErp1/Emi2 sur les résidus sérine 335 et thréonine 336 (Inoue *et al.*, 2007) et les résidus thréonine 336, sérine 342 et sérine 344 (Nishiyama *et al.*, 2007). Ces phosphorylations augmentent la stabilité et l'activité de la protéine. XErp1 apparaît comme une protéine pivot du CSF, dont l'activité et la stabilité dépendent de la cascade Mos - MEK - MAPK.

2.5.2 La formation du fuseau de méiose

Dans les modèles Amphibiens, les études concernant les MAPK et le fuseau de division sont peu abondantes. Chez le Xénope, l'inhibition de la voie de Xp42Mpk1 induit la formation de fuseaux monopolaires dans des extraits acellulaires de xénope (Horne et Guadagno, 2003). Aucune structure microtubulaire organisée n'est observée à la membrane lorsque les ovocytes sont traités avec de l'U0126 (Bodart *et al.*, 2002b ; Gross *et al.*, 2000 ; Horne et Guadagno, 2003) ou micro-injectés d'oligonucléotides Morpholinos anti-sens dirigés contre Mos (Dupré *et al.*, 2002a). Chez *Rana japonica*, l'inhibition de MEK par l'U0126 ne permet pas l'organisation d'un MTOC à la base de la vésicule germinative. Les chromosomes ne se condensent que partiellement et aucun fuseau bipolaire ne s'organise (Kotani et Yamashita, 2002).

La voie ERK est également impliquée dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau (Spindle Checkpoint) 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, certaines protéines s'associent aux kinétochores lors de la métaphase (Chen *et al.*, 1996 ; Li et Benezra, 1996 ; Taylor *et al.*, 1998 ; Taylor and McKeon, 1997). Le point de contrôle du fuseau régule l'activité de l'APC en inactivant Cdc20 et Cdh1 (Alexandru *et al.*, 1999 ; Fang *et al.*, 1998 ; Fesquet *et al.*, 1999 ; Fraschini *et al.*, 1999 ; Gorbsky *et al.*, 1998 ; Kallio *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1997). Bub1, une des protéines impliquées dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau, est phosphorylée et activée par Rsk (Schwab *et al.*, 2001). Elle s'associe aux kinétochores avant l'alignement des chromosomes (Schwab *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 1998 ; Taylor et McKeon, 1997) et elle est capable de supprimer l'activité de l'APC induite par Cdc20 (Alexandru *et al.*, 1999).

2.5.3 Suppression de la phase S lors de la transition G2/M

La phase S est typiquement supprimée entre les deux divisions de méiose, ce qui permet l'obtention de cellules haploïdes. L'inhibition de Cdk1 à la transition méiose I - méiose II, par un dominant négatif, entraîne la reformation d'une enveloppe nucléaire et la réplication de l'ADN (Furuno *et al.*, 1994). L'inhibition de la synthèse des cyclines B provoque également la disparition de l'activité du MPF entre les deux divisions méiotiques et conduit à l'entrée en phase S dans les ovocytes d'amphibiens ou d'étoile de mer (Furuno *et al.*, 1994; Picard *et al.*, 1996). La réplication précoce de l'ADN après la première division de méiose dans l'ovocyte de Xénope est provoquée par l'inhibition de la voie MAPK (Dupré *et al.*, 2002; Furuno *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2000). Aussi, la voie Mos - MAPK est nécessaire pour la réactivation rapide du MPF et le maintien d'un niveau d'activité qui empêche la réplication de l'ADN entre les deux divisions méiotiques dans les ovocytes de Xénope (Abrieu *et al.*, 2001; Hochegger *et al.*, 2001; Nebreda *et al.*, 1995; Sagata *et al.*, 1989b).

Chapitre 3

Modularité du réseau des MAPK

3.1 Notion de modules et de modularité - Généralités

L'avènement de 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 des réseaux d'interactions dynamiques qu'elles constituent dans la cellule. La transition d'un point de vue moléculaire vers une perspective de réseaux a amené l'application de concepts utilisés dans le domaine informatique en biologie ; 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, une certaine flexibilité et adaptabilité, voire sa robustesse. En biologie, un module peut être conçu comme un ensemble de processus dans un compartiment, qui accomplit de 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 niveau cellulaire 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 et peuvent être considérés comme un système qui effectue des tâches complexes, où l'accomplissement d'une tâche est subordonnée à la réalisation correcte de la précédente. Ce

système effectue ses tâches sous un certain nombre de contraintes mentionnées au chapitre 1.1.

Il est possible de découpler potentiellement le système du cycle cellulaire en trois modules d'action distincts, qui régulent les transitions de la phase G1 à la phase S, de G2 en M, ainsi que la transition vers la sortie de mitose. Le franchissement de ces transitions se déroule sous le contrôle d'un réseau de régulateurs, qui implique, entre autres, des couples cyclines-Cdks.

3.2 Modularité et cascade MAPK

Lorsque l'on considère la voie de signalisation Mos - MEK - ERK, le dénombrement des composants associés à chaque niveau laisse entendre que ces derniers peuvent être considérés comme des modules. En effet, chacun reçoit un stimulus du module ou niveau en amont, réagit en conséquence et finalement transmet un stimulus au module (niveau) en aval. Cette description correspond à la figure de la cascade qui est 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 (stimulation ou inhibition).

La difficulté de cette approche tient au fait que les modules changent de partenaires, ainsi que leur type d'interaction, en fonction des conditions expérimentales. Par exemple, dans des cellules somatiques telles que les cellules PC12, les effets cellulaires de l'activation des MAPK sont dépendants de la configuration des interactions entre modules. Lorsqu'elles sont stimulées par le facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor), le niveau de MAPK présente un taux d'activation élevé et soutenu, et la cellule se différencie. Par contre, après stimulation par le facteur de croissance épithélial (EGF), la réponse en MAPK est transitoire et les cellules prolifèrent (Santos *et al.*, 2007). Ces deux dynamiques impliquent deux configurations différentes en fonction des processus activés par les récepteurs. L'activation de MAPK dépendante de EGF implique la phosphorylation d'un résidu tyrosine du récepteur d'EGF, l'activation de Ras dépendant de SOS, suivi par l'activation de Raf (MEK Kinase). L'activation transitoire de MAPK résulte de l'inhibition de SOS par une boucle de rétro-contrôle dépendant de MAPK. Bien que l'activation de MAPK après stimulation par NGF implique également Ras, le système Rap1 induit une activation soutenue de MAPK *via* l'activation de B-Raf (Sasagawa *et al.*, 2005). Ainsi, en fonction du type de stimulation et du contexte cellulaire, la cascade MAPK peut être contrôlée par des boucles de rétro-contrôle positifs et/ou négatifs.

Par conséquent, la complexité de cette approche modulaire est fondée sur le choix arbitraire de la définition d'un module, de la variation de la topologie des interactions avec d'autres modules en fonction des stimuli et de l'évolution temporelle.

3.3 Robustesse et redondance du réseau MAPK

La robustesse est l'attribut des systèmes complexes où co-existent 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 (Fell, 1997), signalisation inter-cellulaire (Freeman, 2000), chemotaxie (Kollmann *et al.*, 2005) et cycle cellulaire (Borisuk and Tyson, 1998). Cette capacité à répondre à un stimulus en dépit d'une perturbation repose sur la redondance entre mécanismes de régulation et rend complexe l'analyse des réponses cellulaires face à l'extinction d'un seul de ces mécanismes.

Deux niveaux de redondance ont pu être observés dans le réseau moléculaire qui régule la reprise méiotique des ovocytes d'amphibiens. Un schéma a été réalisé en tenant compte des interactions et/ou des connexions qui existent entre différents modules (figure 3.1), (Adler *et al.*, 2005 ; Castro *et al.*, 2001 ; de Moor and Richter, 1997 ; Frank-Vaillant *et al.*, 1999 ; Gotoh and Nishida, 1995 ; Haccard and Jessus, 2006 ; Karaïskou *et al.*, 2001 ; Keady *et al.*, 2007 ; Matten *et al.*, 1996 ; Palmer *et al.*, 1998 ; Paris and Richter, 1991 ; Peter *et al.*, 2002 ; Solomon, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994)).

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

- MAPK/ERK qui active le MPF en régulant négativement Myt1 (Palmer *et al.*, 1998), voire par la phosphorylation de Cdc25 (Wang *et al.*, 2007) ;
- p38MAPK γ , qui recrute et phosphoryle Cdc25 (Perdiguero *et al.*, 2003).

Les voies MAPK/ERK et JNK semble interconnectées au travers d'une boucle de rétro-action positive (Adler *et al.*, 2005), mais le rôle de JNK semble mineur dans la reprise de la méiose.

Le deuxième niveau de redondance qui a été décrit entre la synthèse de cycline B ou de Mos, offre deux voies alternatives pour l'activation du MPF (Haccard and Jessus, 2006 ; Haccard and Jessus, 2006b) :

- la formation de nouveaux complexes Cdk1/Cyc B permettrait de s'émanciper de l'action inhibitrice de Myt1, en concentration moins élevée dans les ovocytes de stade VI que durant l'ovogenèse (Karaïskou *et al.*, 2004) ;
- Mos activerait le MPF au travers de l'activation de MAPK/ERK, par les mécanismes précédemment rapportés, la régulation négative de Myt1 (Palmer *et al.*, 1998) ou l'activation directe de Cdc25 (Wang *et al.*, 2007).

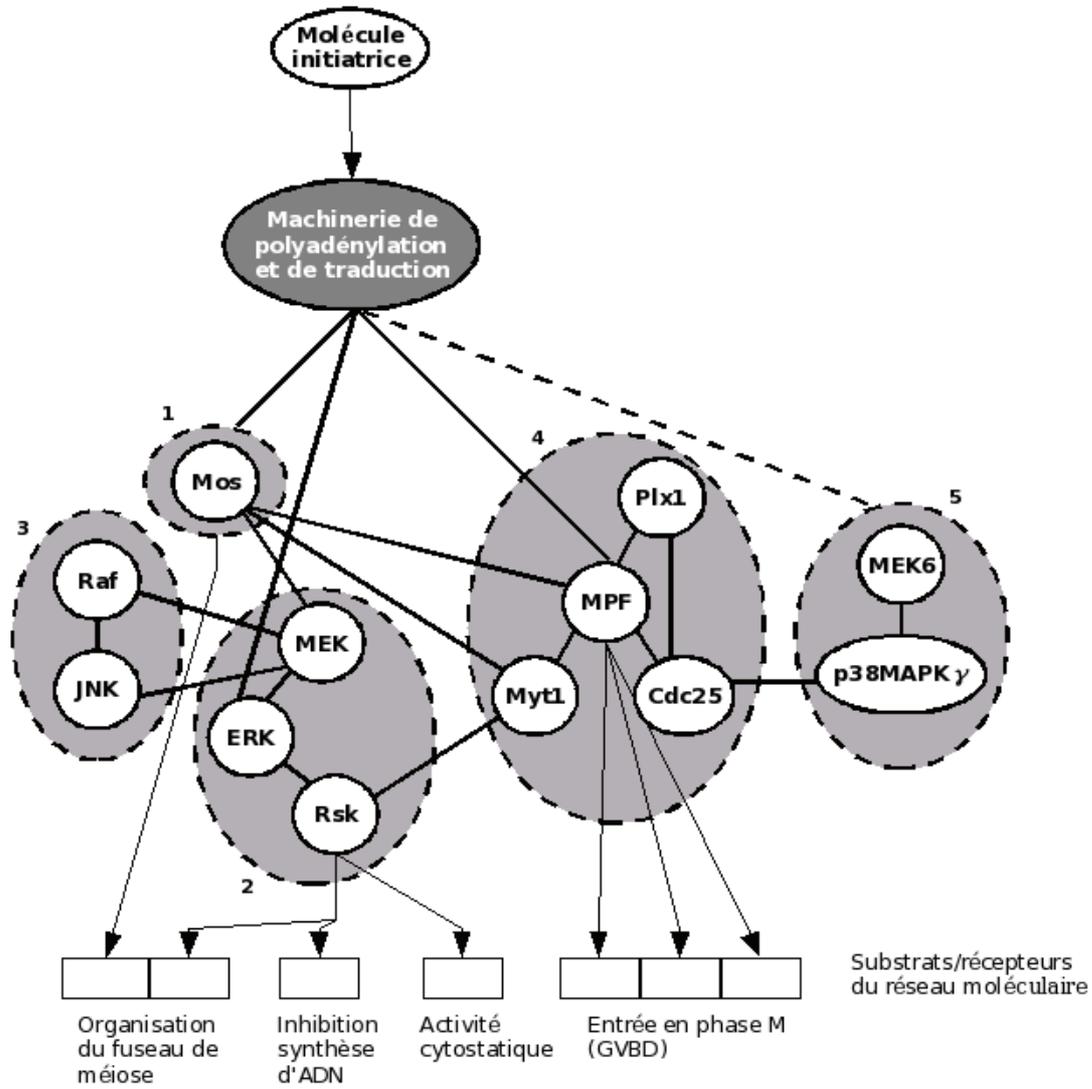


FIG. 3.1 – Modèle modulaire de la voie MAPK dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Module 1 : l'oncoprotéine Mos; 2 : la cascade MEK-ERK-Rsk; module 3 : boucle de rétro-contrôle JNK-Raf proposée par Adler *et al.*, 2005; module 4 : MPF et ses régulateurs (régulateur négatif Myt1 et les régulateurs positifs Cdc25 et Plx1); module 5 : p38MAPK γ (proposé par Perdiguero *et al.*, 2003).

3.4 MAPK/ERK et formation du fuseau méiotique de division des ovocytes d'amphibien

La notion de modularité reste subjective et dépend de l'aspect biologique étudié. Si la voie MAPK/ERK joue un rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'établissement de l'axe bipolaire du fuseau de division méiotique, la voie peut être considérée comme un seul module fonctionnel dans la morphogenèse du fuseau. Cependant, il est possible de découpler ce module. Si Rsk est l'enzyme clef pour le rôle de Mos exercé dans l'établissement de l'activité CSF, Rsk n'est pas suffisante à elle seule pour promouvoir la formation d'un fuseau en absence de Mos : Mos et Rsk sont nécessaires et jouent des rôles complémentaires dans l'établissement de l'axe bipolaire du fuseau de division méiotique (Bodart *et al.*, 2005). D'après ces expériences, deux modules fonctionnels peuvent être définis, exerçant des fonctions différentes dans la morphogenèse du fuseau des ovocytes d'amphibien (figure 3.2). Le premier est uniquement constitué de la protéine Mos et le second de la cascade MEK - MAPK - Rsk. Cependant, ces deux modules définis dans le cadre de la morphogenèse du fuseau sont insuffisants pour comprendre la manière dont la voie est régulée, et rendre compte de la manière dont elle exerce ses fonctions pléiotropiques en fonction des environnements ou types cellulaires.

En conséquence, en fonction du contexte, la cascade MAPK peut soit être considéré comme un simple module fonctionnel imbriqué dans un réseau plus étendu, soit pris comme un réseau avec des effets cellulaires pléiotropique construit sur le couplage de divers modules fonctionnels. Les résultats de Santos (2007), cités précédemment, se basent sur la méthodologie MRA ("Modular Response Analysis") proposée par Kholodenko (Kholodenko *et al.*, 2002). Cette approche permet de révéler les interactions existantes entre les modules, leur intensité, ainsi que le type de l'interaction (stimulation ou inhibition). L'illustration de cette approche a été réalisée par Kholodenko avec la voie Ras-Raf-MEK-ERK (Kholodenko *et al.*, 2002). Cependant, la méthode s'applique à tous les réseaux d'interaction, qu'il s'agisse de réseaux de régulation génétique ou des réseaux d'interaction protéine-protéine.

Brièvement la méthode MRA consiste à perturber un module dans le réseau sans affecter les autres modules et ensuite comparer le niveau d'activité stable dans le temps des protéines mesurées en absence et en présence de la perturbation. À partir de ces mesures une matrice de réponse locale (r_{ij}) est calculée, elle quantifie la sensibilité de réponse du module j à la perturbation d'un paramètre affecté à un autre module i (p_i) dans le réseau. Cette matrice fournit les informations utiles comme la présence d'une interaction entre deux modules et leur type. Cependant, pour l'obtenir il faut réaliser une estimation de la matrice de réponse globale de m modules $R_{jp_i} = (\Delta_i \ln x_j)$ ($i, j = 1, \dots, m$) estimée pour les états stables (la concentration ne varie pas dans le temps). En effet, les interactions locales entre deux modules ne sont pas accessibles expérimentalement avec une cellule intacte, car il faudrait les isoler du réseau alors que ce dernier est affecté globalement par la perturbation.

La procédure d'application expérimentale proposée par Kholodenko *et al.* (2002) est la suivante :

1. Définir les modules qui composent le réseau étudié et identifier les médiateurs des

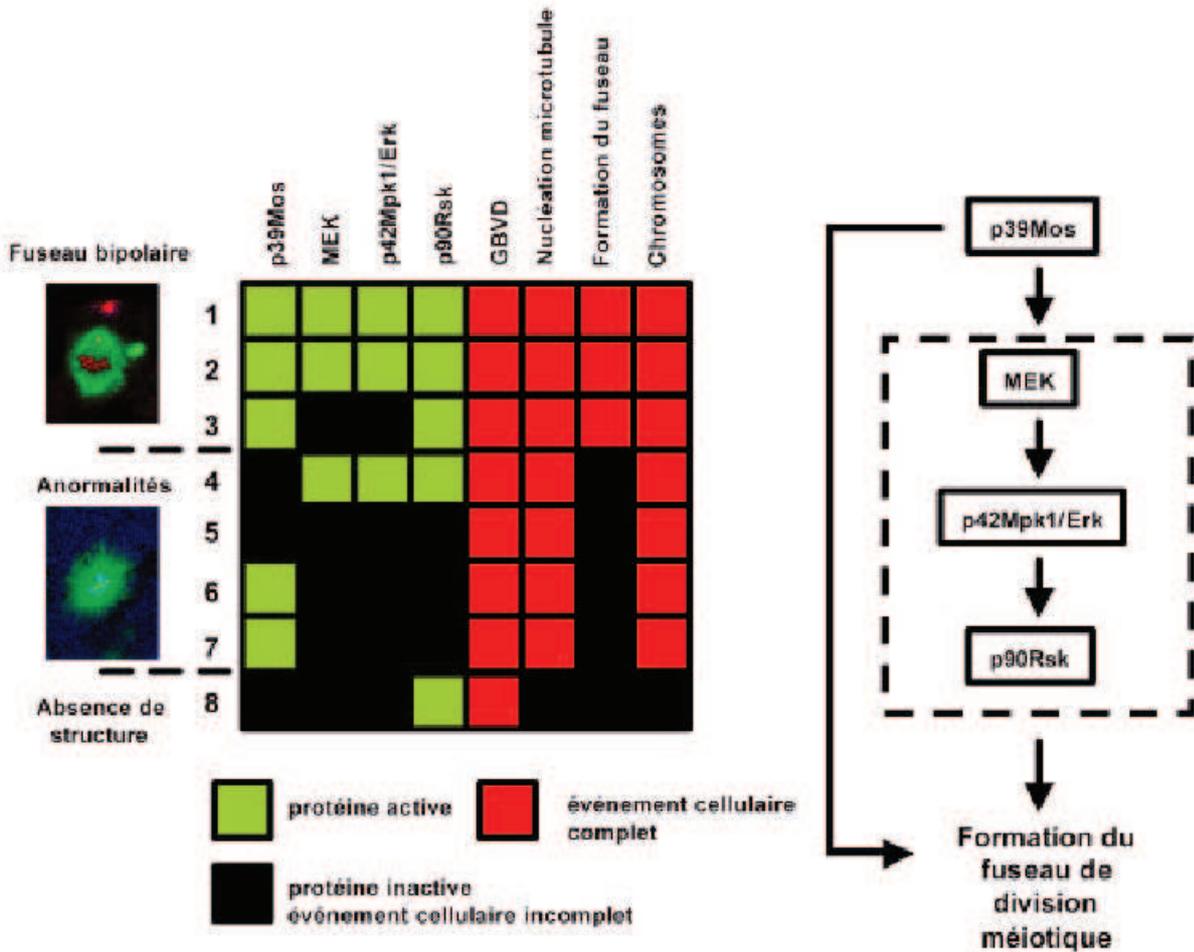


FIG. 3.2 – Morphogenèse du fuseau en absence d'activité MAPK. Les résultats de l'inhibition sélective des protéines sont ici rapportés sous forme du graphique (A). 1 : Sens / DMSO ; 2 : Oligonucléotides antisens anti-Mos + Mos ; 3 : U0126 + Rsk ; 4 : Antisens Mos + MEK ; 5 : Antisens Mos ; 6 : U0126 ; 7 : U0126 + Mos ; 8 : Antisens Mos + Rsk. Ils permettent d'émettre l'hypothèse de l'existence de deux modules (B) : l'un est formé par l'oncoprotéine Mos seule et l'autre est formé des autres membres de la cascade en aval. Les résultats d'inhibition peuvent être classés en trois groupes : (1) phénotype normal des cellules en présence de Mos et de Rsk ; (2) phénotype anormal de l'ovocyte - formation non correcte du fuseau de division - lorsque Mos ou Rsk est absent ; (3) uniquement GVBD sans autre effet physiologique lorsque Rsk est présent en absence de Mos, MEK et MAPK.

interactions entre les modules (e. g. une protéine activée qui agit sur un autre module que le sien).

2. Perturber uniquement un paramètre p_i intrinsèque au module i , au moyen d'un inhibiteur ou un activateur spécifique à une réaction qui se déroule au sein du module i . Il faut mesurer la différence de niveau des concentrations à l'équilibre des médiateurs identifiés précédemment, avant la perturbation (x_j^0) et après (x_j^1). Par exemple, pour $i = 1$, la première colonne de la matrice de réponse globale est estimée

par la formule suivante : $\Delta_1 \ln x_j \approx 2 \frac{(x_j^1 - x_j^0)}{(x_j^1 + x_j^0)} = 2 \frac{\left(\frac{x_j^1}{x_j^0} - 1\right)}{\left(\frac{x_j^1}{x_j^0} + 1\right)}$. L'utilisation des

rapports de valeurs permet de s'affranchir de la connaissance de la valeur absolue des concentrations, ce qui est utile lorsque l'on utilise une méthode semi-quantitative tel que le western blot.

Cette procédure est reprise avec la perturbation appliquée aux autres modules ($i = 2, \dots, m$) pour obtenir les autres colonnes de la matrice $(\Delta_i \ln x_1, \dots, \Delta_i \ln x_m)^T$.

3. À partir de la matrice globale (notée \mathbf{R}_p), on résout l'équation qui relie la matrice de réponse globale à la matrice de réponse locale (notée \mathbf{r}) : $\mathbf{r} = -[\text{diag}(\mathbf{R}_p^{-1})]^{-1} \cdot \mathbf{R}_p^{-1}$. Le symbole *diag* désigne la matrice diagonale de \mathbf{R} où les éléments non-diagonaux sont égaux à zéro. Ainsi la matrice \mathbf{r} est obtenue et ses coefficients indiquent le type d'interaction entre les modules.

L'application de cette méthode doit vérifier quelques conditions (Sontag, 2008) :

- l'amplitude de la perturbation du système doit indiquer une petite valeur (voir l'approximation mathématique lors de la seconde étape) ;
- les mesures doivent se réaliser lorsque le système est en état d'équilibre (sinon la méthode nécessite l'usage de dérivée du second degré qui nécessite des mesures sans bruit et proche dans le temps) ;
- une absence de bruit dû à la variabilité biologique qui empêche une mesure correcte des rapports de valeurs mesurées.

Si l'on observe les résultats proposés sur la figure 1 dans l'article de Santos *et al.* (2007), nous observons que la concentration en ERK a été mesurée dans des conditions de quasi-équilibre sans adapter la méthode mathématique. De plus, on remarque que sous stimulation par NGF, il y a une différence de topologie des interactions qui constitue le réseau en fonction du temps (deux expériences avec des perturbations identiques réalisées l'une à 5 minutes et l'autre à 15 minutes).

L'application de cette approche a été étudiée pour notre modèle. Cependant, elle a été écartée, car les inhibiteurs perturbent de manière trop importante les valeurs de concentrations qui nous intéressent (Mos, MEK et MAPK).

La figure 3.3 illustre le réseau d'interaction entre les modules. On remarque que la cascade MAPK n'est pas uniquement une série de trois modules empilés. Le module MAPK/ERK indique une entrée (phosphorylation par MEK) tandis qu'il possède plusieurs sorties potentielles (phosphorylation de Mos et Cdc25) en plus de sa sortie principale (phosphorylation et activation de Rsk). En contraste à ce module MAPK/ERK,

le module Mos indique au moins deux sorties (phosphorylation de MEK et Myt1) et plusieurs entrées potentielles (phosphorylation par MAPK/ERK et phosphorylation par MPF), en plus de l'initiation de la synthèse protéique suite à la stimulation par la progestérone. La complexité du système augmente lorsque l'on prend en compte la régulation des événements en amont de la synthèse protéique, comme les activités des chaperones et les mécanismes de dégradation qui régissent l'accumulation et l'activité de Mos. Afin d'appréhender l'importance du module Mos sur la cascade et sa régulation par MAPK et MPF, nous allons proposer dans la partie suivante, un modèle qui tient compte des états actif ou non-actif, stable ou instable de Mos et de leur régulation *via* MPF et MAPK.

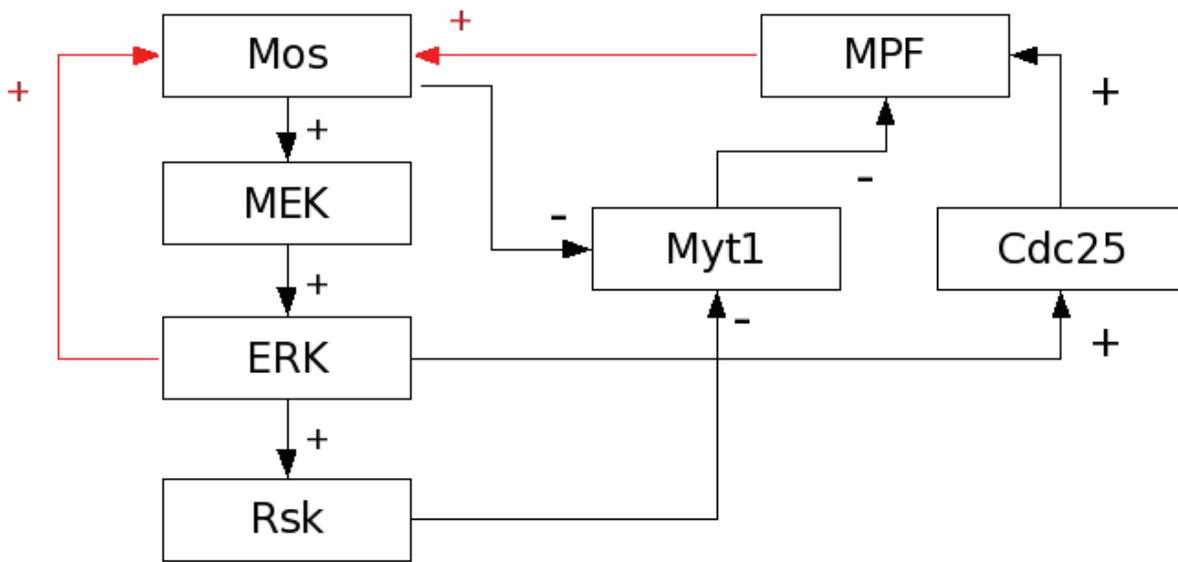


FIG. 3.3 – Les motifs de régulation mis en évidence pour chaque molécule, produisant un schéma complexe des interactions. Voir texte pour la discussion.

Modélisation

Chapitre 4

Introduction

L'analyse théorique du comportement de la voie de signalisation Mos-MEK-MAPK dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* lors de la transition G2/M a suscité un grand engouement durant la dernière décennie. L'apport de données expérimentales issues d'observations réalisées dans les ovocytes de Xénope a permis d'élaborer des modèles prédictifs et de tester leur conformité en relation avec de nouvelles observations.

L'une des références majeurs dans ce domaine est constituée par l'ensemble des travaux mené par le groupe de J. Ferrell (Huang et Ferrell, 1996; Ferrell et Machleder, 1998; Ferrell et Xiong, 2001; Xiong et Ferrell, 2003; Ferrell, 1999b; Angeli *et al.*, 2004; Brandman *et al.*, 2005; Justman *et al.*, 2009). Dès 1996, Huang et Ferrell étudient la cascade MAPK activée par Mos en combinant une approche théorique et une approche expérimentale, en utilisant notamment des extraits d'ovocytes de Xénope supplémentés en protéine affine du maltose fusionnée avec Mos (malE-Mos) (Huang et Ferrell, 1996). Leurs équations tiennent compte des interactions entre les protéines et leur assemblage en complexes, sous l'hypothèse d'une dynamique qui suit la loi d'action de masse. Cette loi proposée par Guldberg et Waage traite 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 dans le cas du modèle les concentrations. Huang et Ferrell démontrent, numériquement et expérimentalement, que la structure en cascade implique une évolution temporelle de l'activité de MAPK phosphorylé et actif, selon un profil sigmoïdal en fonction d'un stimulus qui varie linéairement. Cette variation non-linéaire correspond à un comportement qui caractérise les enzymes possédant un grand degré de coopérativité (Huang et Ferrell, 1996).

En cinétique enzymatique, la mesure du degré de coopérativité se réalise au moyen d'une fonction empirique proposée par Archibald Hill en 1910 qui porte son nom (Hill, 1910). Il l'a proposée pour décrire la fixation de type coopérative entre l'oxygène et l'hémoglobine. Cette fonction est de la forme suivante :

$$\nu = \frac{V[A]^n}{K_{0,5}^n + [A]^n}$$

où ν est la vitesse de la réaction ; V est la vitesse limite de la réaction ; $[A]$ est la concentration en substrat de l'enzyme ; $K_{0,5}^n$ est la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction vaut la moitié de V et n est appelé le coefficient de Hill.

On remarque une similitude entre cette équation de Hill et l'équation proposée par Michaelis-Menten. En effet, en absence de coopérativité ($n = 1$), elles sont équivalentes. Le degré de coopérativité est indiqué par le coefficient de Hill qui peut être estimé à partir de mesures expérimentales (voir annexe D). Dans ce but, un réarrangement permet d'obtenir la relation suivante où l'on peut extraire la valeur de n :

$$\log\left(\frac{\nu}{V - \nu}\right) = n(\log([A]) - \log(K_{0,5}))$$

Si $n > 1$, la coopérativité est positive et si $n < 1$, la coopérativité est négative. Dans le cas $n = 1$, le profil de la courbe stimulus/réponse produit par une enzyme de type Michaelis-Menten est une hyperbole (figure 4.1). Quand $n > 1$, la courbe stimulus/réponse tend vers un profil en forme de seuil au fur et à mesure que la valeur de n augmente. Goldbeter et Koshland ont dénommé ce type de réponse par le terme ultrasensibilité (Goldbeter et Koshland, 1981). La particularité de ce comportement ultrasensible est d'être moins sensible aux faibles valeurs de stimuli qu'une enzyme de type Michaelis-Menten. De ce fait, une enzyme dont le profil de la courbe stimulus/réponse indique un coefficient de Hill élevé produira une réponse élevée uniquement lorsque le stimulus est supérieur à une valeur particulière. Quand la valeur du stimulus est inférieure à cette valeur seuil particulière, la réponse est très faible.

Dans le cas de la cascade Mos - MEK - MAPK, l'analyse de Huang et Ferrell se concentre sur les courbes stimulus/réponse obtenues pour l'activité de Mos (MAPKKK), MEK (MAPKK) et MAPK en fonction de E1, une enzyme qui active Mos. Bien qu'il n'y ait pas de coopérativité entre les enzymes de la cascade, ils ont quantifié le degré non-linéaire de leurs graphes, au moyen d'une fonction de Hill décrite par :

$$y = \frac{x^{n_H}}{K + x^{n_H}}$$

où n_H est le coefficient de Hill; y représente le niveau d'activité pour les kinases; x représente la concentration du stimulus et K une constante.

À partir de la résolution numérique de leur modèle, ils ont obtenu une valeur du coefficient de Hill de MAPK égal à 4,9, qui est bien supérieure à celui de l'hémoglobine estimé à 2,8 (Stryer, 1988). Par conséquent, en absence de coopérativité il est possible d'obtenir une réponse de type ultrasensible. Huang et Ferrell ont étudié l'influence des concentrations totales des diverses protéines kinases sur la valeur du coefficient de Hill, ainsi que l'influence des différentes valeurs des constantes d'affinités sur ce coefficient. Ils remarquent que le coefficient de Hill associé à chaque kinase qui constitue la cascade augmente au fur et à mesure que la kinase est située en aval de la cascade. Les kinases MEK et ERK sont actives lorsqu'elles sont phosphorylées sur deux sites (MEK : Ser 218 et Ser 222; ERK : Thr 183 et Tyr 185). Le mécanisme de phosphorylation ne se réaliserait pas simultanément sur les deux sites, mais se déroulerait en deux étapes. Ce processus en deux temps contribue à l'augmentation du coefficient de Hill de l'activité de MAPK. Par conséquent, la cascade, de part sa structure et la nature de ses composants, produit une réponse de type ultrasensible des MAPK après stimulation par Mos. Elle est moins sensible aux faibles stimulations car elle filtre les stimuli qui sont inférieurs à une valeur

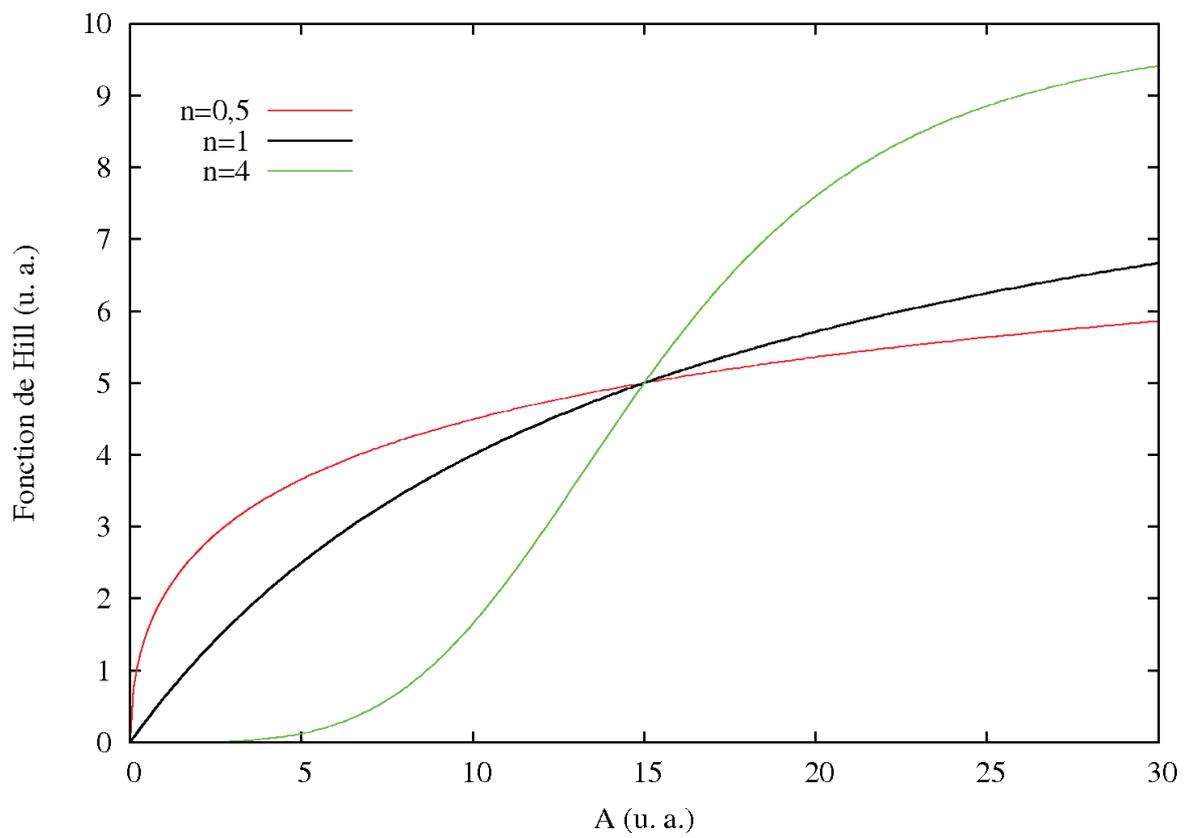


FIG. 4.1 – Illustration de l'influence de la valeur de n sur le profil de la fonction de Hill. Exemple réalisé avec $V = 10$, $K_{0,5} = 15$ et $n = 0,5 ; 1 ; 4$.

seuil. L'augmentation d'activité de MAPK ne se déroule que lorsque le stimulus en Mos est supérieur à cette valeur seuil.

En 1998, Ferrell et Machleder étudient les réponses de la cascade Mos - MEK - ERK non plus dans des extraits d'ovocyte de Xénope mais directement dans les ovocytes (Ferrell et Machleder, 1998). Un apport supplémentaire au modèle utilisé dans l'article de Huang et Ferrell consiste à prendre en compte une interaction entre MAPK et Mos, qu'ils nomment une boucle positive de rétro-contrôle. Le rôle de cette boucle est de représenter l'influence de MAPK sur l'accumulation de Mos *via* la stabilisation de Mos par phosphorylation de son résidu Ser 3. Les effets conjugués de cette boucle positive et du comportement de type ultrasensible de la cascade sont analysés sous un aspect expérimental et d'un point de vue théorique. Des lots d'ovocytes sont successivement stimulés par de la progestérone selon un gradient linéaire croissant de concentration. Les concentrations en MAPK actif de chaque ovocyte par ensemble sont ensuite estimées. Ferrell et Machleder remarquent que la valeur de concentration ne se distribue pas de manière continue et uniforme en fonction du stimulus de progestérone, mais prend deux valeurs distinctes. Si l'expérience est reconduite avec une stimulation de la cascade Mos - MEK - MAPK dans chaque ovocyte par l'injection de malE-Mos en absence de progestérone, le résultat est identique. Ainsi, la cascade répond aux stimuli selon un mode binaire où la concentration en MAPK actif stable dans le temps est faible ou élevée. Cette réponse de type tout-ou-rien caractérise ce que l'on nomme la bistabilité de la cascade. Le modèle théorique proposé par Ferrell et Machleder valide les résultats expérimentaux et indique une interprétation de la bistabilité de la cascade. Cette dernière est produite par la présence de la boucle de rétro-contrôle cumulée au comportement ultrasensible de la cascade. Lorsque la valeur de concentration en stimulus (soit en progestérone, soit en malE-Mos) est supérieure à une valeur seuil, la cascade produit une concentration élevée de MAPK actif, qui entraîne la maturation ovocytaire. Ainsi les stimuli de valeurs inférieures à cette valeur seuil sont filtrés et n'induisent pas la maturation de l'ovocyte. Le modèle caractérise cette valeur seuil comme étant la valeur de concentration en stimulus correspondant à un point d'équilibre instable de la cascade. Dans ce cas, la concentration en MAPK actif bascule soit vers l'état stable de valeur faible, soit vers l'état stable de valeur élevée. On remarque que la bistabilité de la valeur en concentration de MAPK actif induit la bistabilité de Mos *via* l'action de la boucle de rétro-contrôle.

La transition de l'état de faible valeur en concentration de MAPK actif vers l'état de concentration élevée peut être soit réversible, soit irréversible. Dans le cas réversible, l'application de stimuli, dont les valeurs sont inférieures à la valeur seuil de la cascade, correspond à une production de MAPK actif avec une concentration faible. Ainsi, la cascade qui se trouve dans un état stable haut (la réponse est une concentration élevée en MAPK actif) peut se retrouver dans un état bas (faible concentration en MAPK actif) en fonction de la valeur des stimuli. De plus, la présence de la boucle de rétro-contrôle induit un phénomène d'hystérèse de cette réversibilité. Cela signifie que la valeur seuil du stimulus pour activer la cascade et rejoindre l'état haut est différent de la valeur seuil du stimulus en deçà de laquelle la cascade se retrouve dans son état bas (Ferrell et Xiong, 2001) (figure 4.2). Dans le cas de transition irréversible, lorsque la cascade est dans son état haut et n'est plus sous influence du stimuli, elle reste de manière irréversible dans

cet état haut.

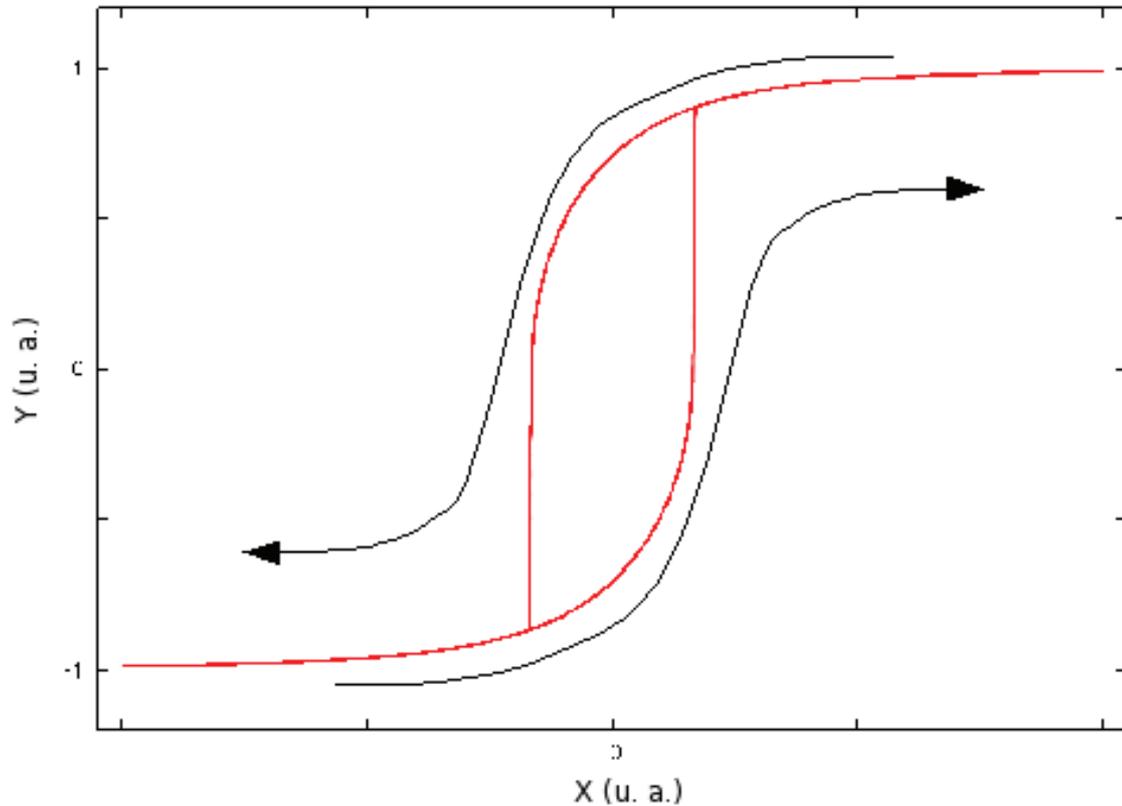


FIG. 4.2 – Illustration du phénomène d’hystérèse. La croissance et décroissance de la variable Y se produit avec une valeur de X différente.

Xiong et Ferrell (Xiong et Ferrell, 2003) analysent le lien entre une stimulation transitoire de l’ovocyte par la progestérone et le caractère irréversible de la transition d’état de la cascade Mos - MEK - MAPK couplée à la cascade Plx1 - Cdc25 - Cdc2. En effet, la cascade Mos - MEK - MAPK tient un rôle dans la stabilisation du complexe Cdc2/CyclinB (MPF). De plus, ce complexe est responsable de la stabilisation de Mos, et donc du maintien d’un taux de MAPK activé. Après avoir induit la maturation de l’ovocyte suite à une exposition de 5 h à la progestérone (600 nM), les ovocytes sont rincés pendant 10 h pour éliminer toute trace de progestérone. l’ovocyte est de nouveau stimulé par la progestérone avec des concentrations variables (de 0 à 600 nM). Durant ces deux étapes de stimulation, les valeurs de concentrations de MEK, MAPK et de l’histone H1 phosphorylée (marqueur de l’activité de l’hétéro-dimère Cdc2/CyclinB) sont mesurées. Les résultats indiquent que leurs valeurs de concentration augmentent durant la première phase (l’induction de la maturation) et restent élevées en absence de stimulation par la progestérone (pendant la phase de maintien). Xiong et Ferrell suggèrent l’influence de la boucle de rétro-contrôle sur la stabilisation de la réponse de la cascade et son maintien en absence de stimulus.

En 2004, Ferrell propose en collaboration avec Angeli un modèle de cascade qui ne

tient compte que de Mos, MEK et 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 Mos, MEK et MAPK, des données expérimentales sont utilisées. Elles se réfèrent aux valeurs des constantes de Michaelis-Menten, aux constantes de vitesse des réactions et des valeurs totales en concentration de Mos, MEK et MAPK. En annexe A et B, une résolution analytique des points fixes de ce modèle est proposée, complétée par une discussion sur les équilibres de la cascade.

L'activation mutuelle des cascades Mos - MEK - MAPK et Plx1 - Cdc25 - Cdc2 dans l'ovocyte de Xénope est proposée par Ferrell (Ferrell, 1999b). S'il ne propose pas un modèle mathématique pour l'étude de cette interaction, il discute cependant des diverses propriétés de chaque cascade et de l'effet de leur couplage sur la réponse graduelle de type tout-ou-rien de l'ovocyte successivement à la stimulation par la progestérone. En collaboration avec Brandman, Ferrell analyse du point de vue théorique la régulation biologique de transmission d'un signal (stimulus) par un système formé par plusieurs cascades respectivement incluses dans une boucle de rétro-contrôle positif, dont au moins une est plus rapidement activé que les autres (Brandman *et al.*, 2005). Parmi les exemples utilisés pour l'ovocyte de Xénope, trois boucles positives sont citées :

- Cdc2/CyclinB \longrightarrow Mos \longrightarrow Cdc2/CyclinB
- Cdc2/CyclinB \longrightarrow Cdc25 \longrightarrow Cdc2/CyclinB
- Cdc2/CyclinB \longrightarrow Myt1 \longrightarrow Cdc2/CyclinB

La première boucle est considérée comme lente et les deux autres rapides. Les mécanismes exactes par lesquels la progestérone active le MPF restent mal connus, mais impliquent la synthèse de cycline B. On remarque que MPF interagit avec ses deux régulateurs (Cdc25 et Myt1).

Récemment, Quincey A. Justman et Ferrell ont proposé une analyse de la variation du niveau d'activation de la cascade par la progestérone, au moyen d'un régulateur du niveau de traduction de la protéine Mos, la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) (Justman *et al.*, 2009). Cette kinase est un régulateur négatif qui inhibe le processus de traduction de la protéine Mos. Quatre modèles phénoménologiques sont développés pour déterminer l'influence des motifs de régulation (nature positive ou négative des boucles de rétro-contrôle et leurs diverses imbrications) sur le niveau d'activation de la cascade. À l'opposé des modèles antérieurs, Mos est représenté par deux variables : l'une notée M tient compte de la concentration de Mos synthétisé (déphosphorylé, non-stable et inactif), l'autre notée M^* est une variable composite qui contient la forme phosphorylée, active, stable de Mos et les kinases dépendantes de Mos (MEK et MAPK). La boucle de rétro-contrôle positif d'activation de Mos par MAPK n'apparaît pas explicitement, mais une boucle de rétro-contrôle positif est désignée pour indiquer l'influence de M^* sur la production de M . De ce fait, on ne s'intéresse plus à la dynamique de la cascade Mos - MEK - ERK, mais au niveau de la synthèse de la protéine Mos où interviennent la stimulation par la progestérone et GSK-3 β .

D'autres équipes ont proposé des modèles d'étude de la cascade Mos - MEK - MAPK chez le Xénope et deux grandes approches se dégagent. La première consiste à utiliser des

systèmes d'équations différentielles pour représenter la cascade et l'influence subie par la boucle de rétro-contrôle selon sa nature (positive (Ventura *et al.*, 2008) ou négative (Kholodenko, 2000)). La seconde approche utilise des méthodes stochastiques (Wang *et al.*, 2006). Enfin, la prise en compte de la forme sphérique de l'ovocyte a amené une nouvelle perspective de travail eu égard à la progression spatiale de la cascade de signalisation à partir de la membrane cellulaire vers le noyau (Markevich *et al.*, 2006).

Chapitre 5

Le modèle MPF-Mos-MAPK

Nous avons vu précédemment que la stabilisation de la forme active de Mos (X_a) dépend de la phosphorylation du résidu sérine 3, d'une part *via* l'interaction entre X_a et MPF, d'autre part *via* l'interaction entre X_a et Z_3 (se référer à la partie I).

Ainsi, la prise en compte des deux formes actives de Mos (X_a et X_{as}) et de ses deux mécanismes de stabilisation, incite à proposer un modèle qui représente ces interactions. La figure 5.1 est une représentation de la figure 2.3 de la partie I sous une forme de diagramme de 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 d'un réseau formé d'entités biologiques a été réalisé au moyen du logiciel CellDesigner, un éditeur de diagramme qui utilise les notations graphiques proposées par Kitano (Kitano, 2003; Funahashi *et al.*, 2003). Les protéines, sous leur divers états, sont symbolisées par un rectangle et la désignation de leur forme active est symbolisée par une courbe pointillée autour du rectangle. Le parallélépipède symbolise une ARN de la protéine Mos. La droite avec un cercle à une extrémité représente la modification post-traductionnelle. Les symboles X , X_a et X_{as} désignent respectivement la forme non-active, la forme active non-stable et la forme active non-dégradable de la protéine Mos. Les symboles $Y_{1,2,3}$ et $Z_{1,2,3}$ rendent compte des trois différents degrés de phosphorylation des protéines kinases MEK et ERK. Les indices en ordre croissant représentent respectivement les formes non-phosphorylée, phosphorylée et doublement phosphorylée. Les symboles P_x , P_y et P_z désignent respectivement les phosphatases de la protéine Mos et des espèces $Y_{2,3}$ et $Z_{2,3}$.

On remarque sur la figure 5.1 un apport original par rapport aux autres approches : les protéines kinases X_a et X_{as} sont toutes deux des activatrices de la cascade, au travers de la phosphorylation des protéines kinases $Y_{1,2}$. Cela implique qu'en absence de X_{as} , des protéines kinases X_a pourront induire la formation de Y_3 en faible concentration, et par conséquent, la production de Z_3 en faible concentration. De plus amples considérations à propos des états d'équilibre de la cascade seront discutés au chapitre suivant.

Chaque flèche symbolise une transition d'une espèce d'un état à un autre. La flèche en trait pointillé correspond à l'étape de traduction d'un ARN en protéine.

La flèche numéro 1 correspond à la synthèse de la forme non-active de la protéine Mos (X) par traduction de l'ARN messager. Le taux de production de X est constant et est désigné par le symbole k_1 . La dimension physique de ce paramètre est une vitesse de

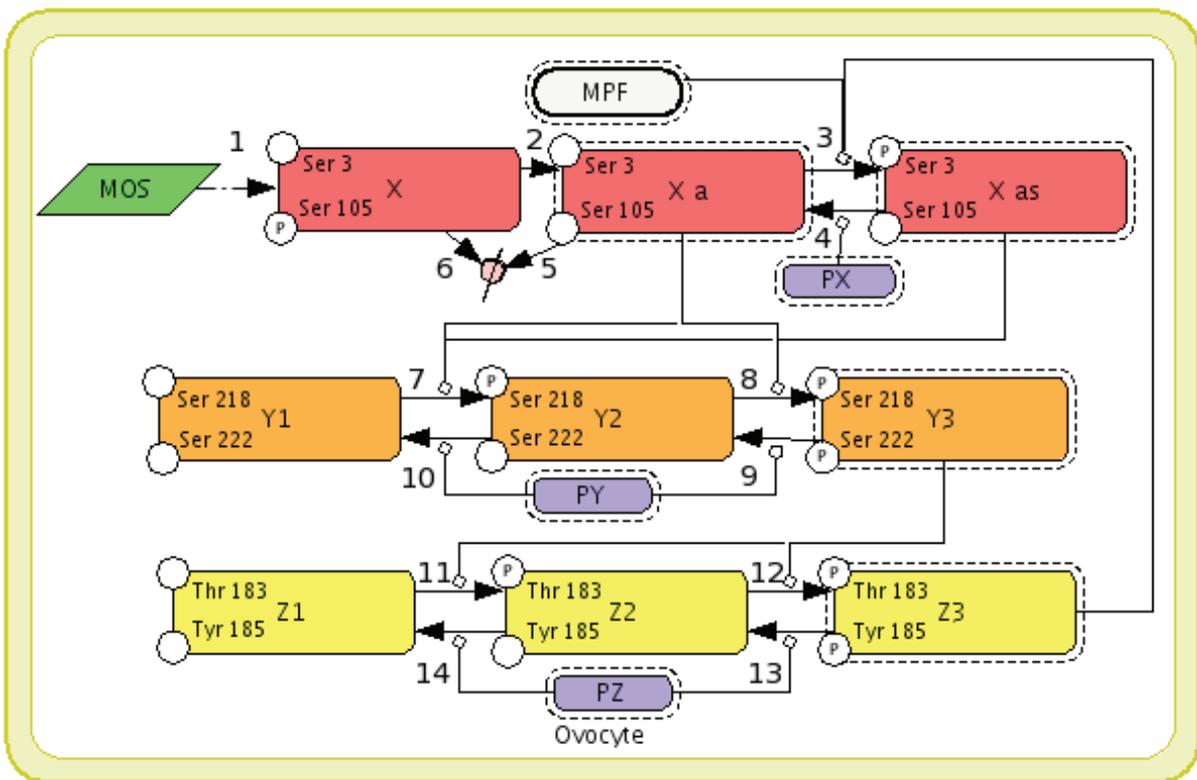


FIG. 5.1 – Représentation du réseau étudié dans CellDesigner.

concentration d'unité nMs^{-1} .

La flèche numéro 2 symbolise la production de X_a 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 . Pour ce modèle, le repliement a une cinétique estimée par le terme mathématique $k_2[X]$, où k_2 est une constante de dimension physique s^{-1} . La vitesse de synthèse de X_a est donc proportionnelle à la concentration de X .

La flèche numéro 3 rend compte de l'étape de stabilisation de la protéine Mos par la phosphorylation de son résidu sérine 3. Comme cela a été évoqué dans la partie précédente, deux entités biologiques induisent cette transition d'état : le MPF et la forme active de la protéine ERK (Z_3). La relation mathématique qui décrit le taux de synthèse de X_{as} est $[X_a](k_3[MPF] + k_4[Z_3])$. Les deux paramètres k_3 et k_4 sont des constantes qui ont la dimension physique d'une constante de spécificité ($nM^{-1}s^{-1}$). Elles désignent le taux de phosphorylation de X_a par respectivement, MPF et Z_3 . Ces constantes sont définies par la formule suivante : $\frac{k_{cat}}{K_M}$, où k_{cat} est la constante de catalyse de dimension s^{-1} et K_M la constante de Michaelis, qui mesure l'affinité entre le substrat et l'enzyme, de dimension nM . Etant donné la variation de ces deux paramètres en fonction de chaque couple enzyme/substrat, le rapport des deux valeurs est important pour comparer les spécificités des enzymes avec un substrat identique. Ainsi, le taux de production de X_{as} dépend, à la fois de la variation de $[MPF]$ et $[Z_3]$, mais aussi de l'intensité de leur interaction avec X_a . Les valeurs de k_3 et k_4 seront déterminées au chapitre 3. L'influence de ces valeurs sur le comportement du système est étudiée au chapitre 4.

La transition d'état désigné par la flèche numéro 4 décrit l'étape de déphosphorylation de X_{as} et donc la production de X_a . Le taux de déphosphorylation est défini par la relation mathématique $k_5[P_x][X_{as}]$, où k_5 est la constante de spécificité de l'interaction entre P_x et X_{as} .

Concernant les flèches 5 et 6, elles décrivent le processus de dégradation des protéines par le protéasome. La cinétique de dégradation est modélisée par les termes $k_6[X_a]$ et $k_7[X]$. Les constantes $k_{6,7}$ possèdent la dimension physique s^{-1} . Etant donné que la machinerie de dégradation est identique pour les deux espèces, et que ces dernières ont le même poids moléculaire, les valeurs attribuées aux deux paramètres sont considérées identiques.

Les étapes de phosphorylation de Y_1 et Y_2 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 X_a et X_{as} de manière indépendante. Les termes mathématiques choisis pour décrire ces interactions sont de la forme $k_8[Y_1]([X_a] + [X_{as}])$ pour la transition 7 et $k_9[Y_2]([X_a] + [X_{as}])$ transition 8. La constante de spécificité k_8 est identique pour les interactions entre Y_1 et X_a ou X_{as} . Cette hypothèse se fonde sur l'observation que les structures des protéines X_a et X_{as} possèdent le même site actif. Il en est de même pour la constante de spécificité k_9 .

Les transitions 9 et 10 sont liées à la déphosphorylation de Y_2 et Y_3 par une phosphatase symbolisée par P_y . Ce phénomène est représenté par les termes : $k_{10}[Y_3][P_y]$ et $k_{11}[Y_2][P_y]$, où $k_{10,11}$ sont les constantes de spécificité des interactions entre la phosphatase et ses substrats.

A partir de la figure 5.1, on remarque que les transitions entre les espèces $Z_{1,2,3}$ montrent une topologie d'interactions identique à celle des $Y_{1,2,3}$. La différence princi-

pale est que seule Y_3 phosphoryle $Z_{1,2}$. Les taux de synthèse associés aux relation 11 et 12, sont respectivement égaux à $k_{12}[Z_1][Y_3]$ et $k_{13}[Z_2][Y_3]$. Et les taux de déphosphorylation associés aux relation 13 et 14, sont respectivement $k_{14}[Z_3][P_z]$ et $k_{15}[Z_2][P_z]$.

Suite à ces descriptions des taux de production et de dégradation de toutes les entités biologiques qui nous intéressent, il est possible de définir un système d'équations différentielles ordinaires suivant :

$$[\dot{X}] = k_1 - (k_2[X] + k_7[X]) \quad (5.1)$$

$$[\dot{X}_a] = (k_2[X] + k_5[P_x][X_{as}]) - ([X_a](k_3[MPF] + k_4[Z_3]) + k_6[X_a]) \quad (5.2)$$

$$[\dot{X}_{as}] = [X_a](k_3[MPF] + k_4[Z_3]) - k_5[P_x][X_{as}] \quad (5.3)$$

$$[\dot{Y}_1] = k_{11}[Y_2][P_y] - k_8[Y_1]([X_a] + [X_{as}]) \quad (5.4)$$

$$[\dot{Y}_2] = (k_8[Y_1]([X_a] + [X_{as}]) + k_{10}[Y_3][P_y]) - (k_{11}[Y_2][P_y] + k_9[Y_2]([X_a] + [X_{as}]))) \quad (5.5)$$

$$[\dot{Y}_3] = k_9[Y_2]([X_a] + [X_{as}]) - k_{10}[Y_3][P_y] \quad (5.6)$$

$$[\dot{Z}_1] = k_{15}[Z_2][P_z] - k_{12}[Z_1][Y_3] \quad (5.7)$$

$$[\dot{Z}_2] = (k_{12}[Z_1][Y_3] + k_{14}[Z_3][P_z]) - (k_{13}[Z_2][Y_3] + k_{15}[Z_2][P_z]) \quad (5.8)$$

$$[\dot{Z}_3] = k_{13}[Z_2][Y_3] - k_{14}[Z_3][P_z] \quad (5.9)$$

Par conséquent, les membres de droite de chacune de ces équations sont composés de termes qui sont directement liés à une transition illustrée sur la figure 5.1.

Etant donné que ce modèle a pour contexte l'étude des ovocytes de *Xenopus laevis*, nous pouvons utiliser les contraintes sur la conservation de la concentration totale des protéines kinases MEK ($[Y_T]$) et ERK ($[Z_T]$) (Angeli *et al.*, 2004). De ce fait, deux relations mathématiques de conservation de masse sont définies :

$$[Y_1] + [Y_2] + [Y_3] = [Y_T] \quad (5.10)$$

$$[Z_1] + [Z_2] + [Z_3] = [Z_T] \quad (5.11)$$

En conséquence, il n'est plus nécessaire de résoudre les équations différentielles associées à Y_2 et Z_2 , car $[Y_2] = -([Y_1] + [Y_3])$ et $[Z_2] = -([Z_1] + [Z_3])$.

Au prochain chapitre, une paramétrisation de ce modèle est proposée afin de résoudre numériquement ce système.

Chapitre 6

Paramétrisation du modèle

L'analyse numérique du système d'équations différentielles est importante pour appréhender le comportement de la cascade. Il est nécessaire 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. Il faut également attribuer une valeur aux concentrations totales de protéines et aux valeurs initiales en concentration de chaque espèce biologique.

6.1 Valeurs des concentrations

Les valeurs de concentrations nécessaires à une simulation numérique pour notre modèle sont extraites de deux articles de référence (Huang et Ferrell, 1996; Angeli *et al.*, 2001). Le tableau 6.1 illustre ces valeurs. Les valeurs de $[Y_T]$ et $[Z_T]$ sont identiques aux valeurs utilisées par Angeli pour ses calculs. Il se base sur des mesures expérimentales antérieures à ses travaux qui ont été obtenues par Ferrell ($[Y_T] = 1200 \text{ nM}$ et $[Z_T] = 330 \text{ nM}$) (Ferrell, 1996). Les concentrations des phosphatases $P_{x,y,z}$ sont identiques au choix posé par Huang and Ferrell pour leur simulation numérique ($[P_x] = 0,3 \text{ nM}$, $[P_y] = 0,3 \text{ nM}$ et $[P_z] = 120 \text{ nM}$). Les auteurs ont fixé ces valeurs pour chaque phosphatase parmi un intervalle déterminé expérimentalement. La concentration en P_x varie de $0,06 \text{ nM}$ à $1,5 \text{ nM}$, en P_y de $0,06 \text{ nM}$ à $1,5 \text{ nM}$ et en P_z de 24 nM à 600 nM .

Nom	Valeur	Unité
$[Y_T]$	1200	nM
$[Z_T]$	300	nM
$[P_x]$	0,3	nM
$[P_y]$	0,3	nM
$[P_z]$	120	nM

TAB. 6.1 – Valeurs des concentrations totales des protéines kinases et phosphatases

6.2 Valeurs des paramètres de la cascade $Y_{1,2,3}/Z_{1,2,3}$

Concernant les paramètres associés au niveau de $Y_{1,2,3}$ et $Z_{1,2,3}$, la référence que nous avons choisie pour déterminer leurs valeurs est le matériel supplémentaire de l'article de Angeli (Angeli *et al.*, 2004). Le modèle de Angeli est caractérisé par l'utilisation d'une cinétique de phosphorylation et déphosphorylation des protéines kinases du type Michaelis-Menten. Pour sa paramétrisation, soit les valeurs sont fixées arbitrairement, soit des valeurs expérimentales sont utilisées (prises dans d'autres références (Sohaskey et Ferrell, 1999; Mansour *et al.*, 1996) ou issues d'observations personnelles). La description mathématique de la déphosphorylation de $Y_{2,3}$ et $Z_{2,3}$ dans son modèle ne fait pas intervenir la concentration en phosphatases comme le modèle de Huang et Ferrell.

Parmi les valeurs qu'il propose, qui vont être utilisées pour estimer les valeurs des constantes utilisées dans ce travail, on trouve les constantes de catalyse de phosphorylation de MEK par Mos ($k_{cat} = 0,064 \text{ s}^{-1}$) et de phosphorylation de ERK par MEK ($k_{cat} = 0,06 \text{ s}^{-1}$) qui sont déterminées expérimentalement. On obtient également une valeur choisie arbitrairement de la constante de Michaelis-Menten associée au complexe formé par Mos - MEK : $K_M = 1200 \text{ nM}$. Cette valeur élevée correspond à $[Y_T]$. Par rapport aux mesures expérimentales, Angeli propose aussi une valeur pour la constante de Michaelis-Menten du complexe MEK/ERK : $K_M = 300 \text{ nM}$. Ici, aussi on remarque que la valeur de ce complexe est identique à $[Z_T]$. De plus, il propose une valeur arbitraire du taux de déphosphorylation des $Y_{2,3}$ et $Z_{2,3}$ de 5 nMs^{-1} . Concernant la vitesse de déphosphorylation de $Y_{2,3}$, nous retenons la valeur de 5 nMs^{-1} , car les auteurs la définissent comme cohérente avec la valeur qu'ils ont obtenue expérimentalement (données non-publiées). Cependant, en ce qui concerne les $Z_{2,3}$, ils proposent une référence qui nous permet d'effectuer une estimation de la valeur du taux de déphosphorylation à partir de résultats d'expériences. En effet, dans celle-ci on trouve une estimation du nombre de groupe phosphate retiré par minute par molécule phosphorylée égale à environ $0,1 \text{ min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Sohaskey et Ferrell, 1999).

Etant donné que les valeurs des constantes de Michaelis-Menten indiquées ci-dessus sont identiques à la concentration totale de substrat, l'approximation linéaire des taux est justifiée mathématiquement. En effet, par définition, la constante K_M correspond à la valeur de concentration de substrat à laquelle la vitesse de réaction est à la moitié de sa vitesse maximale. Donc, le modèle correspond au cas où il y a une faible affinité entre les enzymes (kinases et phosphatases) et leur substrat, et les enzymes de ces couples sont saturés au maximum à moitié.

Avec les valeurs proposées ci-dessus, il est possible d'inférer la valeur de l'ensemble des paramètres $k_{8,\dots,15}$. Au préalable, l'hypothèse suivante est posée, selon laquelle $k_8 = k_9$, $k_{10} = k_{11}$, $k_{12} = k_{13}$, $k_{14} = k_{15}$. Cette hypothèse est identique à celle proposée par Angeli.

Pour déterminer les valeurs des constantes k_8 , et k_{12} qui ont comme nous l'avons déjà signalé la dimension physique d'une constante de spécificité. L'utilisation de la définition de cette dernière : $\frac{k_{cat}}{K_M}$ avec les valeurs de constantes de catalyse et de mesure d'affinité qui ont été proposée par Angeli. Ainsi, pour k_8 , on peut calculer sa valeur par la relation

Nom	Valeur	Unité
k_8, k_9	0,0000533	$nM^{-1}s^{-1}$
k_{10}, k_{11}	0,0139	$nM^{-1}s^{-1}$
k_{12}, k_{13}	0,0002	$nM^{-1}s^{-1}$
k_{14}, k_{15}	0,0000139	$nM^{-1}s^{-1}$

TAB. 6.2 – Valeurs des paramètres pour la cascade $Y_{1,2,3} / Z_{1,2,3}$

$\frac{0,064 s^{-1}}{1200 nM} = 0,0000533 nM^{-1}s^{-1}$. De même, pour k_{12} , on estime sa valeur à $\frac{0,06 s^{-1}}{300 nM} = 0,0002 nM^{-1}s^{-1}$.

Concernant les paramètres k_{10} et k_{14} , les uniques valeurs issues des expériences sont les vitesses de déphosphorylation. Pour estimer k_{14} , on utilise la valeur expérimentale de $[P_z] = 120 nM$ choisie par Huang et Ferrell, ainsi que l'estimation expérimentale du nombre de groupement phosphate retiré par minute et par molécule (proche de 0.1). Cette dernière valeur transcrite en seconde donne 0,00167 groupement phosphate retiré par seconde et par molécule. Etant donné que nous avons fixé $[P_z] = 120 nM$, on peut estimer la valeur de la constante d'unité physique $nM^{-1}s^{-1}$, qui correspond à une constante de spécificité de déphosphorylation des $Z_{2,3}$ par P_z , au moyen du rapport $\frac{0,00167 s^{-1}}{120 nM} = 0,0000139 nM^{-1}s^{-1}$. En ce qui concerne k_{10} , le nombre de groupe phosphate retiré par minute et par molécule n'est pas connu. Cependant, la mesure expérimentale du taux de déphosphorylation est estimée à $5 nMs^{-1}$. L'identification entre le terme $k_{10}[Y_3][P_y]$ (qui a bien la dimension d'une vitesse) et $5 nMs^{-1}$, avec $[P_y] = 0,3 nM$ et $[Y_3]$ qui a pour valeur maximale $1200 nM$, permet d'extraire la valeur de k_{10} par la résolution de $k_{10} = \frac{5 nMs^{-1}}{0,3 nM 1200 nM} = 0,0139 nM^{-1}s^{-1}$.

L'ensemble des valeurs sont reprises dans le tableau 6.2.

6.3 Valeurs des paramètres pour X , X_a et X_{as}

Les valeurs des paramètres pour les niveaux $Y_{1,2,3} / Z_{1,2,3}$ ayant été déterminées, il reste à attribuer une valeur aux paramètres liés au niveau de régulation de Mos.

En absence de résultats expérimentaux, les valeurs sont posées de manière arbitraire, à l'instar des travaux d'Angeli et collaborateurs. Cependant, ces dernières vont être contraintes par des hypothèses qui paraissent raisonnables (voir tableau 6.3). En effet, il a été démontré, dans la partie I, que la voie Mos - MEK - MAPK dans le cadre de l'ovocyte de *Xenopus laevis* produit une réponse aux stimuli, de type tout-ou-rien. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, les valeurs de paramètres exercent une influence notable sur le comportement du système.

La valeur de k_1 est totalement arbitraire, comme chez Angeli.

Par rapport à k_2 , cette constante est liée au repliement de la protéine X suite à la déphosphorylation du résidu sérine 105. Cette valeur n'est pas connue expérimentalement.

Nom	Valeur	Unité
k_1	0,00025	nMs^{-1}
k_2	1000	s^{-1}
k_3	0,062	$nM^{-1}s^{-1}$
k_4	0,001	$nM^{-1}s^{-1}$
k_5	0,001	$nM^{-1}s^{-1}$
k_6, k_7	0,02	s^{-1}

TAB. 6.3 – Valeurs des paramètres liés à la régulation de X , X_a et X_{as}

Une valeur arbitraire de $1000 s^{-1}$ lui est assignée. Elle correspond à un temps moyen de repliement de $1 ms$.

Pour les paramètres k_3, k_4 et k_5 , il n'y a pas d'estimation expérimentale qui a été produite, mais Angeli propose arbitrairement la valeur de $k_4 = 0,0015 nM^{-1}s^{-1}$.

Pour k_6 and k_7 , une valeur arbitraire identique a été choisie pour les deux, car l'hypothèse que le processus de dégradation par le protéasome est le même pour ces deux protéines (X et X_a) est postulée.

Concernant la concentration de MPF actif, il est connu que cette dernière varie selon l'état du cycle cellulaire. Pour les estimations des états propres du système, nous avons choisi arbitrairement la valeur à $1 nM$. La discussion à propos de son influence sur le comportement de la cascade sera réalisée au chapitre suivant.

Chapitre 7

Analyse de bifurcations

7.1 Introduction

Dès lors que le système d'équations possède des paramètres déterminés, il est possible de le résoudre numériquement. Les conditions initiales sont les suivantes : $Y_1 = 1200 \text{ nM}$, $Y_2 = Y_3 = 0 \text{ nM}$, $Z_1 = 300 \text{ nM}$, $Z_2 = Z_3 = 0 \text{ nM}$, $X = X_a = X_{as} = 0 \text{ nM}$. Cet état initial correspond à l'absence de protéine Mos et de formes mono ou doublement phosphorylée de MEK et ERK.

Il a été montré dans le chapitre I.1 que l'ensemble des processus du cycle cellulaire du Xénope satisfont à des contraintes diverses. La cellule est sensible à des stimuli externes *via* sa membrane. La réplication de l'ADN est contrôlée pour éviter des propagations d'erreurs ou inhibée pour produire des gamètes dans le cas de la méiose. Les membranes internes et externes de la cellule doivent permettre la division cellulaire tout en conservant les fonctions biologiques dans les divers compartiments tel que les mitochondries, etc. De l'ARNm et des protéines en quantités suffisantes sont produites et transmises aux cellules filles.

Les expériences menées avec l'injection de Mos constitutivement actif dans les ovocytes de Xénope, selon un gradient linéaire de concentration, démontre que la concentration de Z_3 possède seulement deux valeurs stables (Ferrell et Machleder, 1998). Cette bistabilité avérée doit être prise en compte par le modèle proposé. La résolution numérique du modèle, au moyen de CellDesigner, permet la réalisation de plusieurs simulations avec, pour chacune, une condition initiale de X_{as} qui varie de manière linéaire. Cela est illustré sur la figure 7.1, les deux plateaux indiquent les valeurs de concentrations stables de X_{as} . En conséquence de cette bistabilité au niveau d'un initiateur de la cascade, on obtient également la bistabilité de concentration de Z_3 , comme constaté lors des expériences.

Précédemment, il a été signalé que les paramètres, au niveau de la régulation de la synthèse, dégradation, activation et stabilisation de Mos, ont été fixés arbitrairement. Du point de vue mathématique, les valeurs des paramètres d'un système d'équations différentielles ordinaires influent sur le nombre de solutions et sur l'évolution temporelle des variables. Ainsi, il est utile d'étudier leur influence sur la dynamique du système d'équations qui représente notre modèle.

L'approche mathématique qui est choisie ici pour évaluer cette influence est l'analyse

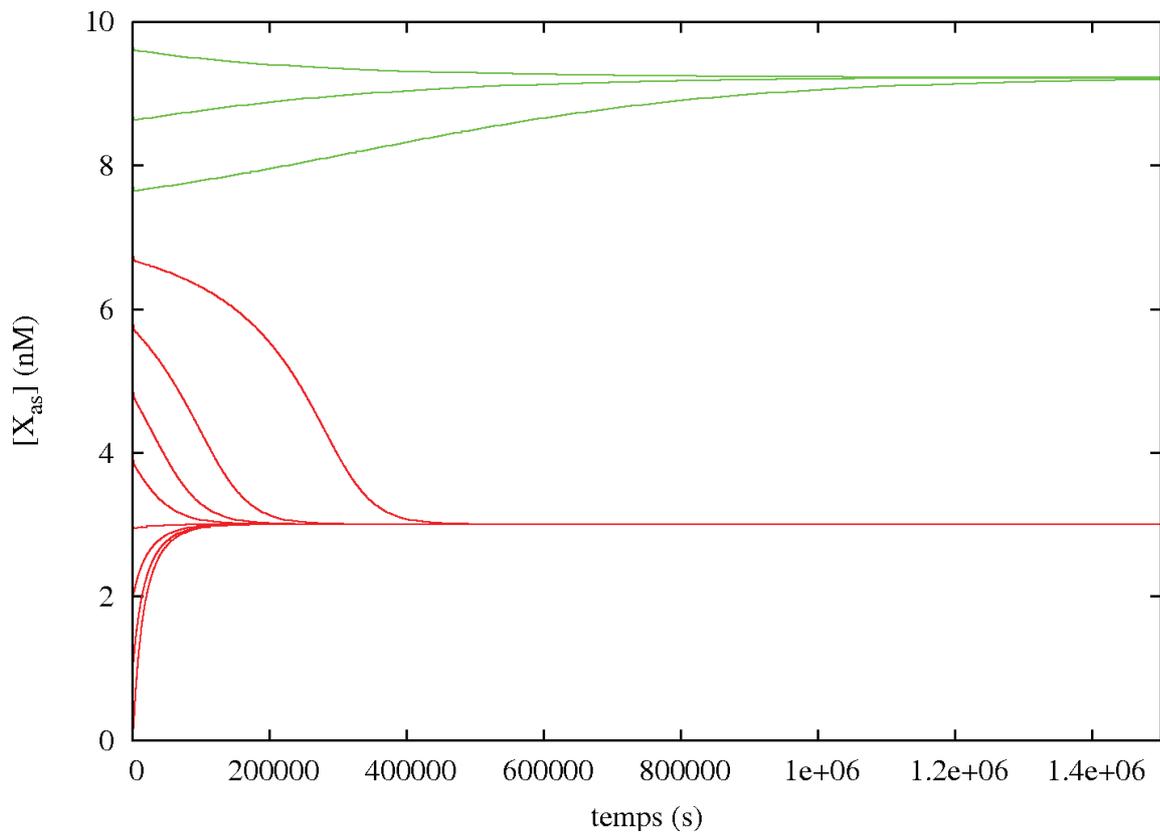


FIG. 7.1 – Évolution de la concentration de X_{as} en fonction du temps. Selon la valeur initiale de X_{as} , deux concentrations sont accessibles à l'équilibre, qui correspondent aux deux solutions stables du système. (courbe rouge : concentration stable supérieure ; courbe verte : concentration stable inférieure)

des bifurcations. Par ce moyen, une mesure de robustesse du système est obtenue lorsqu'un paramètre est perturbé. La réalisation de cette analyse est produite au moyen du logiciel XPPAUT (Ermentrout, 2002). La procédure d'analyse consiste en plusieurs étapes. Le système d'équations de notre modèle est écrit en spécifiant les paramètres et les variables avec leur valeur initiale. Dans notre cas, la concentration de MPF est définie comme un paramètre de valeur variable, avec une valeur initiale de 1 nM . Ensuite, le système d'équation est résolu afin de déterminer la valeur des concentrations stables dans le temps. Dès lors que le système est à l'équilibre, le logiciel perturbe la valeur d'un ou deux paramètres choisis par l'utilisateur et détermine les nouvelles valeurs d'équilibre pour l'ensemble des variables. La variable la plus pertinente à observer est X_{as} , car son état d'équilibre est influencé par deux facteurs : la concentration de MPF et la concentration de Z_3 .

7.2 Variation d'un paramètre et comportement du système

Chaque paramètre a été traité par l'approche décrite ci-dessus, et le comportement du système qui est associé à chaque perturbation a pu être décrit.

Pour tous ces paramètres, il y a bien un comportement bistable qui est observé. Les figures 7.2 et 7.3 regroupent les diagrammes obtenus, qui indiquent un profil semblable de comportement bistable réversible avec hystérèse. Concernant le paramètre k_2 , le système indique un comportement particulier où apparaît une transition irréversible (figure 7.4).

Concernant k_1 , la variation de cette valeur correspond à une variation du taux de synthèse de la protéine à partir de l'ARNm polyadénylé.

La figure 7.2 représente la conséquence d'une diminution ou augmentation du taux k_1 avec une valeur constante pour tous les autres paramètres. Les trois courbes de couleurs différentes symbolisent les valeurs des solutions du système lorsqu'il se trouve à l'équilibre. Les courbes rouge et verte correspondent respectivement aux valeurs stables inférieures et supérieures. La courbe noire représente les valeurs instables.

En fonction de la valeur de k_1 , il est possible de déterminer trois régions bien distinctes.

La région désignée par la lettre A, contient la courbe rouge uniquement. Cela signifie que pour cette intervalle de valeur de k_1 , le système possède seulement une solution qui est stable dans le temps. En conséquence de cette monostabilité, quelle que soit la variation de concentration en X_{as} , le système à l'équilibre indique toujours une faible concentration de X_{as} . La région désignée par la lettre C, a un comportement identique, cependant, la concentration de X_{as} à l'équilibre est élevée.

La région désignée par la lettre B est délimitée par les deux autres régions. Pour cette plage de valeur de k_1 , les trois courbes sont présentes simultanément. Cette région correspond à un comportement bistable du système car il y a pour une valeur donnée de k_1 , deux valeurs stables de X_{as} . Si la concentration de X_{as} est supérieure à sa valeur instable, le système tendra vers son état de concentration stable élevée de X_{as} . Sinon, le système tend vers la valeur stable inférieure de concentration de X_{as} . Cette bistabilité indique l'existence d'un comportement d'hystérèse. Ainsi, lorsque la valeur de k_1 augmente de la région A vers C, le système saute vers l'état supérieur quand k_1 est supérieur à la

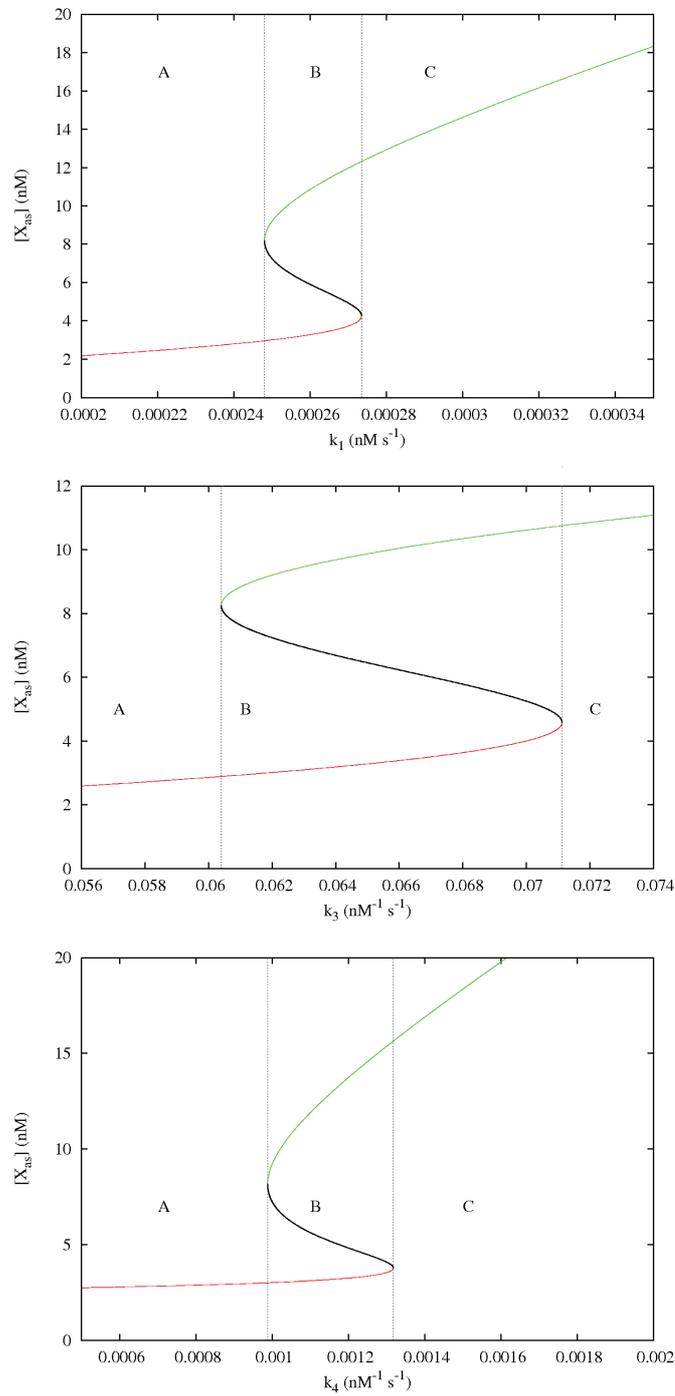


FIG. 7.2 – Valeur de $[X_{as}]$ (courbe rouge et verte : stables ; courbe noire : instable) en fonction de la variation d'un seul paramètre quand tous les autres sont fixés. (A et C : domaine de monostabilité ; B : domaine de bistabilité)

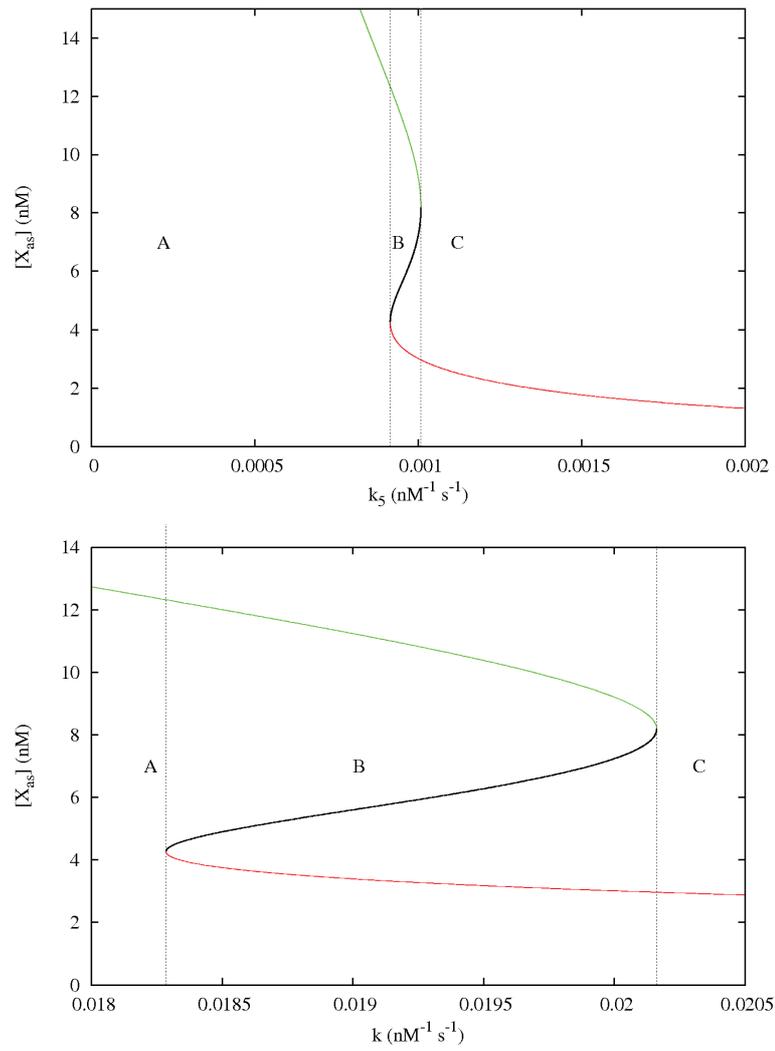


FIG. 7.3 – Valeur de $[X_{as}]$ (courbe rouge et verte : stables; courbe noire : instable) en fonction de la variation d'un seul paramètre quand tous les autres sont fixés. (A et C : domaine de monostabilité; B : domaine de bistabilité)

valeur limite entre la région B et C. A partir de cet état, si l'on diminue la valeur de k_1 , le système retourne à son état inférieur seulement quand k_1 est plus petit que la valeur limite entre la région A et B.

La variation de valeur du paramètre k_3 est illustrée par la figure 7.2. Comme pour le paramètre k_1 , un intervalle de valeur du paramètre apparait, pour lequel le système est bistable avec un phénomène d'hystérèse. Aussi, la bistabilité de la valeur de concentration de X_{as} dépend de la spécificité de l'interaction entre MPF et X_a . Si elle est inférieure ou supérieure aux valeurs comprises dans la région B, le système est monostable.

La modification de la valeur du paramètre k_4 est représentée par la figure 7.2. Comme pour le paramètre k_3 , le système présente une bistabilité avec un phénomène d'hystérèse.

La modification du taux de déphosphorylation de X_{as} est simulée par la variation de k_5 . Etant donné la relation mathématique $k_5[P_x][X_{as}]$, changer la valeur de k_5 avec une concentration constante de P_x , revient qualitativement au même que la variation de $[P_x]$ avec un k_5 fixé. Ainsi, une éventuelle inhibition de phosphatase peut être testée analytiquement par l'analyse de bifurcation. Le résultat est illustré sur la figure 7.3. Selon la valeur de k_5 , trois régions sont délimitées. La région A est zone de monostabilité avec une valeur de $[X_{as}]$ élevée. La région C est similaire, mais la valeur de $[X_{as}]$ est basse. La région B indique d'une part le comportement bistable du système, d'autre part que les transitions sont réversibles. En d'autres termes, cela signifie que l'inhibition sélective de la phosphatase de Mos induirait le système vers un état monostable avec une concentration élevée de X_{as} .

Les paramètres k_6 et k_7 partagent une valeur identique, à cause d'un processus de dégradation commun. Lors de l'analyse de bifurcation, ces deux paramètres sont identifiés par un paramètre unique, k , sur lequel la perturbation va être appliquée. Le résultat est observable sur la figure 7.3 sur laquelle on remarque une région de bistabilité avec hystérèse. Si le taux de dégradation est faible, le système est dans une région de monostabilité, désigné par le symbole A. Le comportement est identique lorsque ce taux a une valeur incluse dans la région C. Si la valeur de k est comprise dans la région B, alors le système est bistable.

Le paramètre k_2 tient compte de la vitesse de repliement de la protéine Mos suite à la déphosphorylation du résidu sérine 105. La variation de valeur de ce paramètre est illustrée par la figure 7.4. Le diagramme montre que le système suit un comportement bistable avec une transition particulière, dénommée par Guidi et Goldbeter, une transition irréversible de type II (Guidi et Goldbeter, 1997). Par définition, cela correspond au cas où la valeur d'un point limite est inaccessible pour le paramètre, car il est asymptotiquement à l'infini. En effet, la figure nous indique la présence d'un seul point limite. Quand le paramètre k_2 est plus petit que lui, le système est monostable. Quand le paramètre k_2 est plus grand que cette valeur limite, le système est bistable. Lorsque le système est dans son état de concentration élevée de X_{as} , la diminution du paramètre indique que le système change d'état et reste dans l'état de faible concentration de X_{as} .

Il existe donc une contrainte sur la valeur minimale de k_2 , lorsque tous les autres paramètres sont fixés, pour obtenir un comportement bistable.

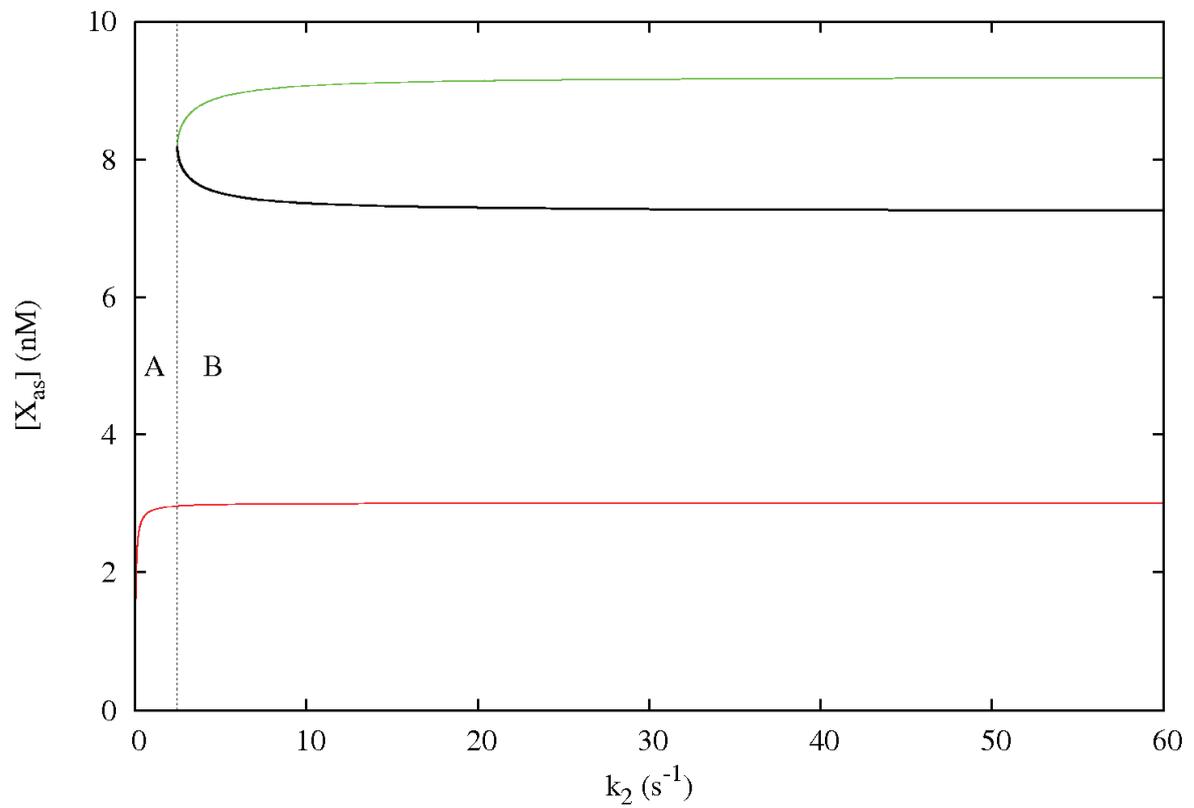


FIG. 7.4 – Valeur de $[X_{as}]$ (courbe rouge et verte : stables; courbe noire : instable) en fonction de la variation de k_2 . (A : domaine de monostabilité; B : domaine de bistabilité)

7.3 Variation des paramètres k_3 et k_4 simultanément

Les rôles des paramètres k_3 et k_4 sont importants dans la mesure où ils rendent compte respectivement de l'interaction entre MPF et X_a , et de l'interaction entre Z_3 et X_a . Leurs valeurs sont choisies arbitrairement. Au moyen de l'analyse de bifurcations, des contraintes sur leurs valeurs peuvent être obtenues, en fonction du comportement du système.

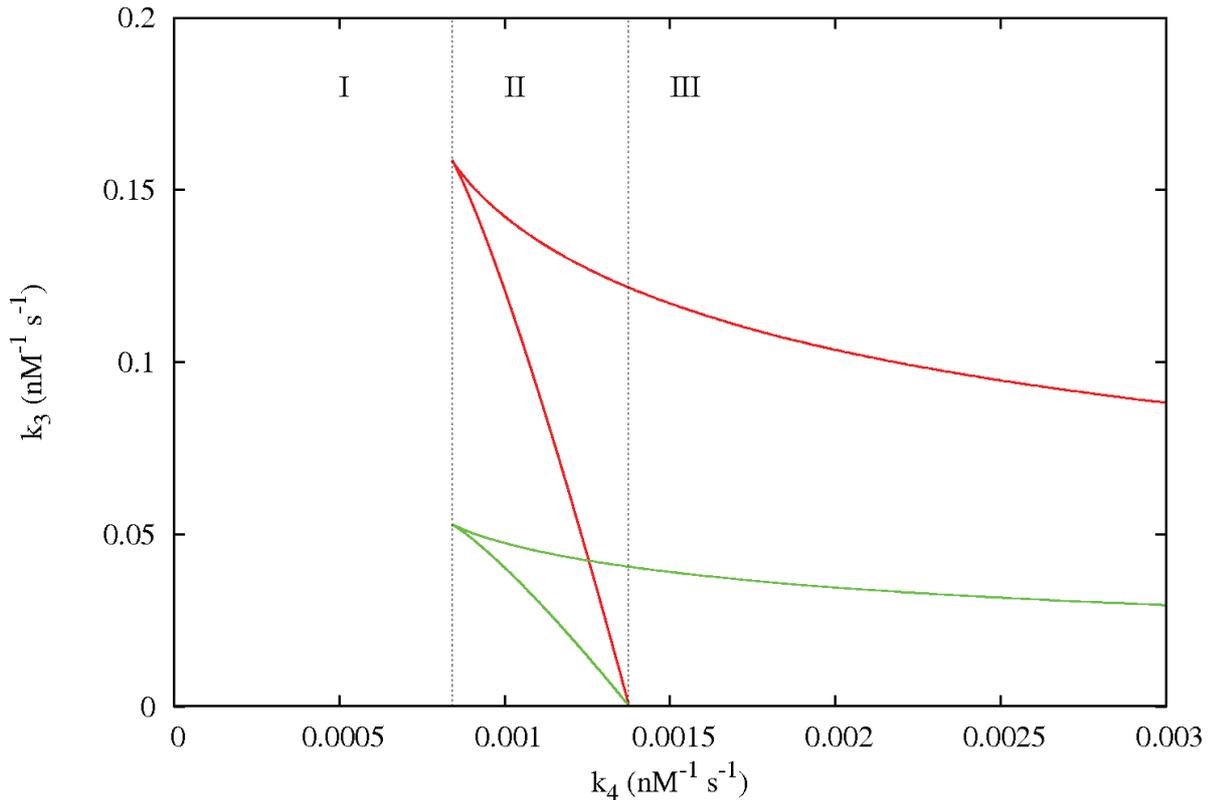


FIG. 7.5 – Variation des paramètres k_3 et k_4 pour deux valeurs de MPF : 0,5 nM (courbe rouge) et 1,5 nM (courbe verte).

La variation isolée de l'un ou l'autre paramètre (tous les autres sont fixes lors de l'analyse) produit un diagramme qualitativement identique. Les paramètres k_3 et k_4 tiennent un rôle similaire lors de la stabilisation de la protéine Mos active. L'étude de leur variation simultanée permet de déterminer leur influence respective sur le comportement du système. La figure 7.5 représente le résultat de cette double variation. Deux courbes sont associées à deux valeurs différentes et fixe de MPF. La zone à l'intérieur de ces courbes représente l'ensemble des valeurs de la paire (k_3, k_4) qui correspondent à un comportement bistable du système. En dehors de cette zone, le système est monostable.

De plus, en fonction de la valeur de k_4 , trois domaines peuvent être définis. Deux valeurs particulières de k_4 délimitent les deux frontières entre les domaines. On remarque que la valeur de ces deux points est indépendante du niveau de concentration de MPF.

Dans le domaine I, le système est monostable. Ainsi, pour avoir l'éventualité d'observer une bistabilité, il faut une valeur minimale de la constante d'interaction entre Z_3 et X_a .

Au sein du domaine II, le système a la possibilité d'être bistable de manière réversible avec un phénomène d'hystérèse. La figure 7.6 illustre la variation de $[MPF]$ et son influence sur la valeur des équilibres de X_{as} , lorsque tous les autres paramètres sont fixés. Comme pour le paramètre k_1 , trois régions sont délimitées, en fonction de la concentration de MPF. Les régions A et C indiquent que X_{as} a uniquement une valeur stable à l'équilibre. Dans la région B, X_{as} possède deux concentrations stables accessibles.

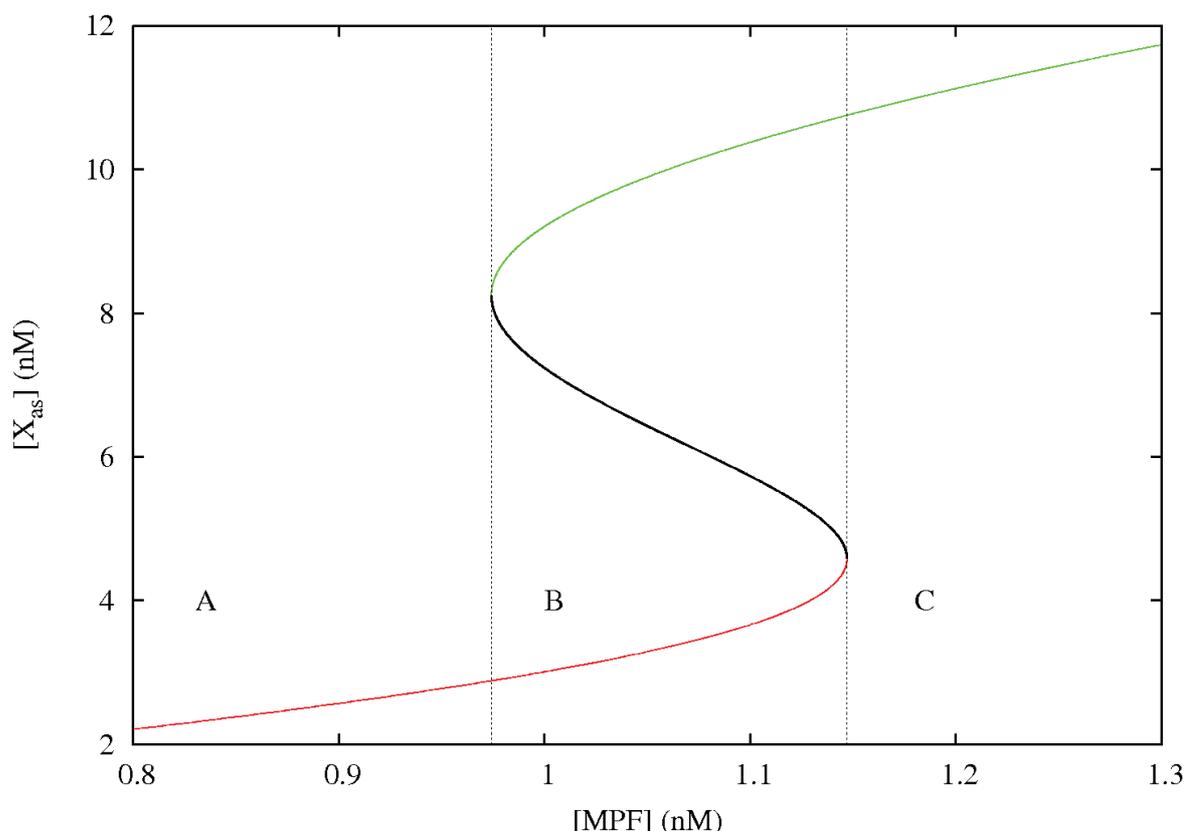


FIG. 7.6 – Variation de la concentration de X_{as} en fonction de la variation de la concentration de MPF quand tous les paramètres sont fixés. Les solutions stables sont indiquées par les courbes rouge et verte. Les solutions instables sont indiquées par la courbe noire. Les paramètres k_3 et k_4 sont déterminés au sein du domaine II.

Lorsque la paire de paramètres (k_3, k_4) est limitée au domaine III, le système suit un comportement bistable particulier. En effet, il n'y a pas deux transitions possibles comme dans le cas du domaine II, mais une seule transition irréversible de type I selon la nomenclature proposée par Guidi et Goldbeter (Guidi et Goldbeter, 1997). La figure 7.7 illustre la variation de $[MPF]$ et son influence sur les concentrations à l'équilibre de X_{as} . Deux régions, A et B, sont déterminées par rapport à une valeur particulière de $[MPF]$. Pour les valeurs de concentration de MPF comprise dans la région A, le système

est bistable. Quand la concentration de MPF est incluse dans la région B, le système est monostable. On parle de transition irréversible, car si l'on se trouve dans la région B et que la valeur de $[MPF]$ est diminuée jusqu'à zéro, alors le système reste dans son état d'équilibre élevé (la courbe verte).

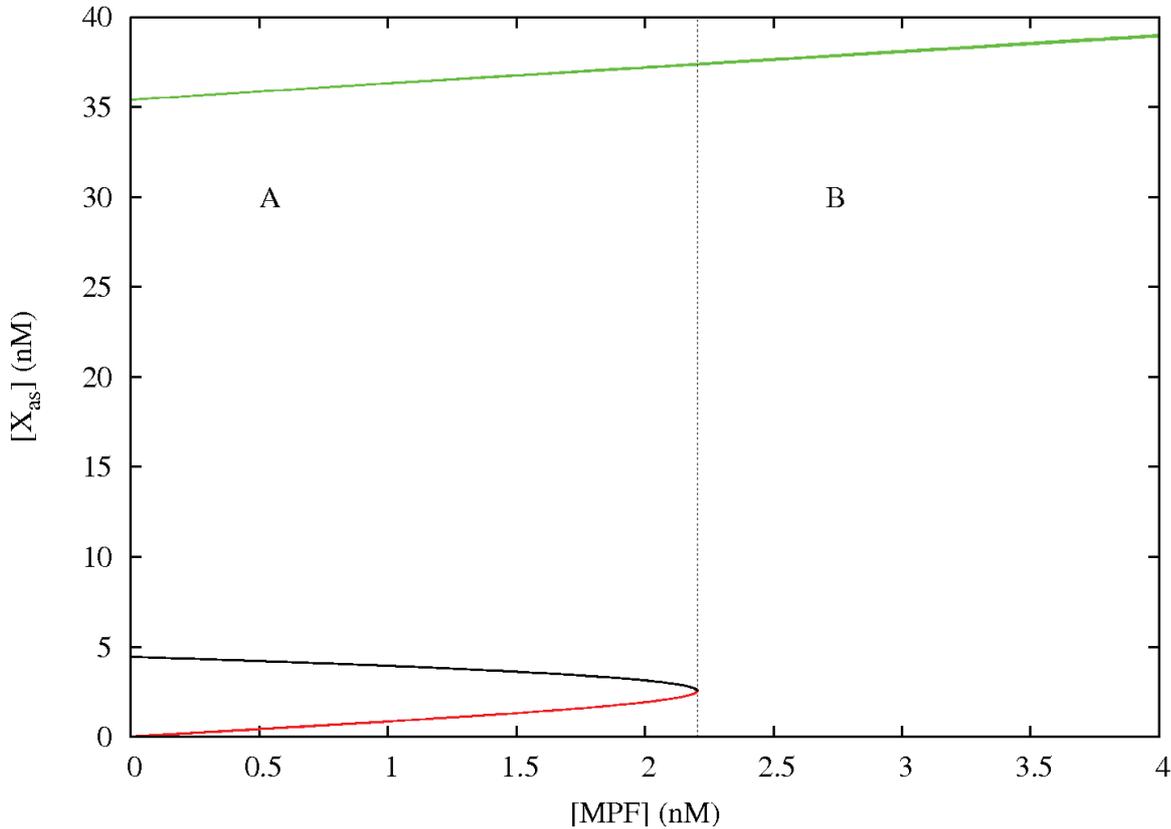


FIG. 7.7 – Variation de la concentration de X_{as} en fonction de la variation de la concentration de MPF quand tous les paramètres sont fixes. Les solutions stables sont indiquées par les courbes rouge et verte. Les solutions instables sont indiquées par la courbe noire. Les paramètres k_3 et k_4 sont déterminés au sein du domaine III.

Les valeurs de k_3 et k_4 sont donc importantes pour rendre compte de la bistabilité du système. Les résultats expérimentaux de stimulation de la cascade, uniquement avec une variation de $[MPF]$, peuvent discriminer entre un type de bistabilité avec transition réversible et un type de bistabilité avec une transition irréversible. A partir de ce constat, les valeurs de paramètres sont limitées par la contrainte d'être incluses soit dans le domaine II, soit dans le domaine III de la figure 7.5.

Pour illustrer l'importance plus grande de la valeur du paramètre k_4 sur le comportement du système, par rapport à k_3 , il convient de rappeler que nous avons dans l'expression du taux de stabilisation, la relation $k_3[MPF][X_a]$. La figure 7.5 représente deux courbes relatives à une concentration fixe de $[MPF]$, avec variation de k_3 et k_4 . Ainsi, pour une valeur fixée de k_3 , la variation de $[MPF]$ simultanée à la variation du paramètre k_4 pro-

duit la figure 7.8. La discussion est identique à celle de la figure 7.5, en ce qui concerne les valeurs de k_4 .

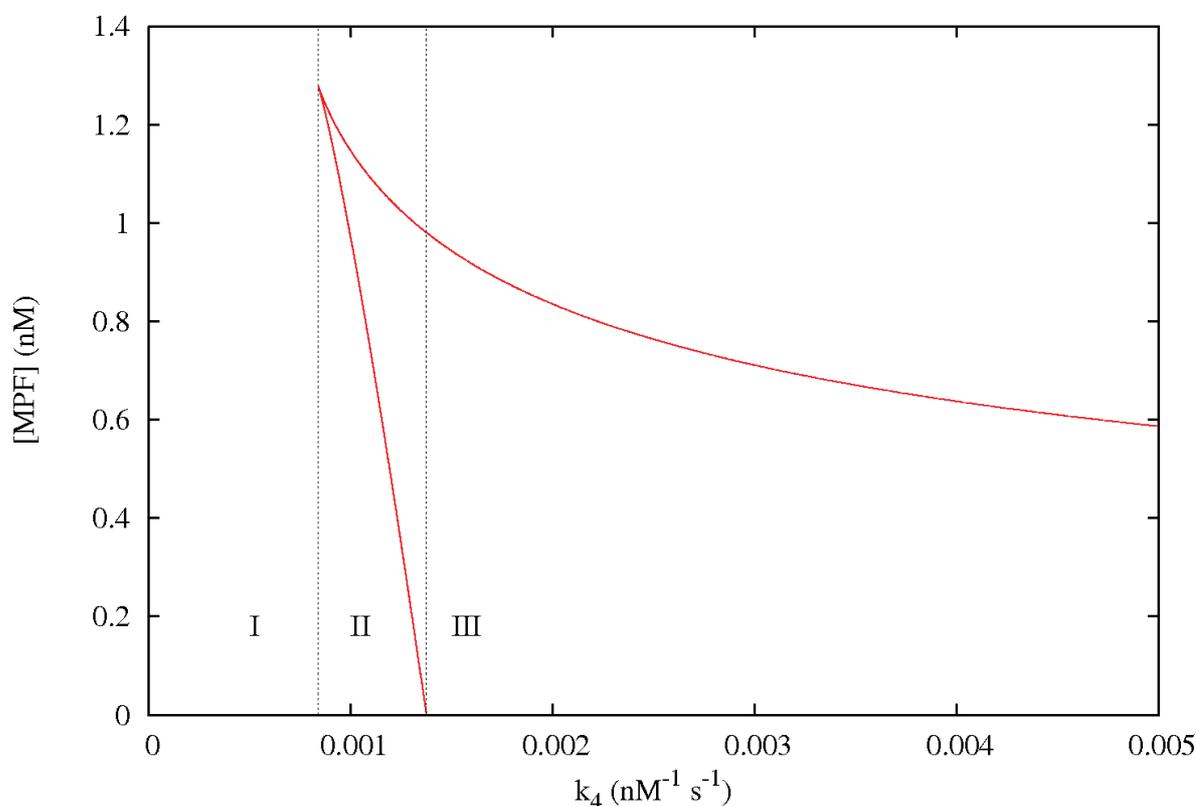


FIG. 7.8 – Diagramme de bifurcation pour analyser l'influence de la variation du paramètre k_4 , pour une valeur fixée de tous les autres paramètres, sur le comportement du système lorsque $[MPF]$ varie.

Cependant, on remarque que si la concentration en MPF est supérieure à la valeur de concentration correspondant au sommet de la courbe, le système est monostable quelles que soient les valeurs de k_4 . En conséquence, pour tout l'ensemble de paramètres dont les valeurs sont fixes, il y a une valeur particulière de $[MPF]$ au-delà de laquelle, un seul équilibre stable des concentrations des variables est obtenu.

Chapitre 8

Conclusion

Le modèle que nous avons proposé tient compte des divers états de la protéine Mos et permet d'analyser théoriquement la production de la protéine Mos de manière indépendante de MAPK.

Le complexe MPF est intégré dans le modèle pour analyser son rôle dans l'accumulation de la forme active de la protéine Mos. Cette interaction est de nature identique à l'interaction entre MAPK et la forme active instable de Mos. L'analyse de leur apport respectif sur le comportement du système est réalisable.

Étant donné les valeurs arbitraires des paramètres utilisés au niveau de la régulation de la protéine Mos, l'usage de l'analyse de bifurcation permet de déterminer l'influence de chaque paramètre sur le comportement du système d'équations qui définit le modèle. Ainsi, la variation de l'ensemble des paramètres un à un nous a indiqué que le système est bistable avec hystérèse.

La variation simultanée des paramètres k_3 et k_4 nous indique que la valeur de la constante k_4 est déterminante pour discriminer trois comportements du système. Selon un ordre croissant de valeur de k_4 , celui-ci se comporte de manière soit monostable, soit bistable avec réversibilité ou bistable avec une transition irréversible de type I. De ce fait, l'intensité de la boucle de rétro-contrôle positif, qui définit l'influence de MAPK sur l'accumulation de Mos actif, est importante sur le comportement de la voie de signalisation. En deçà d'une valeur critique de k_4 , le système est monostable quelque soit la valeur de concentration en MPF.

Accumulation de la forme active de
Mos : aspects *in vivo* et *in silico*

Chapitre 9

Introduction

Pour construire notre modèle proposé dans la partie II, nous avons posé comme hypothèse que Mos actif s'accumule en absence de MEK et MAPK *via* l'action de MPF. Nous avons vu que la valeur d'équilibre de X_{as} dépend de la valeur de concentration en MPF. De plus, le comportement du système varie en fonction de la valeur de la constante k_4 qui représente la spécificité de l'interaction entre X_a et MAPK.

L'étude expérimentale de cette hypothèse sur la voie Mos - MEK - MAPK dans l'ovocyte du Xénope est principalement réalisée au moyen d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. L'U0126 est préparé dans une solution de DMSO et utilisé avec une concentration finale de $50 \mu\text{M}$. Cette concentration inhibe totalement l'activation des MAPK. Dans ces conditions, la reprise de méiose a été stimulée soit par l'ajout de progestérone, soit par l'injection de cytoplasme d'un ovocyte mature.

Au moyen du modèle proposé dans la section précédente, il est possible d'estimer l'évolution temporelle de Mos en fonction de sa stabilisation par MPF et/ou MAPK. L'analyse par bifurcation du modèle nous a permis de connaître les points d'équilibre de Mos actif et stable (X_{as}), en fonction de la variation des paramètres. Il est possible de simuler l'absence de MAPK suite à l'action de U0126, par l'annulation du paramètre k_4 (cela est équivalent à l'annulation simultanée des paramètres $k_{8,9}$ et/ou $k_{12,13}$). La résolution du système d'équations procure les valeurs de Mos actif.

L'évolution temporelle de Mos est donc obtenue par deux moyens distincts. La comparaison de ces résultats provenant d'une source expérimentale et d'une source théorique permettra de tester la validité et les limites du modèle établi, ainsi que de progresser dans la compréhension de la dynamique de la voie Mos - MAPK lors de la reprise de la méiose.

Chapitre 10

Évolution temporelle de Mos *in vivo*

L'ensemble des expériences illustrées ci-après a été réalisé en collaboration avec Rémy Beaujois, doctorant en biologie au sein du laboratoire de Régulation des Signaux de Division de l'Université de Lille1.

10.1 Méthode d'analyse par immuno-empreinte (western blot)

La méthode de transfert de protéine appelé western blot permet de vérifier la présence d'une protéine dans l'échantillon étudié. Un gel de type SDS-PAGE est polymérisé entre deux plaques de verre. Ce gel de séparation, permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une série de puits sont créés dans sa partie supérieure pour recevoir les solutions contenant les protéines d'intérêt.

Dans notre étude, l'équivalent du tiers du volume d'un ovocyte est dans un puit. Les protéines sont ensuite placées sous l'influence d'une différence de potentiel et migrent dans des gels SDS-PAGE modifié de type 12,5% ou 15% en fonction de la nature des protéines étudiées. Ensuite, un courant est appliqué pour transférer les protéines des gels sur une membrane de nitrocellulose. L'efficacité du transfert est validée par une coloration au rouge Ponceau. La membrane est immergée et saturée avec du lait écrémé en solution tampon pendant 45 minutes. Puis en fonction de la protéine étudiée, divers anticorps sont appliqués selon un protocole adapté pour être détecté au moyen d'une technique de chemoluminescence (voir annexe C).

10.2 Stimulation des ovocytes par la progestérone

Au moyen de l'analyse par western blot, la concentration de Mos a été évaluée en présence (courbe noire de la figure 10.1) et en absence de MAPK (courbe rouge de la figure 10.1).

L'accumulation de Mos peut-être évaluée par des mesures de densité optique (D. O.). Deux types d'analyses ont été réalisés pour distinguer les états de synthèse de Mos :

1. l'analyse par western blot d'une population de dix ovocytes par puits, dont la proportion d'ovocytes arrêté en phase M sur le nombre d'ovocytes bloquée en phase G2 varie ;
2. l'analyse par western blot cellule par cellule.

Les membranes sur lesquelles les protéines ont migré sont scannées et l'évaluation semi-quantitative de la protéine Mos est réalisée au moyen de mesures de densité optique estimé par le logiciel d'analyse "Quantity One V4.21 1-D gel" de BioRad. L'étape de quantification de Mos nécessite la définition d'une aire rectangulaire autour de la protéine Mos pour chaque puits dans le gel. Une analyse de l'absorbance optique de ces surfaces rectangulaires est réalisée pour obtenir une valeur d'intensité qui correspond à la D. O. de la protéine Mos. Le logiciel est capable de distinguer entre le signal lié à la présence de protéine et le bruit mêlé au sein d'une surface unique. Il détermine également une valeur de bruit global qui est estimée à l'extérieur des surfaces sélectionnées. La valeur de D. O. d'ovocytes non-traitées a été choisie pour définir le niveau de bruit global du gel. Dans ces ovocytes, la protéine Mos est indétectable et la surface analysée ne contient que du bruit. Plusieurs étapes de traitement de données sont appliquées :

1. pour chaque surface analysée la valeur de l'intensité du bruit local est soustraite ;
2. ensuite la valeur du bruit global du gel est soustraite pour chaque surface ;
3. on normalise une valeur de D. O. de Mos à 1 à partir d'un échantillon standard qui sert de contrôle positif (p. e. des ovocytes contrôles stimulés par la progestérone).

Le processus a été appliqué également pour caractériser l'intensité de D. O. de MAPK/ERK. Étant donné que les MAPK ne sont pas dégradées durant la maturation ovocytaire, nous avons choisi cette protéine comme contrôle de charge pour estimer la variation semi-quantitative de Mos.

Aucune différence significative n'a été observée entre les niveaux de Mos dans les ovocytes traités à l'U0126 et les ovocytes contrôles traitées avec le solvant DMSO (voir figure 10.1, valeur moyenne estimée à partir de six femelles). Les niveaux de Mos sont respectivement de $1 \pm 0,22$ et $0,83 \pm 0,27$ fois le niveau de Mos dans les ovocytes contrôles stimulés par la progestérone. Cette analyse effectuée sur une population a été également réalisée cellule par cellule (figure 10.2). Ainsi, pour chaque cellule bloquée en métaphase II, il y a synthèse et accumulation de Mos avec une légère variation du signal de D. O. mesuré d'une cellule à une autre. Cette figure indique une corrélation entre le niveau de Mos actif et l'état de la cycline B2. Ce résultat expérimental justifie notre choix d'une valeur plus élevée pour le paramètre k_3 par rapport à k_4 . En effet, l'influence de l'interaction entre X_a et MAPK est plus faible au regard de l'interaction X_a et MPF.

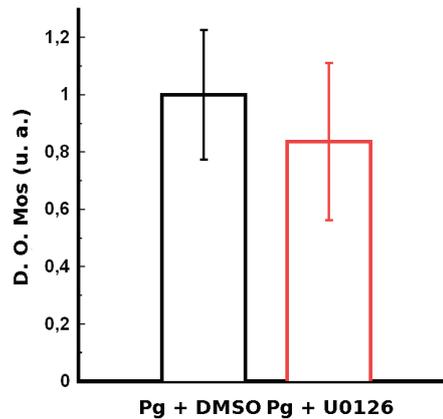


FIG. 10.1 – Valeurs normalisées de concentration de Mos par immuno-empreinte, au temps GVBD dans les ovocytes contrôles traités avec du DMSO (0,1 %, en noir) et dans des ovocytes traités à l’U0126 (50 μ M, en rouge). Les niveaux de Mos sont, respectivement, de $1 \pm 0,22$ et $0,83 \pm 0,27$.

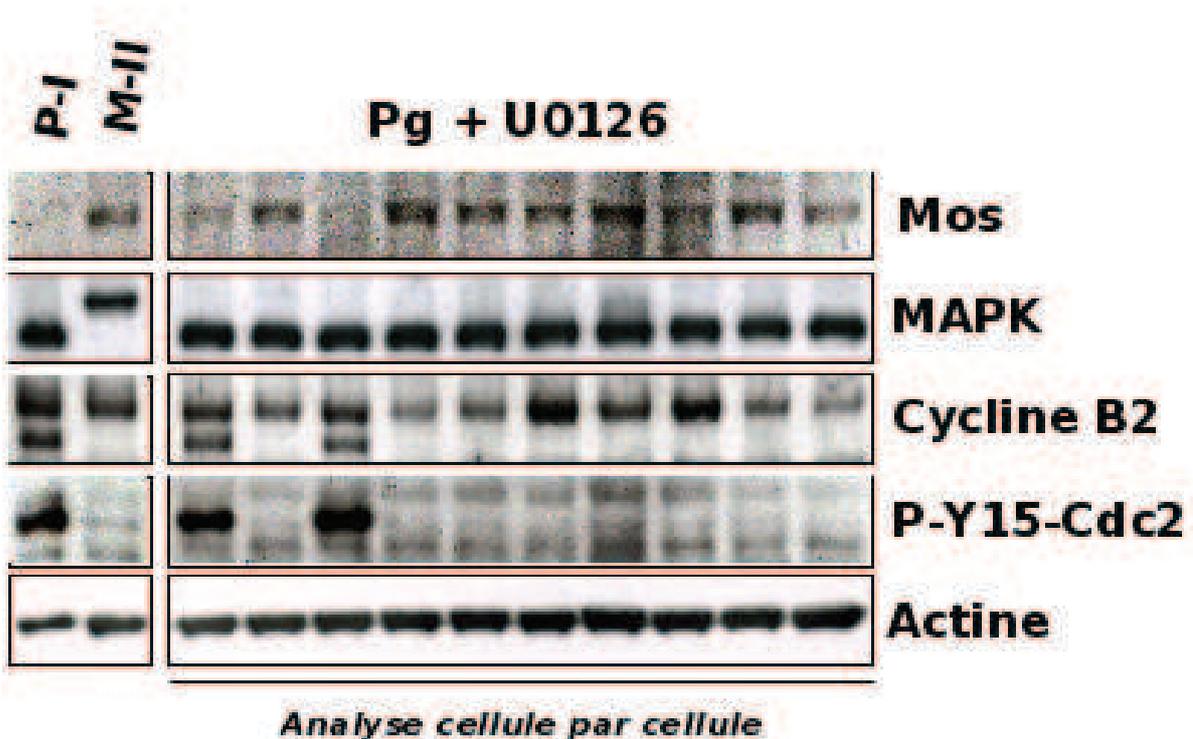


FIG. 10.2 – Analyse cellule par cellule par western blot des états de Mos, MAPK (ERK2), la cycline B2, la Phospho-Tyrosine 15 cdc2 et l’Actine. Les ovocytes ont été sélectionnés à la GVBD. Une corrélation entre l’état actif de Mos et l’état phosphorylé de la cycline B2 est mis en évidence. P-I : ovocytes arrêtés en Prophase I ; M-II : ovocytes arrêtés en Métaphase II ; Pg la progestérone.

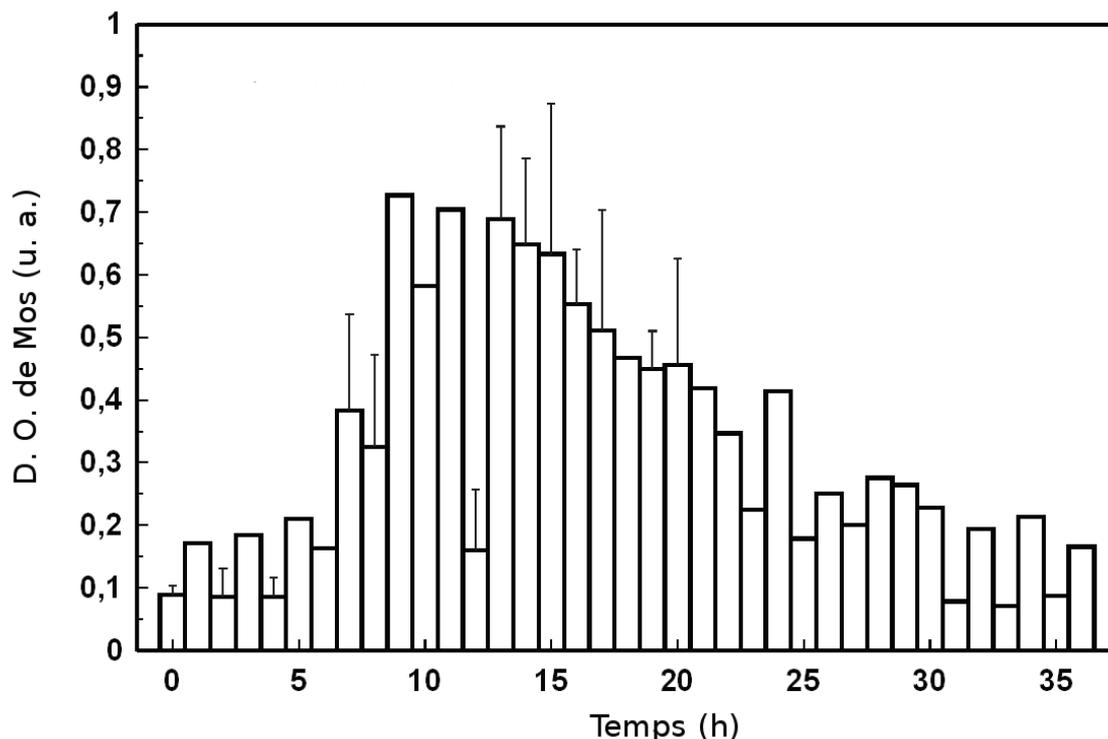


FIG. 10.3 – Accumulation de Mos actif suivant la stimulation par la progestérone en présence d’U0126. Les valeurs affichées correspondent à la moyenne d’analyse sur trois femelles différentes.

Étant donné que l’accumulation de la protéine Mos active est observée en absence d’activité MAPK, cela indique que si MAPK tient un rôle lors de cette accumulation, ce dernier n’est pas l’initiateur principale de la cascade. Ces données sont également en accord avec des travaux précédents qui indiquent la présence de Mos dans des conditions d’inhibition de MAPK telles que l’incubation en geldanamycine (Fisher *et al.*, 2000) ou le traitement par de l’U0126 suivi d’une stimulation par de l’insuline *via* une voie Ras-dépendante (Baert *et al.*, 2003). La figure 10.3 montre le profil d’accumulation de Mos suivant la stimulation par la progestérone des ovocytes en présence d’U0126. À une concentration de $50 \mu\text{M}$ d’U0126, l’activité du MPF est maximale au moment de la rupture de l’enveloppe nucléaire (GVBD) et s’effondre une à deux heures après la GVBD. Lors de nos expériences, quand les ovocytes sont stimulés par la progestérone en présence d’U0126, la cycline B2 est observée sous forme phosphorylée à $0,718 \pm 0,046$ unité GVBD₅₀, ce qui atteste de l’activation de MPF. L’absence de détection de cycline B2, à cause de sa dégradation, a été observée à environ $1,14 \pm 0,04$ GVBD₅₀. L’accumulation de Mos a été estimée par immuno-empreinte et les ovocytes stimulés par la progestérone en absence d’U0126 ont été sélectionnés au temps correspondant à GVBD pour servir de contrôle afin d’obtenir des résultats de mesure semi-quantitatives et une normalisation. La courbe

indique un pic unique avec des versants asymétriques. Les données collectées pour chaque femelle montrent une variation importante dans laquelle apparaissent deux pics d'accumulation de Mos : le premier est à $0,728 \pm 0,09$ GVBD₅₀, pratiquement simultanément à la détection de MPF sous forme active, tandis que le second pic est observé à $1,039 \pm 0,085$ GVBD₅₀, 4,5 heures plus tard.

10.3 Stimulation des ovocytes par injection de MPF

L'observation de l'accumulation de Mos en présence d'U0126 dans les ovocytes stimulés par la progestérone indique la présence d'un autre initiateur que la protéine MAPK.

L'importance de la présence de MPF pour accumuler la protéine Mos sous une forme active non-dégradable se base sur des résultats expérimentaux (Nishizawa *et al.*, 1993 ; Castro *et al.*, 2001 ; Sellier *et al.*, 2006). Nous avons vu que l'inhibition de la synthèse de Mos par micro-injection d'oligonucléotides antisens de type morpholine ne bloque pas la GVBD induite par la progestérone et l'activation de MPF (Dupré *et al.*, 2002 ; Baert *et al.*, 2003 ; Bodart *et al.*, 2005). Cela indique que MPF peut être activé indépendamment de la présence de Mos et MAPK. De plus, lorsque les ovocytes sont stimulés par la progestérone après micro-injection soit d'anticorps anti-Cdk1, soit d'un dominant négatif de Cdk1 ou de Cip1 (un inhibiteur de Cdk), Mos actif ne s'accumule pas (Nebreda *et al.*, 1995 ; Frank-Vaillant *et al.*, 1999). Aussi, l'activation de Cdk1 se déroule avant la synthèse et la stabilisation de Mos.

De ce fait, la technique de stimulation des ovocytes immatures par injection de cytoplasme provenant d'ovocytes arrêtés en métaphase II (décrite et utilisée par Masui et Markert) est utilisée pour produire la maturation ovocytaire en absence de stimulation hormonale. Cette technique consiste à prélever, au moyen d'une micropipette d'injection, du cytoplasme d'un ovocyte donneur bloqué en phase M, et de l'introduire dans un ovocyte en phase G2. L'évolution temporelle d'accumulation de Mos a été évaluée dans ces conditions (figure 10.4). L'injection de cytoplasme contenant du MPF actif a été réalisé en présence ou non d'U0126. Le moment nommé GVBD₅₀ (le temps auquel 50% des ovocytes traités montre une GVBD) est atteint environ 4 heures après injection dans les ovocytes contrôles alors que la durée est environ le double pour les ovocytes traités à l'U0126. L'activation de MPF, indiquée par une variation de poids moléculaire de la cycline B2, est observée respectivement 2 à 3 heures après injection dans les contrôles et les ovocytes traités à l'U0126.

L'activité de MPF est maintenue dans les ovocytes contrôles tandis que elle décroît 7-8 heures après injection, ce qui est vérifié par la rephosphorylation de la cycline B2 et la décroissance de niveau de cycline B2 (figure 10.5). Ces observations sont en accord avec la perte d'activité de MPF dans les ovocytes traités par l'U0126 stimulées par la progestérone et s'explique par le rôle de MAPK dans la synthèse de cycline B et la régulation positive que MAPK exerce sur le MPF (Palmer *et al.*, 1998 ; Abrieu *et al.*, 2001).

L'absence d'activité en MAPK dans les ovocytes traités par l'U0126 a été confirmée par l'absence de phosphorylation de son substrat Rsk1 en plus de la présence d'ERK non-phosphorylé lors de l'estimation par western blot. Des niveaux de Mos non négligeables sont détectés en absence d'activité MAPK, même si ce niveau est inférieur à celui qui

est mesuré dans les ovocytes contrôles (figure 10.4 et 10.5). Les ovocytes non traités par U0126 receveurs de cytoplasme montrent un niveau de Mos légèrement inférieur à 4 h post-traitement et un peu supérieur à 6 heures par rapport au niveau de Mos correspondant aux ovocytes stimulés par la progestérone au moment de la GVBD (respectivement $0,80 \pm 0,12$ et $1,17 \pm 0,11$). La valeur moyenne de niveau de Mos, pour les ovocytes ayant reçu du cytoplasme contenant du MPF en présence d'U0126, est inférieure à la valeur associée aux ovocytes stimulés par la progestérone mesurée au temps GVBD (la valeur maximale atteinte est de $0,69 \pm 0,13$ à 7 heures). Donc, MPF tient le rôle d'une source fiable pour l'accumulation et la maintenance de Mos, de manière indépendante de MAPK.

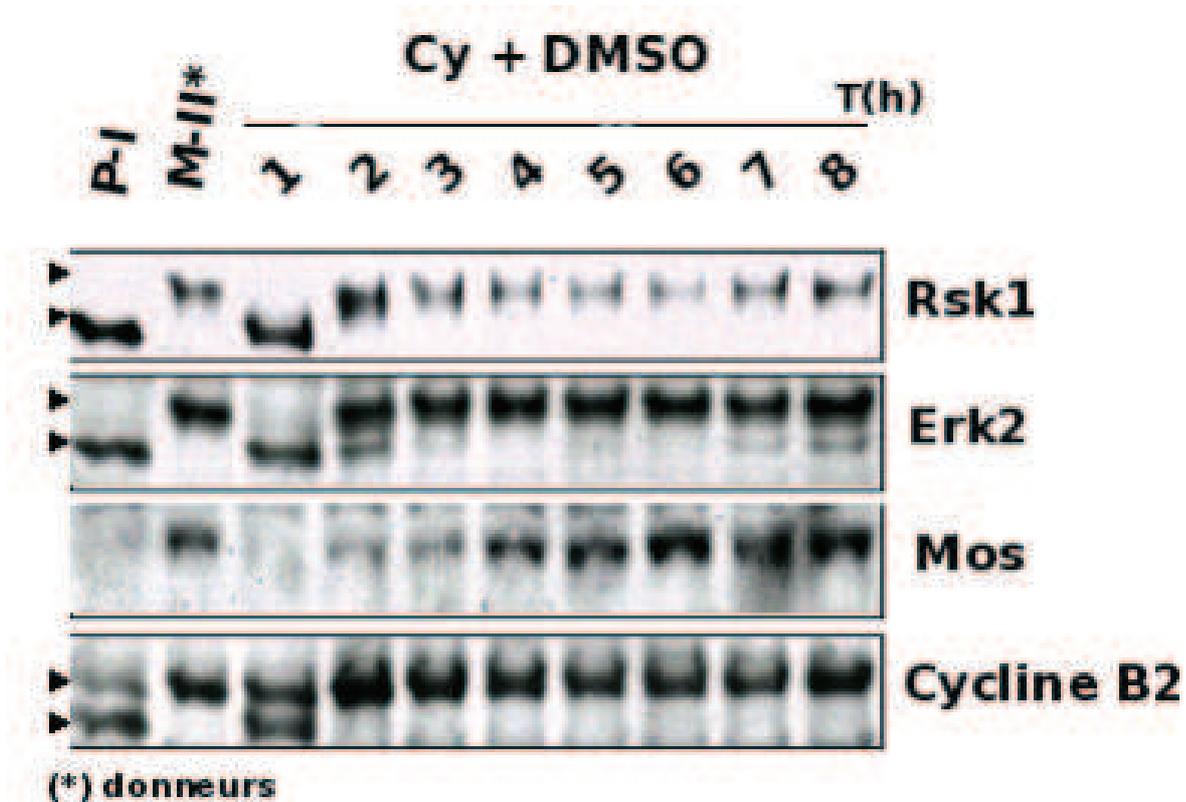


FIG. 10.4 – Dynamique d'accumulation de Mos en absence d'U0126. Les ovocytes sont injectés par du cytoplasme contenant du MPF issu d'ovocytes bloqués en Métaphase II. L'analyse par western blot des ovocytes a permis d'observer les niveaux de Mos, ERK2, Rsk1 et de cycline B2. Ni ERK ni Rsk ne sont détectés avec un état actif; P-I : ovocytes arrêtés en Prophase I; M-II : ovocytes arrêtés en Métaphase II; Cy le cytoplasme contenant du MPF actif issu d'ovocytes en MII.

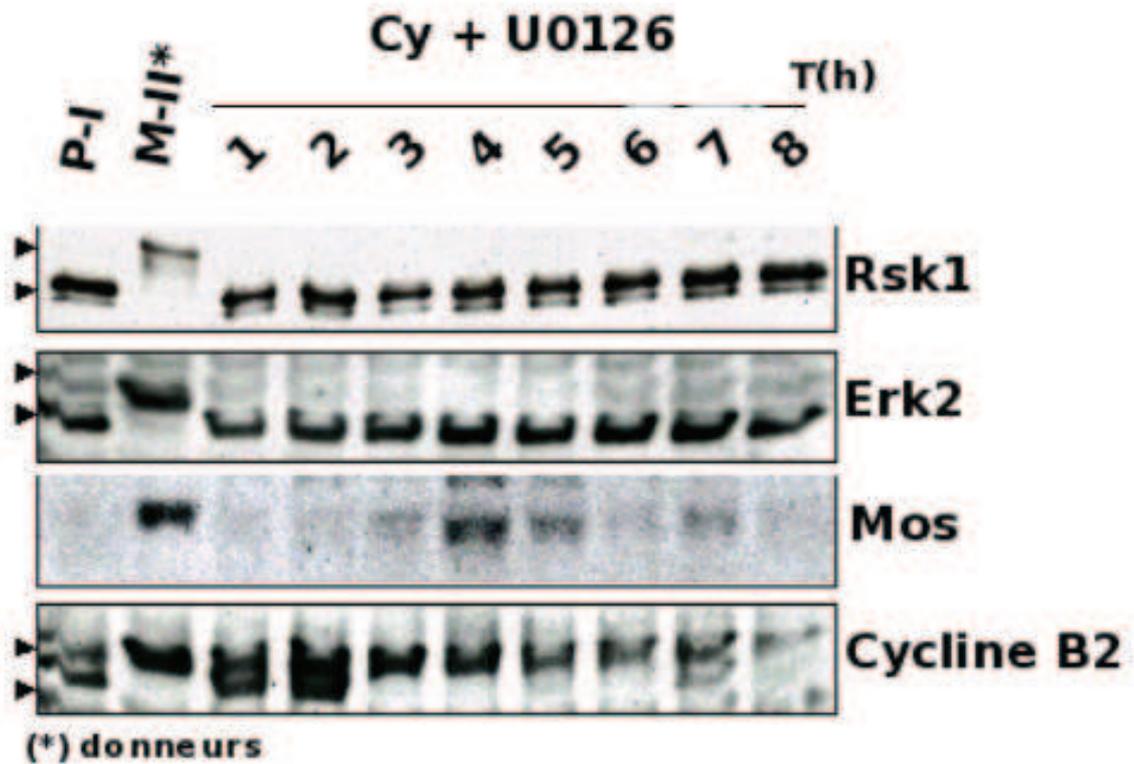


FIG. 10.5 – Dynamique d’accumulation de Mos en absence de MAPK. Mos s’accumule de manière transitoire après l’injection de 50 nl de cytoplasme d’ovocytes arrêtés en Métaphase II (donneurs). La reprise méiotique se déroule en présence d’U0126 et en absence de progestérone. L’analyse par western blot des ovocytes, permet d’observer les niveaux de Mos, ERK2, Rsk1 et de cycline B2. Ni ERK ni Rsk ne sont détectés avec un état actif; P-I : ovocytes arrêtés en Prophase I; M-II : ovocytes arrêtés en Métaphase II; Cy le cytoplasme contenant du MPF actif issu d’ovocytes en MII.

Chapitre 11

Évolution temporelle de Mos *in silico*

11.1 Introduction

La variation temporelle de la concentration théorique de Mos est obtenue par la résolution du système d'équations au moyen du logiciel "SBML ODE Solver" implémenté dans CellDesigner. Pour représenter l'absence de MAPK dans les ovocytes traités par U0126, le paramètre k_4 est égal à zéro lors de la simulation.

L'exposé du modèle en partie II nous indique que la valeur de MPF y est considéré comme un paramètre dont la valeur peut varier. En effet, il n'apparaît pas d'équation d'évolution temporelle de la concentration en MPF dans le système d'équations. Des modèles de régulation de MPF ont été proposés pour l'étude des oscillations de MPF chez la levure, dans des embryons ou des extraits d'ovocytes de Xénope (Novak et Tyson, 1993). Néanmoins, de nombreux paramètres ne sont pas déterminés expérimentalement. De plus, les protéines régulatrices de l'activation du MPF prises en compte dans ces modèles n'indiquent pas explicitement l'influence de MAPK sur leur propre régulation. Par exemple, Rsk interagit avec Myt1 pour former un complexe qui favorise la formation de MPF et également, MAPK interagit avec Cdc25 pour induire la formation de MPF. Il faudrait développer un modèle de régulation de MPF qui permet de discriminer la dynamique de formation de MPF actif en absence et en présence de MAPK.

Ainsi, l'analyse de bifurcations avec la variation du paramètre MPF couplé à la perturbation du paramètre k_4 nous a indiqué trois comportements du système en fonction de la valeur de k_4 (voir figure 7.8 de la partie II). La résolution du système d'équations avec $k_4 = 0$ correspond au cas où le système suit un comportement monostable. Cela signifie que pour toute variation de MPF, il y a une et une seule concentration stable dans le temps de concentration de Mos actif (X_a et X_{as}). Il est intéressant de noter que l'annulation du paramètre k_4 n'est pas nécessaire pour obtenir un comportement du système monostable. En effet, la figure 7.8 indique que ce comportement existe pour un intervalle de valeurs de k_4 qui définit la zone I.

Au moyen du logiciel CellDesigner, il est possible de définir une courbe arbitraire assignée à MPF pour représenter la variation de sa concentration et ainsi calculer les

valeurs de concentration en Mos actif.

11.2 Stimulation *in silico* par la progestérone

Pour estimer la valeur numérique de Mos actif, lorsque les ovocytes sont traités avec U0126, une fonction arbitraire qui représente le pic de MPF selon une courbe au profil du type asymétrique (voir équation 11.1) est assignée au paramètre variable MPF dans CellDesigner.

La figure 11.1 montre la valeur numérique de concentration totale de Mos actif ($X_a + X_{as}$) en fonction du temps. La fonction qui décrit l'évolution de MPF produit un sommet vers 10 heures, en accord avec le délai qui est observable entre la stimulation en progestérone des récepteurs et l'activation de MPF. Il y a un décalage d'environ 4 heures entre le pic de MPF et le pic de Mos. Cela correspond aux observations expérimentales indiquées figure 10.3 avec une valeur moyenne obtenue à partir de trois femelles.

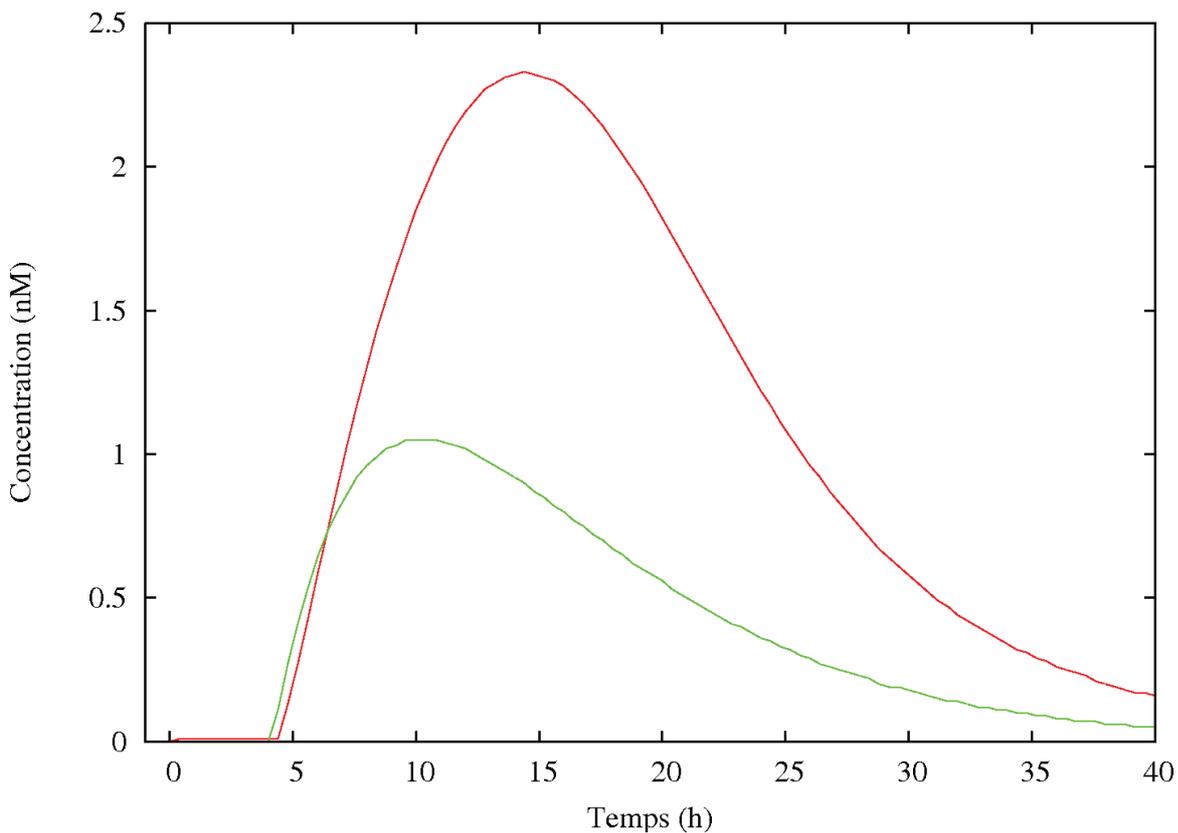


FIG. 11.1 – Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$ (courbe rouge). La courbe verte indique les valeurs théoriques assignées au MPF.

11.3 Stimulation *in silico* par injection de MPF

La synthèse protéique qui est représentée par la transition numero 1 de notre modèle indique un flux de concentration constant (symbolisé par le paramètre k_1). Nous avons émis l'hypothèse que le taux de production de la protéine Mos à partir d'ARNm est identique pour les ovocytes stimulés par la progestérone et les ovocytes injectés par MPF. En absence de stimulation par la progestérone, le MPF injecté déclenche la synthèse protéique. En effet, l'injection de MPF produit l'activation de Aurora-A (Ma *et al.*, 2003); ce dernier phosphoryle CPEB, ce qui provoque la polyadénylation de l'ARNm de Mos et sa traduction (Mendez *et al.*, 2000).

Dans le cas où $k_4 = 0$, les expériences menées sur des ovocytes traités avec de l'U0126 indiquent un profil asymétrique de croissance et de décroissance de cycline B2. La croissance est plus rapide que la décroissance. De ce fait, une courbe asymétrique de profil similaire à une distribution de type χ^2 a été développée pour représenter la production et la dégradation de MPF. La fonction possède la forme :

$$a t e^{-\frac{t}{b}} \quad (11.1)$$

où a et b sont des paramètres fixes.

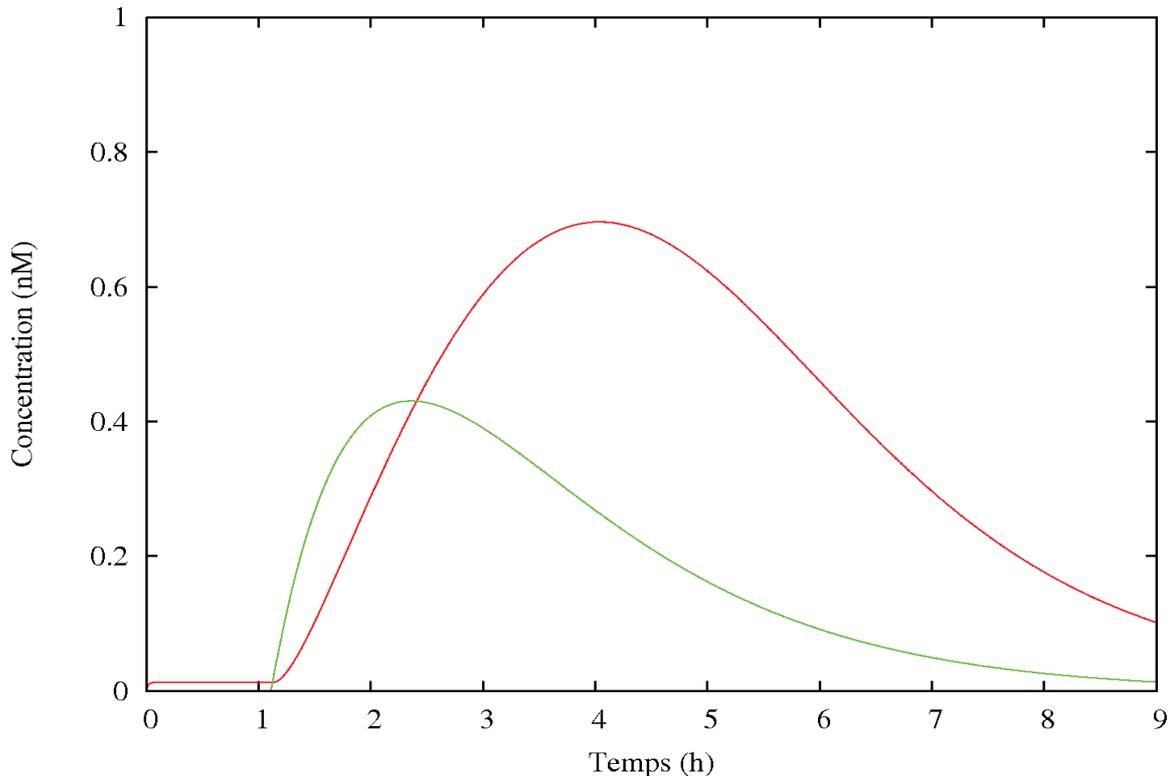


FIG. 11.2 – Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$ (courbe rouge). La courbe verte indique les valeurs théoriques assignées au MPF.

La simulation de l'évolution temporelle de Mos actif avec ce profil de MPF est illustrée sur la figure 11.2. Le délai théorique entre le pic de MPF et le pic de Mos actif est de 1,5 heures.

En absence d'U0126, l'injection de MPF produit une croissance de MPF suivie d'un plateau. L'application de la fonction précédente avec un plateau lorsqu'elle atteint sa valeur maximale produit du Mos actif avec un profil illustré sur la figure 11.3. La présence constante de MPF conserve le Mos actif à un niveau constant également.

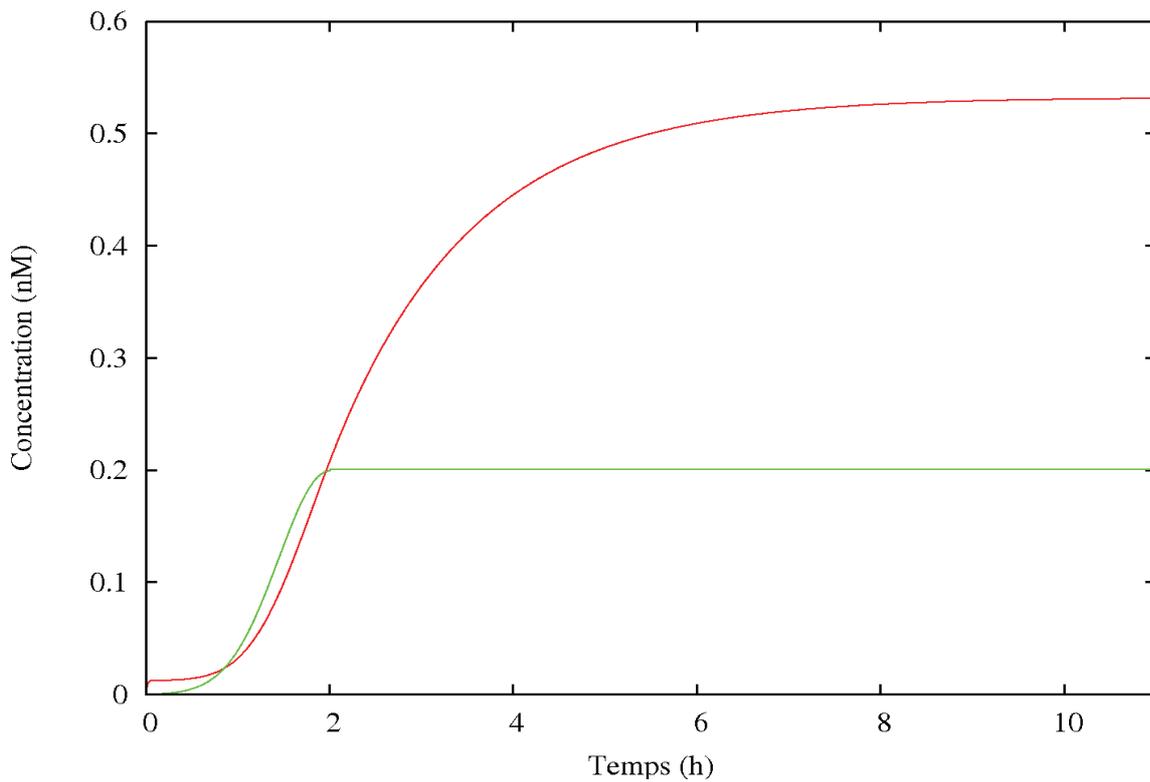


FIG. 11.3 – Variation temporelle de la concentration théorique en $X_a + X_{as}$ (courbe rouge). La courbe verte indique les valeurs théoriques assignées à MPF.

Chapitre 12

La voie Mos - MEK - MAPK : simulation et expériences

Confronter des résultats expérimentaux à des valeurs théoriques permet de s'assurer de l'accord entre les résultats issus de la simulation avec le modèle et les observations. Si la simulation avec le modèle produit des résultats identiques à ceux de l'expérience, il est possible de modifier les conditions initiales ou les valeurs des paramètres et ainsi proposer des résultats théoriques qui pourront être validés ultérieurement par des expériences. De plus, des résultats expérimentaux inédits induisent la modification du modèle.

L'approche semi-quantitative par western blot ne fournit pas directement des valeurs absolues de concentration des espèces étudiées. Cependant, la densité optique (D. O.) obtenue par l'analyse des membranes est proportionnelle aux concentrations. De ce fait, la valeur théorique de concentration peut-être superposée aux profils expérimentaux. Le facteur qui relie concentration et D. O. sera ajusté pour chaque série d'expérience.

12.1 Accumulation de Mos après stimulation hormonale en absence de rétro-contrôle exercé par MAPK

La figure 12.1 illustre l'accord entre les valeurs théoriques de Mos actif et les valeurs de Mos actif accumulée en absence de MAPK. Il s'agit d'une valeur moyenne des valeurs de D. O. obtenues à partir d'expériences avec trois femelles différentes. La fonction d'assignation de valeur de MPF est déterminée de manière à ce que l'évolution de Mos actif théorique correspond à la valeur moyenne expérimentale. La forme de la fonction est identique à l'équation 11.1, cependant le temps initial de la fonction est décalé pour que la valeur assignée à MPF soit maximale à 10,5 heures. Pour obtenir cette fonction, il faut remplacer le facteur t par $(t - 15000)$ dans l'équation 11.1 (le temps de simulation est en seconde). Les valeurs des paramètres a et b sont respectivement de $1,3 \times 10^{-4} nMs^{-1}$ et $22\ 000 s$.

Le profil des valeurs moyennes de D. O. en Mos actif est qualitativement identique au profil des valeurs théoriques issues de la simulation. Pour améliorer la corrélation entre la théorie et les expériences, il est nécessaire de déterminer expérimentalement l'évolution

temporelle de la concentration en MPF pour affiner sa représentation théorique.

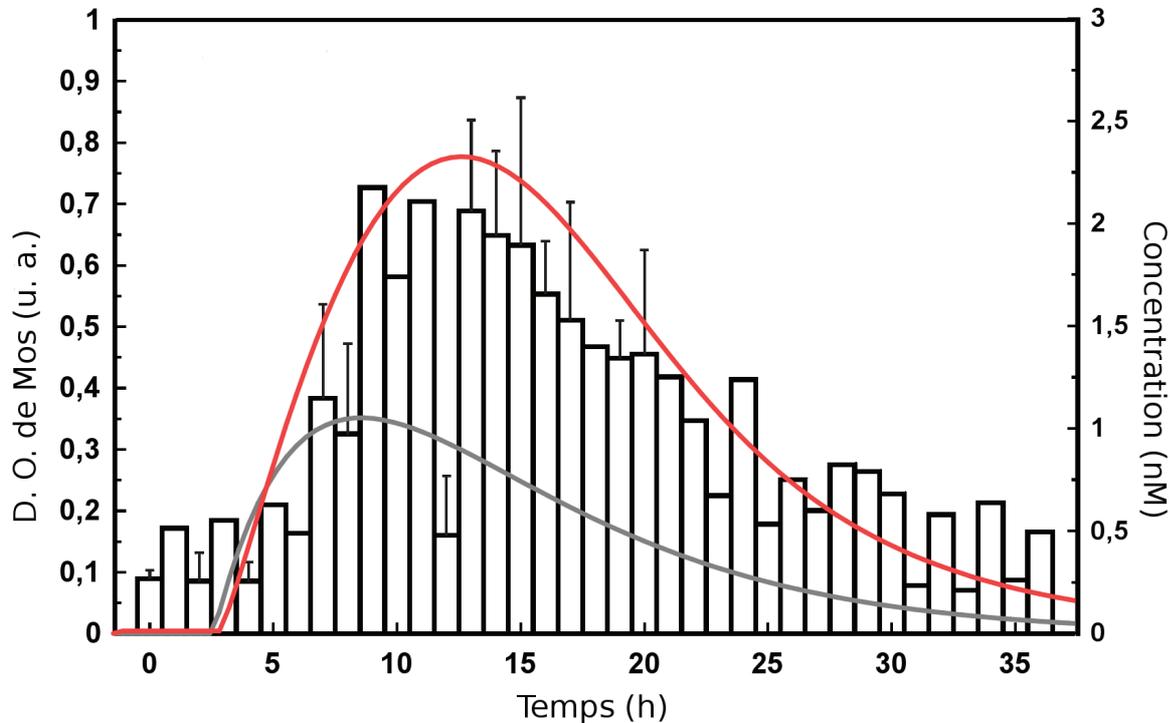


FIG. 12.1 – Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentales de Mos actif. La courbe rouge indique la concentration en $X_a + X_{as}$ et la courbe verte indique les valeurs théoriques assignées à MPF.

Il a été remarqué la présence de deux pics de valeurs de Mos accumulés lors de chaque expérience avec une seule femelle. Ces deux pics n'apparaissent pas au même moment lorsque l'on compare les trois femelles, cependant le temps intermédiaire entre les deux sommets est identique pour les trois expériences. Le premier pic est à $0,728 \pm 0,09$ GVBD₅₀, cette valeur correspond à un pic de la kinase histone H1 (un indice de l'activité de Cdc2) sensible au cycloheximide (Haccard *et al.*, 1995). Le second pic est observé à $1,039 \pm 0,085$ GVBD₅₀, 4,5 heures plus tard. En absence d'U0126, la stimulation par la progestérone des ovocytes produit une activation de Cdc25 et la présence d'activité de l'histone H1 à partir de GVBD₅₀ (Haccard *et al.*, 1995). La fonction arbitraire d'assignation de valeur de MPF, avec une valeur maximale, ne permet pas de rendre compte de la décroissance abrupte de Mos et sa reprise pour former les deux pics observés. Mais si l'on change la fonction d'assignation de manière à obtenir deux sommets de MPF, il est possible de trouver un comportement similaire au profil de la protéine Mos accumulée (voir figure 12.2).

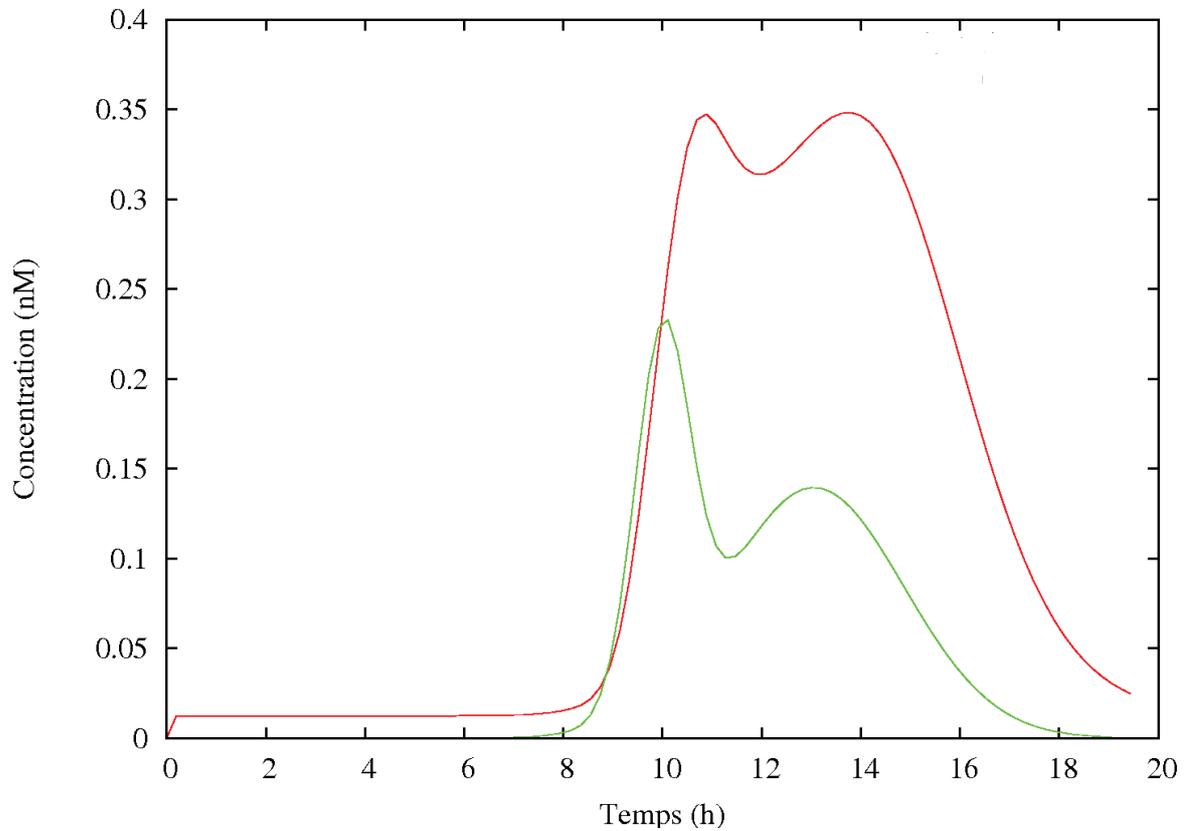


FIG. 12.2 – Variation théorique de MPF selon un profil de deux gaussiennes successives (courbe verte) et son influence sur la valeur théorique de $[X_a] + [X_{as}]$ (courbe rouge).

12.2 Accumulation de Mos après stimulation de la boucle d'auto-amplification du MPF

Les figures 12.3 et 12.4 illustrent les variations théoriques et expérimentales de Mos actif lorsque les ovocytes sont stimulés par injection de MPF, respectivement en présence ou absence d'U0126. La fonction d'assignation de MPF est choisie pour être en accord temporel avec l'observation de l'accumulation de cycline B2 phosphorylée.

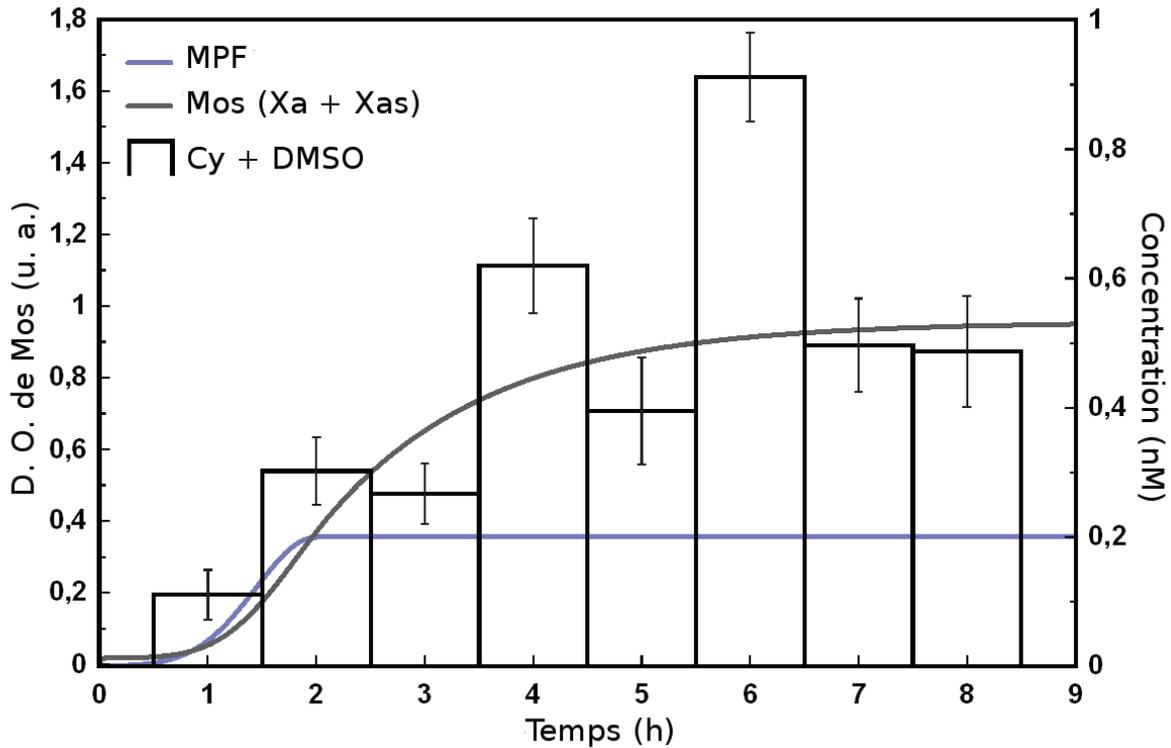


FIG. 12.3 – Superposition des courbes issues des expériences *in vivo* et *in silico* dans le cas d’une injection de MPF (absence de stimulation par la progestérone et présence de la boucle de rétro-contrôle positif).

En absence d’U0126, la fonction d’assignation de MPF est croissante et atteint un plateau en suivant le profil expérimental obtenu pour les cyclines B2 phosphorylées. Ces dernières sont détectées à partir de la seconde heure post-injection et leur quantité atteint rapidement un niveau maximal définissant la valeur du plateau. Ainsi, une fonction avec une croissance rapide du type d’une gaussienne, couplée avec un plateau lorsque la valeur maximale est atteinte est définie et implémentée dans CellDesigner. Pour obtenir un plateau, une fonction-événement est définie. Il s’agit de changer l’assignation de valeur de MPF lorsque le temps de simulation est supérieur ou égal au temps auquel la gaussienne atteint son maximum. Ainsi, après 7200 secondes de simulation la valeur de MPF est constante. La fonction gaussienne choisie est la suivante :

$$\frac{1}{2\sqrt{2\pi}} e^{-\left(\frac{(t-7200)^2}{2 \times 10^6}\right)} \quad (12.1)$$

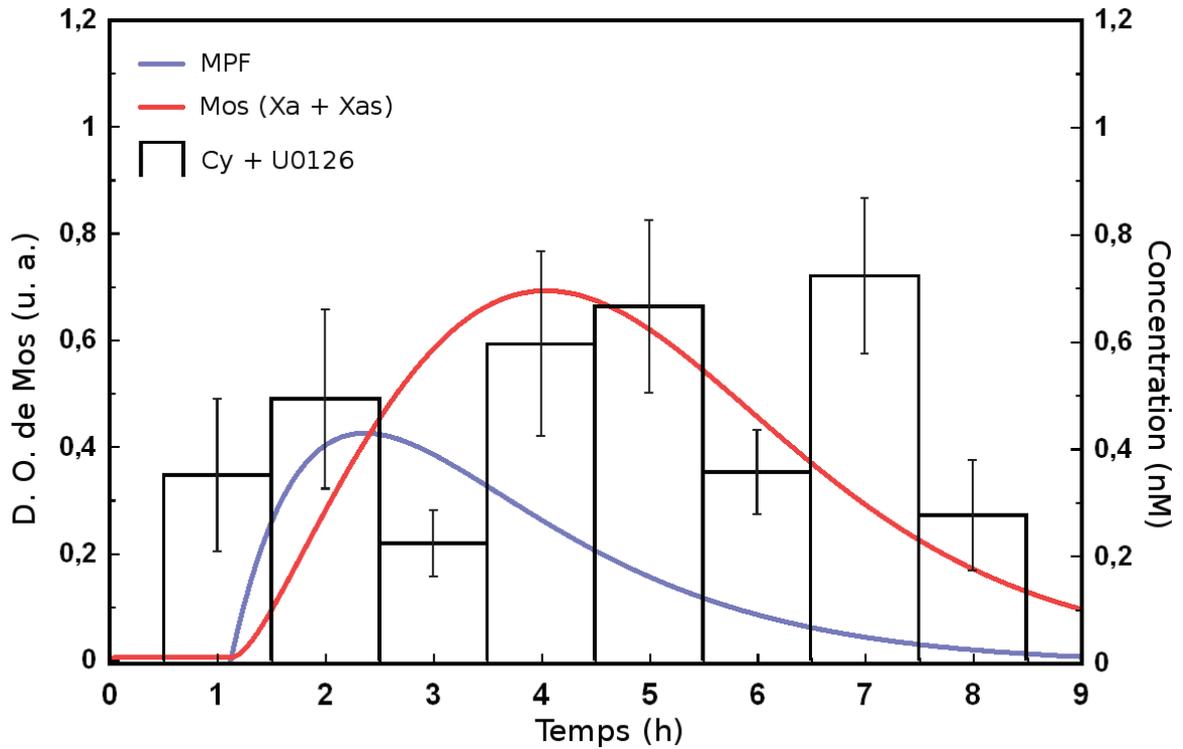


FIG. 12.4 – Superposition des courbes issues des expériences *in vivo* et *in silico* dans le cas où l’injection de MPF se déroule en présence d’U0126 et en absence de progestérone.

En présence d’U0126, la stimulation par injection de MPF indique une accumulation de cycline B2 phosphorylée de manière asymétrique. La fonction d’assignation de MPF est donc basée sur l’équation 11.1 où t est remplacée par $(t - 6500)$, $a = 3,9 \times 10^{-4} \text{ nMs}^{-1}$ et $b = 4200 \text{ s}$.

12.3 Discussion

Chaque valeur de D.O. de Mos illustrée sur les figures 12.4 et 12.1 correspond à une valeur moyenne calculée sur trois femelles.

Une fluctuation de la valeur de D.O. est identifiable avec deux cycles de croissance et décroissance d’environ 3 heures sur la figure 12.4. Pour une seule femelle, la figure 10.5 illustre une analyse par western blot et indique une accumulation de Mos actif jusqu’à sa valeur maximale vers 4 heures suivie par une décroissance. La cycline B2 est active à partir de 3 heures et après 4 heures son activité décroît. Ainsi, le choix arbitraire de la fonction asymétrique pour assigner une valeur théorique à MPF est justifié, si l’on considère que le niveau de cycline B2 phosphorylée est corrélée à la concentration de complexe MPF actif dont elle constitue un des membres du dimère.

La figure 12.1 indique une augmentation de la valeur de D. O. de Mos pour atteindre son maximum vers 15 heures après stimulation par la progestérone en présence d’U0126,

suivie d'une décroissance de la valeur de D. O. jusqu'à l'extinction du signal. Une variation abrupte de D.O. a lieu environ 12 heures après stimulation. Le bon accord qualitatif entre les valeurs théoriques et expérimentales permet de justifier l'attribution d'une valeur théorique de MPF lié aux niveaux de la cycline B2 active.

Ces résultats montrent l'importance du comportement bistable de la cascade Mos - MEK - MAPK pour stabiliser la concentration en Mos actif à une valeur élevée, lorsque la valeur seuil est atteinte. En présence de MAPK en concentration élevée et stable, la dégradation des cyclines B2 n'a pas lieu et le niveau de MPF actif reste élevé. Par conséquent, notre modèle doit considérer la régulation de la formation de MPF et ses interactions avec la cascade MAPK.

L'interprétation des oscillations de valeur de D. O. de Mos lorsque les ovocytes sont stimulés par MPF est hypothétique. Il sera nécessaire de réaliser d'autres expériences pour mesurer le niveau de Plx1, Myt1, Cdc25 et Cdk1 en plus de la cycline B2, pendant une durée similaire. Il en est de même pour les expériences de stimulation par la progestérone en plus d'U0126.

Cependant, une tentative d'interprétation basée sur des résultats d'expériences déjà acquis peut être avancée.

Lorsque MPF est injecté il permet l'accumulation de Mos actif. Cela est observé pendant les deux premières heures. Ensuite, l'absence de MAPK, et de son substrat Rsk, neutralise leur interaction respective avec Cdc25 et Myt1. L'équilibre entre la formation de pré-MPF et de MPF est favorable à l'accumulation de pré-MPF. Cependant, Mos phosphorylerait Myt1 *in vivo* en absence de MAPK (Peter *et al.*, 2002). De ce fait, avec un certain délai, le niveau de MPF remonte et accumule de nouveau du Mos actif (voir à 4-6 heures). L'oscillation de Mos actif n'est pas soutenue car la dégradation des cyclines B2 ne permet plus de former de nouveaux complexes pré-MPF et MPF. De ce fait, on obtient des variations de Mos actif sur une durée de trois heures et une extinction de signal après 7 heures.

Chapitre 13

Perspectives

La comparaison qualitative entre les résultats expérimentaux et les valeurs théoriques obtenues est plutôt bonne. Cependant, des apports au modèle permettrait de s'affranchir du choix arbitraire de la fonction d'assignation de valeur à MPF, considéré comme un paramètre.

Des améliorations au modèle peuvent être apportées sur plusieurs niveaux : en amont de la cascade avec l'ajout d'un modèle de la dynamique de formation du MPF et de ses régulateurs, au niveau de la dynamique des phosphatases, et en aval de la cascade.

13.1 Régulation des phosphatases par Mos

Dans le cadre de sa thèse au sein du laboratoire de signalisation des signaux de division, les travaux conduits par Rémy Beaujois indiquent que la variation d'activité des phosphatases influence les valeurs d'équilibre de MEK et MAPK et leurs dynamiques. L'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases produit une activation partielle, rarement complète de MEK et MAPK, voire l'entrée en phase M des ovocytes en absence de progestérone.

A partir des expériences chez la souris qui permettent de suspecter une interaction négative entre Mos et les MAPK phosphatases (Verlhac *et al.*, 2000b), l'hypothèse d'une interaction entre Mos et les phosphatases de MEK et MAPK chez le Xénope est proposée. Ainsi, Mos active MAPK *via* la phosphorylation de MEK et également par une voie parallèle entre Mos et les phosphatases de MEK et MAPK. Cette dernière est nommée boucle de pro-action ou pro-boucle.

Une prédiction théorique sur l'influence des valeurs de concentrations des phosphatases représentées par P_y et P_z peut être réalisée avec notre modèle actuel. La figure 13.1 illustre l'inhibition simultanée de P_y et P_z et leur influence sur le comportement du système d'équations. On remarque que pour un couple de valeur de P_y et P_z compris dans la zone B, le système indique deux solutions stables et une instable. De plus, si l'inhibition des deux phosphatases est suffisante pour que leurs valeurs soient comprises dans la zone A, le système est monostable avec une valeur élevée de X_{as} . A l'inverse, une grande valeur des phosphatases induira le système vers un comportement monostable avec une faible valeur de X_{as} .

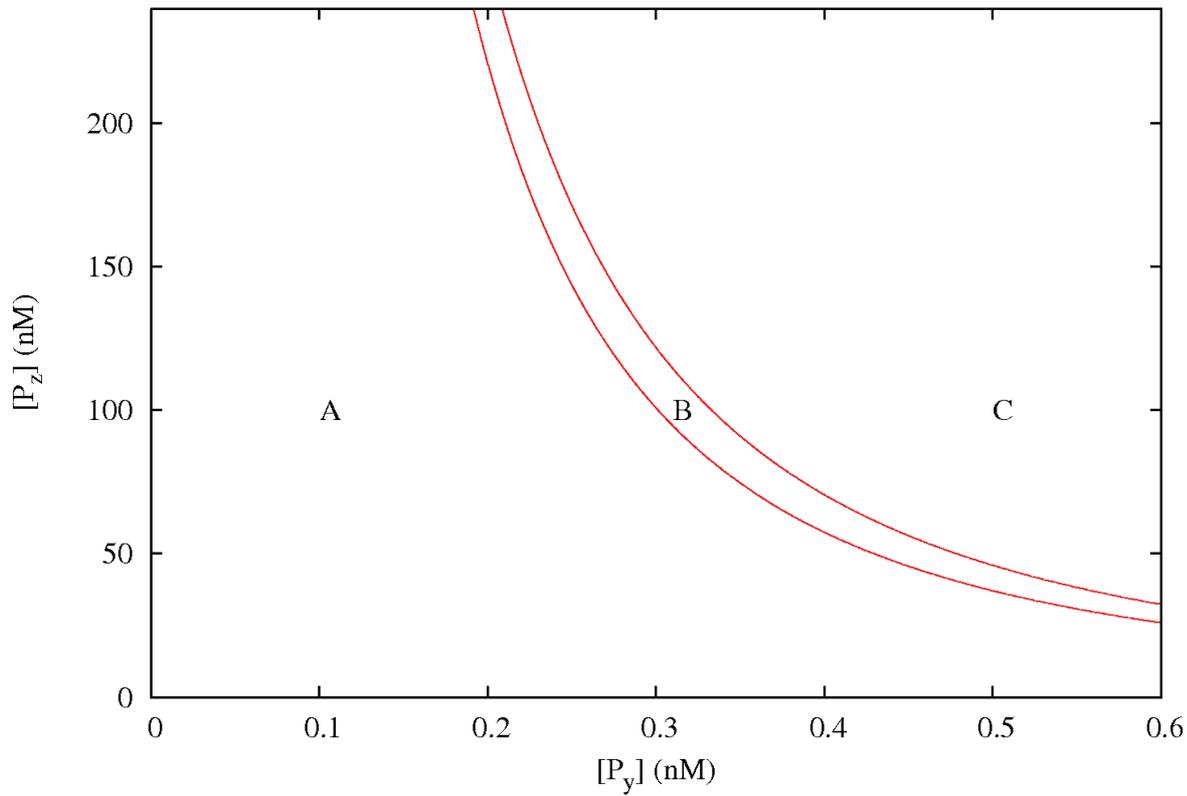


FIG. 13.1 – Diagramme de bifurcation avec variation des paramètres P_y et P_z et leur influence sur le comportement du système. En zone A et C, il est monostable et en B, il est bistable. Cela est proposé en prédiction pour des expériences ultérieures.

Si on identifie P_y et P_z à la phosphatase PP2A et que l'hypothèse de la pro-boucle est vérifiée, alors l'influence de Mos sur la production de MPF en absence de MEK - MAPK proposée par Peter pourrait s'expliquer par les observations expérimentales qui indiquent que PP2A tient un rôle antagoniste de Plx1 (Maton *et al.*, 2005). En effet, cela indiquerait que Mos interagit avec la phosphatase PP2A et Myt1 de manière à produire du MPF actif qui va en retour influencer son accumulation.

Une analyse par western blot de l'évolution temporelle de Mos, MAPK, Plx1, Cdc25, Myt1, cycline B2 et PP2A dans des ovocytes stimulés par la progestérone sous des conditions expérimentales différentes permettrait de déterminer qui du MPF ou de Mos est présent en premier. Par exemple, les ovocytes stimulés par la progestérone en présence d'U0126 et de l'inhibiteur de phosphatase, l'acide okadaïque (OA), devrait permettre d'observer l'accumulation de MPF et de Mos, en absence de l'effet des MAPK sur la production de MPF et l'accumulation de Mos. Par rapport aux résultats que nous avons exposés concernant la stimulation des ovocytes par la progestérone en présence de l'U0126, nous devrions observer du MPF plus tôt et le détecter juste avant Mos.

13.2 Régulation de la protéine Emi2 par la voie Mos - MEK - MAPK

Nous avons vu que MPF tient un rôle dans l'accumulation de Mos actif indépendamment de MAPK. En présence d'U0126, son activation est dépendante de Plx1, Cdc25 et de son auto-catalyse, cependant le complexe MPF est désactivé et la cycline B2 dégradée en absence de la voie Mos - MEK - MAPK - Rsk active. Ainsi, le rôle de MPF est d'initier la cascade de manière à ce que cette dernière bascule vers son niveau actif stable et influence la formation de nouveau complexe MPF actif à partir du stock de pré-MPF. Une valeur stable et élevée des protéines de la cascade et du MPF constitue le facteur CSF.

La protéine Emi2/XErp1, un inhibiteur de APC/C joue un rôle important dans la fonction de facteur cytotatique de Mos (Wu *et al.*, 2008). Lorsque la voie Mos - MEK - MAPK est active, l'activité de MAPK et Rsk produit du MPF *via* leur interaction respective avec Cdc25 et Myt1. De plus, Rsk active et stabilise Emi2 par phosphorylation. Ainsi, l'inhibition de l'APC/C permet de maintenir un niveau élevé de MPF actif.

De ce fait, la prise en compte de Emi2 et de ses partenaires, tels que la phosphatase PP2A et Plx1, permettra d'affiner la compréhension du couplage entre la voie Mos - MEK - MAPK et la régulation de MPF.

13.3 Régulation dynamique de MPF en amont de la voie Mos - MEK - MAPK

La formation de MPF actif à partir du stock de pré-MPF peut se dérouler en absence de MAPK et par conséquent ajouter des équations à notre modèle pour représenter cette activation indépendante de la présence de MAPK permettrait d'obtenir un profil de concentration de MPF de manière moins arbitraire.

Les résultats expérimentaux observés par Jessus et Ozon indiquent que Plx1 est nécessaire pour obtenir la formation et l'auto-amplification du MPF (Jessus et Ozon, 2004). Des expériences d'analyse par western blot des protéines de la cascade MAPK et du complexe MPF, en plus de la protéine Plx1, durant la transition G2/M d'ovocytes stimulés par la progestérone permettraient de déterminer la dynamique de l'activation de MPF et de vérifier si ce dernier active la cascade pour renforcer son amplification, ou si la cascade est activée en premier pour former du MPF à partir de pré-MPF.

Des études couplant théorie et expériences ont été menées par Tyson et ses collègues au sujet de l'évolution de MPF chez la levure (Novak *et al.*, 2001), l'embryon et extraits d'oeuf de Xénope (Novak et Tyson, 1993) et des cellules de mammifères (Novak et Tyson, 2004). Des modèles mathématiques ont été construits pour analyser les interactions entre Cdc2 et cyclines. Trois comportements du système sont 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, ou un comportement bistable dans le contexte de la division cellulaire des cellules somatiques. Un modèle minimal de l'oscillation mitotique représentant l'interaction en cascade entre Cdc2 et la cycline a été proposé par Goldbeter (Goldbeter, 1991).

Cependant, ces modèles se réfèrent principalement à la mitose cellulaire et de nombreux paramètres n'ont pas de valeurs biologiquement déterminées, notamment pour la méiose des ovocytes de Xénope. De plus, les auteurs signalent que pour conserver un modèle simple, MPF est considéré comme l'unique enzyme activatrice de Wee1 (Myt1) et Cdc25, alors que ces dernières sont phosphorylées par d'autres partenaires (e. g. enzyme de la famille Polo-like kinase). L'introduction d'une kinase dont l'activité est indépendante de MPF ne varie pas qualitativement le comportement du système, mais cela affecte les niveaux d'équilibre des concentration en pré-MPF et MPF en faveur d'une augmentation de MPF. Ainsi, l'apport de MAPK et Rsk dans le modèle de Novak et Tyson, au niveau de leur interactions avec Myt1 et Cdc25, aurait pour effet de produire plus de MPF qui en retour active la voie Mos - MEK - MAPK - Rsk ; cela correspond bien à une boucle positive d'activation mutuelle entre MPF et MAPK *via* Mos. Malgré ces simplifications, le modèle s'accorde bien avec les résultats expérimentaux.

Pour notre modèle, il s'agira de reprendre et adapter le modèle proposé par Novak et Tyson pour l'ovocyte du Xénope, avec l'ajout des protéines régulatrices de Myt1 et Cdc25 influencée de manière indépendante du MPF.

13.4 Approche stochastique de notre modèle

Les observations expérimentales de la valeur de D. O. de Mos recueillies lors de la stimulation des ovocytes en présence d'U0126 indiquent deux sommets de ces valeurs espacés selon une courte durée (environ une heure). De plus, l'analyse cellule par cellule nous montre une variabilité de valeur de la D. O. de Mos entre chaque cellule sélectionnée dans des conditions similaires. Par conséquent, il est probablement plus adapté d'analyser l'ensemble des interactions que nous avons proposé dans notre modèle avec une approche stochastique. Ainsi, il ne s'agira plus de traiter de concentration de protéine, qui nécessite l'hypothèse d'un milieu homogène, mais de leur nombre dans la cellule (avec éventuellement une localisation des protéines dans divers compartiments biologiques). Un autre avantage est de pouvoir analyser la formation des complexes transitoires et leur influence sur la dynamique de la voie Mos - MEK - MAPK ainsi que son couplage avec la régulation du complexe MPF.

Conclusion générale

Les propriétés physiologiques et biochimiques des ovocytes de *Xenopus laevis* nous ont permis d'étudier le comportement de la voie de signalisation Mos - MEK - MAPK, dans le cadre de la transition G2/M du cycle cellulaire. La maturation ovocytaire permet de synchroniser un ensemble d'ovocyte dans un même état et permet la réalisation d'une analyse temporelle de l'activité des kinases Mos, MEK et MAPK par western blot sur une longue durée.

La description des propriétés de Mos, MEK, MAPK/ERK2/Mpk1 et Rsk montre leur interdépendance. L'ensemble de la voie Mos - MEK - MAPK - Rsk peut-être décrite comme une cascade où chaque protéine de nature différente active la protéine en aval par phosphorylation. De plus, des interactions particulières telles que la boucle de rétro-contrôle positive ou négative influe sur le comportement de la voie lorsqu'elle est stimulée.

L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs a permis de réaliser des expériences durant lesquelles un des composant de la voie est non fonctionnel, conditions qui affectent les fonctions cellulaires. Un ensemble de protéines qui tient un rôle physiologique précis peut être défini comme un module fonctionnel. Ainsi, la protéine kinase Mos est un module dont les éléments sont composés des trois formes différentes : inactive instable, active instable et active stable.

Considérer les trois formes de Mos dans un modèle mathématique qui représente la voie Mos - MEK - MAPK est une nouveauté. Cela nous a conduit à tenir compte également du rôle du complexe MPF sur l'accumulation de Mos.

L'évolution temporelle de Mos sur de longues périodes de culture après stimulation par la progestérone, a été observée en présence d'un inhibiteur de MEK, l'U0126. Par ailleurs, la maturation des ovocytes de *Xenopus laevis* a été stimulée par injection de cytoplasme contenant du MPF en présence ou non de U0126. Des analyses par western blot ont permis d'évaluer l'accumulation au cours du temps de la protéine Mos, et des états de phosphorylation de MEK, MAPK, ainsi que de la cycline B2. Le MPF peut être activé en absence de MAPK et jouer un rôle prépondérant pour l'initiation de la voie de signalisation.

La paramétrisation du modèle a été basée sur trois sources distinctes :

1. des mesures expérimentales trouvées dans la littérature ;
2. un choix arbitré par la connaissance du comportement du modèle ;
3. des estimations théoriques, à partir de plages fixées expérimentalement.

L'analyse par bifurcation nous a permis d'étudier le comportement du système en fonction de la valeur de chaque paramètre. De plus, l'analyse des paramètres liés aux deux boucles de rétro-contrôles dont l'initiateur est soit MAPK soit MPF nous a permis de discuter sur leur importance sur le comportement de la voie et l'accumulation de Mos.

Les résultats de simulation obtenus avec le modèle ont été confrontés aux observations issues des expériences. Une bonne corrélation a été observée dans une optique qualitative.

Cependant, l'évolution temporelle de la concentration totale en Mos actif nous incite à apporter des améliorations au modèle pour s'accorder aux variations abruptes d'accumulation de Mos détectées en absence de MAPK.

Le rôle du MPF et de l'ensemble de ses régulateurs (responsables de son activation ou inactivation) est proposé pour être étudié ultérieurement. En effet, les interactions entre

CONCLUSION GÉNÉRALE

ces deux voies impliquent diverses protéines de part et d'autre. Le développement d'un nouveau modèle qui prend en compte ces interactions permettrait de mieux appréhender la régulation de l'accumulation de Mos dans l'ovocyte du Xénope.

Annexes

Annexe A

Équilibre de la cascade MAPK

A.1 Introduction

Dans l'objectif d'un développement des comparaisons quantitatives croissantes entre expériences et modèles, il est utile de comprendre les propriétés de ces modèles aussi bien que possible ; un exemple récent dans ce contexte est illustré par le travail de Ventura *et al.* (Ventura *et al.*, 2008). A cause de la complexité des systèmes étudiés, des résolutions analytiques sont dans les faits, rarement menées.

Ci-dessous est présenté un traitement exact des équilibres de la cascade MAPK, basé sur un modèle phénoménologique introduit par Angeli (Angeli *et al.*, 2004). Il est montré que dans le cas d'évolution cinétique de type Michaelis-Menten des concentrations, l'équilibre de la cascade peut être obtenu analytiquement. (Pour une cinétique linéaire, il s'agit d'un sujet complexe traité dans le livre (Alon, 2006).)

La figure A.1 présente le schéma basique des interactions dans la cascade comme on l'étudie ici. La cascade est initiée par Mos, dont la concentration est pour l'instant prise comme donnée ; la cinétique de Mos est négligée à ce stade. Mos phosphoryle MEK, y_1 , dont la forme simplement ou doublement phosphorylée est respectivement notée, y_2 et y_3 . Le second niveau de la cascade est la séquence des divers états de phosphorylations croissants de MAPK par MEK, noté z_1 , z_2 et z_3 , en analogie complète avec le niveau de MEK (voir figure A.1).

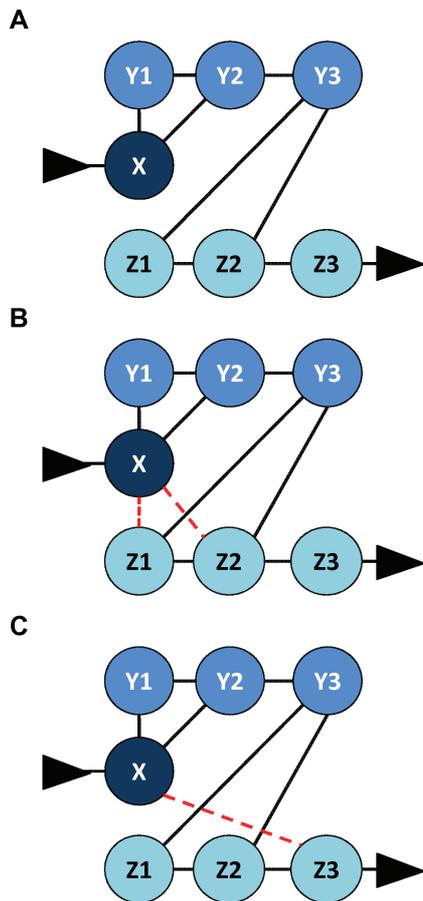


FIG. A.1 – Schéma de la cascade MAPK dans le modèle simplifié proposé par Angeli (Angeli *et al.*, 2004) et étendu ici. La nomenclature est la suivante : x Mos, $y_{1,2,3}$ MEK de différent état de phosphorylation (ordre croissant en fonction du nombre de groupe phosphate lié), et de manière identique pour $z_{1,2,3}$ relatif à MAPK. A) Montre la cascade basique dans laquelle Mos promeut la phosphorylation de MEK, la forme doublement phosphorylée de MEK, y_3 , promeut la phosphorylation de MAPK. B) Mos promeut la phosphorylation de MAPK d’une manière indirecte, voire discussion dans le texte ; C) la cascade avec une boucle de rétro-action de z_3 sur x .

A.2 Un modèle avec cinétique de type Michaelis-Menten pour la cascade MAPK

A partir de (Angeli *et al.*, 2004), nous écrivons les équations cinétiques pour le système comme suit :

$$\dot{y}_1 = \frac{V_6 y_2}{K_6 + y_2} - \frac{V_3 x y_1}{K_3 + y_1} \quad (\text{A.1})$$

$$\dot{y}_2 = -(\dot{y}_1 + \dot{y}_3) \quad (\text{A.2})$$

$$\dot{y}_3 = \frac{V_4 x y_2}{K_4 + y_2} - \frac{V_5 y_3}{K_5 + y_3} \quad (\text{A.3})$$

$$\dot{z}_1 = \frac{V_{10} z_2}{K_{10} + z_2} - \frac{V_7 y_3 z_1}{K_7 + z_1} \quad (\text{A.4})$$

$$\dot{z}_2 = -(\dot{z}_1 + \dot{z}_3) \quad (\text{A.5})$$

$$\dot{z}_3 = \frac{V_8 y_3 z_2}{K_8 + z_2} - \frac{V_9 z_3}{K_9 + z_3} \quad (\text{A.6})$$

où les V_i et K_i sont, respectivement, des constantes de vitesse de réactions et d'équilibres, et où les numérotations des réactions suivent le schéma de (Kholodenko, 2000) qui est également utilisé par (Angeli *et al.*, 2004).

Les équations (2) et (5) sont une conséquence de la conservation du nombre total de protéines MEK et MAPK, exprimée par

$$\sum_{i=1,2,3} y_i = y_T, \quad \sum_{i=1,2,3} z_i = z_T \quad (\text{A.7})$$

Ainsi le système d'équations cinétiques se réduit à seulement quatre équations indépendantes.

Maintenant, les équilibres de la cascade MAPK peuvent être déterminés analytiquement de manière exacte ; étant donné que la cinétique proposée est non-linéaire, ce résultat est non-trivial. Pour le démontrer, nous débutons par l'équation relative à \dot{y}_1 (l'état non phosphorylé de MEK) :

$$\dot{y}_1 = \frac{V_6 y_2}{K_6 + y_2} - \frac{V_3 x y_1}{K_3 + y_1} \quad (\text{A.8})$$

En divisant cette équation par V_6 et par une redéfinition de variable *via*

$$x' \equiv \frac{V_3}{V_6} x, \quad y_i \equiv y'_i y_T, \quad i = 1, 2, 3 \quad (\text{A.9})$$

Nous trouvons que

$$\frac{y_T}{V_6} \dot{y}'_1 = \frac{y'_2 y_T}{K_6 + y'_2 y_T} - x' \frac{y'_1 y_T}{K_3 + y'_1 y_T} \quad (\text{A.10})$$

Étant donné la paramétrisation proposée dans l'article de Angeli, on obtient $K_3 = K_6 = y_T$, que nous allons employer durant la suite de la démonstration, cette équation se simplifie en la forme

$$\frac{y_T}{V_6} \dot{y}'_1 = \frac{y'_2}{1 + y'_2} - x' \frac{y'_1}{1 + y'_1}. \quad (\text{A.11})$$

La présence d'un facteur au membre de gauche correspond à une variation du pas temporel utilisé pour décrire les cinétiques des concentrations de protéines. La nouvelle expression du temps est $t' = (V_6/y_T)t$. Pour une meilleur lisibilité, les primes sont abandonnées et nous obtenons

$$\dot{y}_1 = \frac{y_2}{1 + y_2} - x \frac{y_1}{1 + y_1}. \quad (\text{A.12})$$

De part la symétrie des valeurs de paramètres ($V_3 = V_4, V_5 = V_6, K_3 = K_4 = K_5 = K_6 = y_T$), une procédure identique s'applique également pour les équations liées à \dot{y}_2 and \dot{y}_3 .

En réalité, la même stratégie peut aussi être appliquée aux équations pour $z_i, i = 1, 2, 3$. Les différences sont dues au fait que nous avons déjà redéfini la variable y_3 et le temps t ; cela signifie que les équations pour z_i doivent posséder deux paramètres additionnels qui reflètent la différente échelle de temps pour les dynamiques de y_i et z_i , et une échelle de concentration différente pour y_i et z_i . Ces deux nouveaux paramètres sont donnés par

$$v \equiv \frac{V_7}{V_{10}} y_T, \quad \tau \equiv \frac{V_6}{V_{10}} \frac{z_T}{y_T}. \quad (\text{A.13})$$

Par exemple, l'équation pour z_1 devient

$$\tau \dot{z}_1 = \frac{z_2}{1 + z_2} - v y_3 \frac{z_1}{1 + z_1}, \quad (\text{A.14})$$

et encore, due à la symétrie des paramètres ($K_7 = K_8 = K_9 = K_{10} = z_T, V_7 = V_8, V_9 = V_{10}$), la procédure de simplification peut être appliquée aux équations de z_2 et z_3 .

Nous avons donc achevé de réécrire le système des quatre équations (plus deux qui sont dépendante des lois de conservations) avec seulement deux paramètres, pour lesquelles seulement un des deux affecte l'évolution temporelle de la cascade.

Dans les étapes suivantes, nous utiliserons le fait que les équations ont acquis une forme homogène pour les variables

$$w_i \equiv \frac{y_i}{1 + y_i}, \quad q_i \equiv \frac{z_i}{1 + z_i}. \quad (\text{A.15})$$

Notons également que la dérivée temporelle, par exemple de w_i , est donnée par

$$\dot{w}_i = \frac{\dot{y}_i}{(1 + y_i)^2}, \quad (\text{A.16})$$

et cela de manière similaire pour \dot{q}_i .

Nous obtenons alors une forme simple du modèle

$$\dot{w}_1 = (1 - w_1)^2(w_2 - xw_1) \quad (\text{A.17})$$

$$\dot{w}_2 = (1 - w_2)^2(xw_1 + w_3 - xw_2 - w_2) \quad (\text{A.18})$$

$$\dot{w}_3 = (1 - w_3)^2(xw_2 - w_3) \quad (\text{A.19})$$

$$\tau\dot{q}_1 = (1 - q_1)^2(q_2 - sq_1) \quad (\text{A.20})$$

$$\tau\dot{q}_2 = (1 - q_2)^2(sq_1 + q_3 - q_2(1 + s)) \quad (\text{A.21})$$

$$\tau\dot{q}_3 = (1 - q_3)^2(sq_2 - q_3) \quad (\text{A.22})$$

où

$$s \equiv v \frac{w_3}{1 - w_3}. \quad (\text{A.23})$$

De ces équations, les solutions $\dot{w}_i = \dot{q}_i = 0$ sont facilement obtenues, car il s'agit de mettre à zéro les seconds facteurs des membres de droite. En effet, comme $w_i \leq 1/2$, les premiers facteurs ne sont jamais nuls. Pour les w_i , les solutions sont :

$$w_3 = xw_2 = x^2w_1 \quad (\text{A.24})$$

Cela exprime de manière claire l'influence du mécanisme de phosphorylation par x sur les w_i (un résultat analogue est obtenu dans le cas des cinétiques linéaires (Alon, 2006)).

Concernant les q_i , les solutions sont obtenues de manière similaire. On obtient :

$$q_3 = sq_2 = s^2q_1. \quad (\text{A.25})$$

On rappelle que s dépend de w_3 et donc de x .

Dans le but de déterminer les points fixes du système de façon explicite, nous devons nous servir des relations de contraintes sur y_i et z_i qui sont réécrites en terme des nouvelles variables. Ainsi, la condition

$$y_1 + y_2 + y_3 = 1 \quad (\text{A.26})$$

devient en terme de w_i

$$\frac{w_1}{1 - w_1} + \frac{w_2}{1 - w_2} + \frac{w_3}{1 - w_3} = 1. \quad (\text{A.27})$$

Avec les valeurs de w_2 et w_3 qui sont fonction de w_1 comme nous l'avons vu dans la résolution du système à l'équilibre (relation 24), nous pouvons réécrire cette équation de conservation en une équation cubique pour w_1 ,

$$4x^3w_1^3 - 3x(1 + x + x^2)w_1^2 + 2(1 + x + x^2)w_1 - 1 = 0. \quad (\text{A.28})$$

Et par symétrie entre les niveau MEK et ERK de la cascade, l'équation de conservation pour q_1 est obtenue par remplacement de w_1 par q_1 , et x par s .

De manière évidente, les équations cubiques en w_1 et q_1 peuvent être exactement résolues, permettant de trouver les valeurs de chaque variable et leur influence respective quand le système est à l'équilibre. Cependant, une simplification de ces équations peut être proposée. En effet, avec l'observation de la valeur maximale de $w_1 = 1/2$, le premier et le second terme de cette équation cubique sont négligeables par rapport au deux derniers termes. De plus, l'équation possède toujours une seule solution physique. Par conséquent, une approximation qualitative du résultat exact est obtenu par la non-prise en compte des deux premiers termes et résolution de l'équation pour w_1 . On obtient :

$$w_1 = \frac{1}{2} \frac{1}{1 + x + x^2}, \quad (\text{A.29})$$

qui est encore un résultat analogue à la cinétique linéaire. Comme $w_2 = xw_1$ et $w_3 = x^2w_1$, on obtient directement

$$w_2 = \frac{1}{2} \frac{x}{1 + x + x^2}, \quad (\text{A.30})$$

et

$$w_3 = \frac{1}{2} \frac{x^2}{1 + x + x^2}. \quad (\text{A.31})$$

Ainsi, on voit que tandis que w_1 diminue comme une fonction de x , w_2 grandit de manière linéaire, et ensuite diminue en $\propto 1/x$ pour des grandes valeurs de x , dû à la formation de w_3 . On remarque que la forme doublement phosphorylée de MEK montre exactement une variation de concentration, par rapport à x , qui suit un profil sigmoïdal de type de Hill avec un coefficient de Hill égal à deux.

La figure A.2 (à gauche) illustre la différence entre la solution obtenue par approximation et la solution exacte de l'équation cubique pour $w_1(x)$. Si l'on considère l'ajustement $w_1(x) \sim x^b$ sur une étendue de valeurs de $1.5 \leq x \leq 3$, qui est l'étendue de concentration de Mos utilisée par Angeli, la meilleure valeur qui procure un bon ajustement est $b = -1.557$. Ainsi, ajuster la courbe sur une plus grande valeur de x (d'un ordre de magnitude supérieur), révèle que la valeur de b converge vers la valeur de deux ; nous trouvons une valeur proche de deux, $b = -1.942$. Ce résultat montre que la détermination expérimentale du coefficient de Hill (qui mesure la nonlinéarité la plus haute dans la loi de concentration) est difficile, car les termes de moindre ordre qui décroissent moins rapidement, influent fortement sur le résultat des mesures. Les mesures de concentration devront donc se faire à une valeur élevée de Mos actif.

Au moyen de l'identité formelle entre les équations en q_1 et w_1 , nous trouvons directement des résultats analogues pour q_1, q_2, q_3 , mais à présent avec x remplacé par s . Si nous réécrivons le résultat final de q_3 en fonction de z_3 , nous trouvons :

$$z_3 = \frac{s^2}{2(1 + s + s^2)} \quad (\text{A.32})$$

et comme s dépend quadratiquement de x , nous obtenons une fonction sigmoïdale avec un coefficient de Hill égal à quatre, ce qui correspond bien aux résultats admis pour la cascade Mos - MEK - ERK (figure A.3).

A.2. UN MODÈLE AVEC CINÉTIQUE DE TYPE MICHAELIS-MENTEN POUR LA CASCADE MAPK

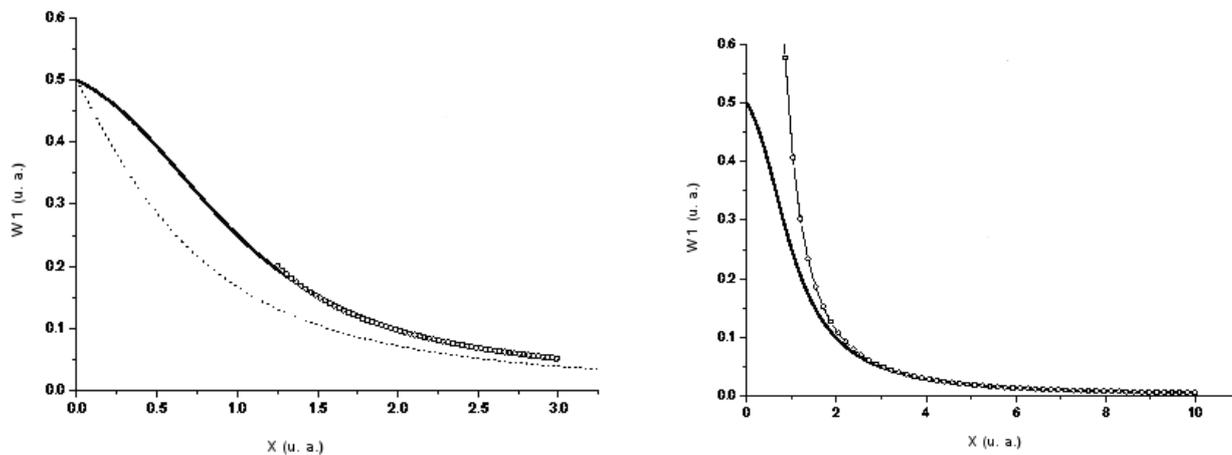


FIG. A.2 – La concentration de w_1 (la forme non phosphorylée de MEK) varie comme une fonction de concentration de Mos, x . L'exposant de Hill ne correspond pas à la valeur théorique de deux lorsque x est petit. Voir discussion dans texte.

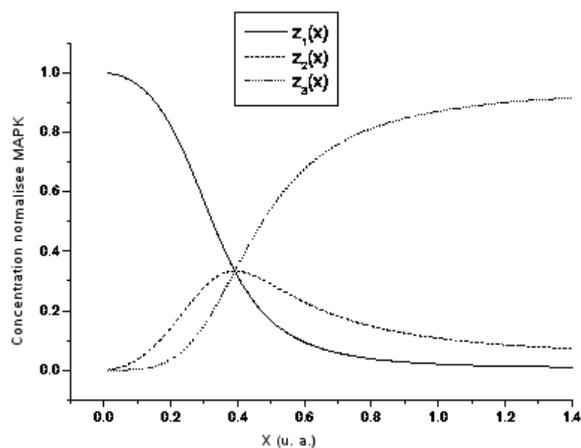


FIG. A.3 – La dépendance de z_1 et ses formes phosphorylées z_2 et z_3 comme elle a été obtenue à partir de la solution de l'équation A.28, en utilisant les conditions pour obtenir les états stables, et une transformation inverse vers les variables originales.

A.3 Bistabilité : reconsidérer le modèle de Angeli

Nous venons de voir que lorsque la cascade est stimulée par un gradient croissant de concentration de protéine Mos (x) ; la réponse qui correspond à la variation de concentration de ERK ($z_3(x)$) est sigmoïdale (donc non-linéaire). A présent, nous allons discuter la conséquence de l'existence d'une boucle de rétro-action entre $z_3(x)$ et x . Grâce à cette boucle, la sortie de la cascade favorise la production de son activateur et correspond ainsi à une auto-activation de la cascade. Pour rendre compte de ce phénomène, il nous faut définir une dynamique de synthèse et dégradation de Mos. Angeli *et al.* a choisi

$$\dot{x} = -\gamma \frac{x}{K_2 + x} + \tilde{V}_0 z_3(x)x + \tilde{V}_1, \quad (\text{A.33})$$

(Il est à noter que nous avons déjà réécrit son équation, en tenant compte de la normalisation des variables que nous avons appliqué au préalable). Un *erratum* a été publié sur leur site après leur publication, les auteurs ont modifié cette équation en changeant le terme de production de Mos (et par conséquent la boucle de rétro-action) par le terme $\tilde{V}_0 z_3(x)$.

Il est très intéressant de discuter l'effet de ce changement, car nous le verrons, le choix d'une équation a une importante conséquence sur son interprétation biologique et ses effets. On part d'une version très peu modifiée de la dynamique de Mos :

$$\dot{x} = -\gamma x + \tilde{V}_0 z_3(x)x, \quad (\text{A.34})$$

nous avons inclus un terme de dégradation linéaire pour x (ce postulat est fréquemment utilisé par les biologistes et les modélisateurs), et le terme de production constant \tilde{V}_1 a été abandonné, car il ne joue pas un rôle qualitatif sur la dynamique du système.

La figure A.4 (à gauche) montre deux courbes : γx et $\tilde{V}_0 z_3(x)x$ dont le croisement détermine les points d'équilibre du système. Avec l'équation initialement proposé par Angeli, on observe que il y a seulement deux solutions et non pas trois, comme attendu. Cela est dû au fait que pour de grande valeurs de x , comme on arrive à une valeur saturée de $z_3(x)$ (il n'y a plus de $z_{1,2}$ disponible), les courbes se comportent comme des fonctions linéaires. Par conséquent, il n'est pas possible d'obtenir les trois solutions. Pour montrer que les solutions sont stables ou instables, il est utile de définir un potentiel mécanique W . Il est simple de le déterminer car la dynamique est unidimensionnelle, il s'écrit comme suit :

$$\dot{x} = -\frac{dW}{dx}. \quad (\text{A.35})$$

Ce potentiel $W(x)$ est illustré en la figure A.4 (à droite). Nous voyons un seul minimum stable à $x = 0$ et un minimum instable à $x = x_{um}$. La stabilité d'un point sur cette courbe se remarque par sa forme convexe de part et d'autres du point analysé.

La correction apportée par Angeli au terme de synthèse de Mos est à présent plus claire : elle permet l'obtention de trois intersections, et donc un autre minimum stable. Cependant, cette correction pose encore des problèmes. En effet, l'interprétation biologique du terme donné par Angeli n'est pas correcte car elle "signifie" que la protéine ERK se transforme en Mos. En effet, son terme de production ne contient que $z_3(x)$, donc il

A.3. BISTABILITÉ : RECONSIDÉRER LE MODÈLE DE ANGELI

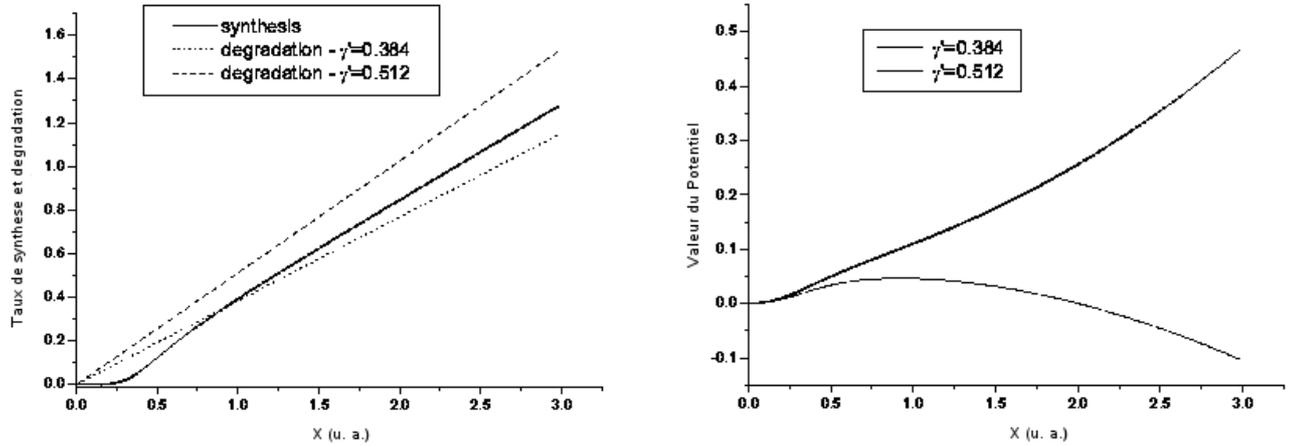


FIG. A.4 – À gauche : Conditions pour obtenir les états stables des concentrations des protéines pour le modèle de Angeli *et al.* Nous voyons deux intersections qui correspondent à un état stable et un état instable. À droite : le potentiel mécanique qui montre la stabilité ou non des solutions (états stables)

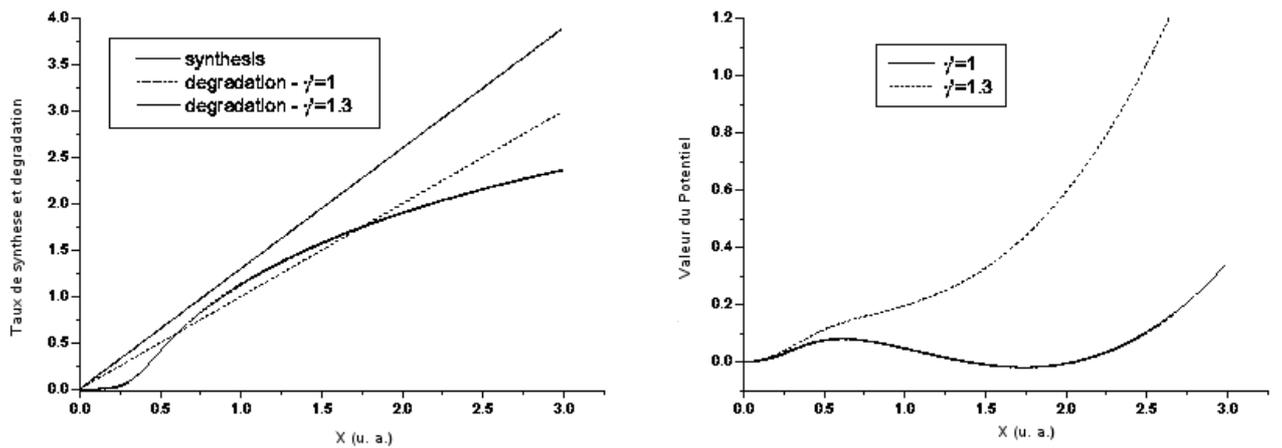


FIG. A.5 – À gauche : Conditions pour obtenir les états stables des concentrations de Mos pour le modèle proposé par notre équation eq.(A.36). Il y a bien trois intersections (deux solutions stables et une instable). À droite : le potentiel mécanique qui indique la stabilité des solutions.

ne tient pas compte des interactions avec les autres protéines en amont de la cascade. De plus, sa correction n'est pas en accord avec la figure 5c de leur article (Angeli *et al.*, 2004), car il y est illustré une superposition d'une courbe linéaire de dégradation et une courbe $z_3(x)$. Cela correspond plus à l'équation que nous avons indiqué en (A.34).

Pour être en accord avec les résultats déduits par Angeli, de manière qualitative, nous suggérons plutôt l'expression phénoménologique suivante :

$$\dot{x} = -\gamma x + \frac{\tilde{V}_0 z_3(x)x}{\tilde{K} + x} \quad (\text{A.36})$$

qui montre une dégradation linéaire et une production qui est due à l'interaction entre ERK et Mos. Les trois intersections sont bien retrouvées, et de ce fait, il y a deux solutions stables et une solution instable (figure A.5).

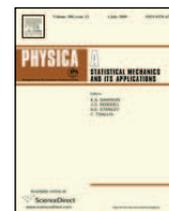
En conclusion, il est possible de trouver des solutions analytiques d'un modèle de la cascade à l'équilibre, avec certaines conditions sur les valeurs de paramètres. Il est important de bien choisir les équations d'évolutions pour obtenir le bon comportement mais aussi rester le plus simple dans la formulation mathématique pour permettre une interprétation biologique de chaque terme. C'est pourquoi j'ai fondé mon modèle sur la distinction entre les formes non-active instable, active instable et active stable de Mos.

Annexe B

Articles publiés

1. On the equilibria of the MAPK cascade : Cooperativity, modularity and bistability
C. Russo, C. Giuraniuc, R. Blossey and J.-F. Bodart
Physica A : Statistical Mechanics and its Applications
Volume 388, Issue 24, 15 December 2009, Pages 5070-5080

2. Modularity within the MAPK cascade network
R. Blossey, C. Russo and J.F. Bodart
Oncogene Proteins : New Research, A.H. Malloy, E.C. Carson (eds.), Nova Science
Publishers (2008)



On the equilibria of the MAPK cascade: Cooperativity, modularity and bistability

C. Russo^{a,b}, C. Giuraniuc^a, R. Blossey^{a,*}, J.-F. Bodart^{a,b}

^a Biological Nanosystems, Interdisciplinary Research Institute USR3078, 50 Avenue Halley, F-59658 Villeneuve d'Ascq, France

^b Laboratory of Division Signal Regulation, EA 4020, Building SN-3, University of Sciences and Technology Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2009

Received in revised form 7 August 2009

Available online 19 August 2009

PACS:

87.16.Xa

87.16.-b

87.17.Aa

ABSTRACT

In this paper we present a discussion of a phenomenological model of the MAPK cascade which was originally proposed by Angeli et al. [D. Angeli, J.E. Ferrell, Jr., E.D. Sontag, PNAS 101 (2004), 1822]. The model and its solution are extended in several respects: (a) an analytical solution is given for the cascade equilibria, exploiting a parameter-based symmetry of the rate equations; (b) we discuss the cooperativity (Hill coefficients) of the cascade and show that a feedforward loop within the cascade increases its cooperativity. The relevance of this result for the notion of modularity is discussed; (c) the feedback model for cascade bistability by Angeli et al. is reconsidered. We argue that care must be taken in modeling the interactions and a biologically realistic phenomenological model cannot be too reductionist. The inclusion of a time-dependent degradation rate is needed to account for a switching of the cascade.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The MAPK (**Mitogen-Activated Protein Kinase**) cascade is a paradigmatic signaling cascade which plays a crucial role in many aspects of cellular events [1]. The biological function of the cascade is to ensure that an extracellular signal arriving at the cell membrane can be transported reliably to targets in the cytoplasm and in the nucleus. The functioning of this signaling mechanism is therefore of obvious interest to biologists, since interventions in the signaling chain permit controlling physiological behaviours. From the point of view of a physicist, it is interesting to understand how different control mechanisms (nonlinearities due to cooperative molecular interactions, feedback loops etc.) shape the behaviour of the signaling chain [2–4].

The MAPK cascade consists of several biochemical reaction levels in which an activated kinase at each level phosphorylates a kinase at a downstream level: the signaling chain can thus be considered as a cascade of phosphorylations. The MAPKK kinase – the activator at cascade entry – is the protein Mos in *Xenopus* oocytes, which underlies our work (see Fig. 1). These amphibian gametes are considered as model cells, easy to process experimentally due to their size (~mm), rich in the concentration of the signaling molecules (even up to 50 ng of protein per oocyte [5]), and hence signaling events can be reliably modeled by ODE-models for the reaction kinetics.

Understanding the control mechanisms involved in the MAPK signaling cascade has been a major research topic in recent years in the emerging field of systems biology, giving evidence that several aspects of the cascades can be both studied *in vivo* and modeled mathematically. The key work in this respect was the paper by Huang and Ferrell [6] which developed a detailed kinetic model for the so-called ultrasensitivity of the cascade, based on experimental data obtained for the cascade

* Corresponding author. Tel.: +33 362531731; fax: +33 362531701.
E-mail address: ralf.blossey@iri.univ-lille1.fr (R. Blossey).



Fig. 1. *Xenopus* oocytes. The cells are large: A typical diameter is about 1 mm.

in *Xenopus*. The notion of ‘ultrasensitivity’ refers to the steepness of the sigmoidal stimulus/response curve which is the hallmark of a signaling cascade: a very nonlinear response ensures an effective response to a signal received by the cell.

In the context of the transformation of a gradual stimulus into a nonlinear response curve, the question of the control of the cascade has attracted the interest of experimenters and theorists alike. In fact, depending on how the cascade is ‘implemented’ within other network elements, it can function as a switch, an amplifier or feedback-controller [7–9]. This has led to the view that the cascade can be considered as a ‘module’ inserted in a network of interactions. In particular, the role of positive and negative feedback loops in conjunction with the cascade is a topic of continuing interest [11,10]. More recently, also the role of stochastic effects in the cascade have been considered [12], as well as the spatial progression of the signaling cascade from the plasma membrane to the nucleus [13].

In order to be able to develop increasingly quantitative comparisons between experiment and models, it is useful to understand the properties of the models as well as possible; a recent prime example in this context is the work by Ventura et al. [14]. Due to the complexity of the systems addressed, it is in fact rare that analytical calculations can be made. With this work we start a series of investigations on phenomenological models for the MAPK cascade. First, we present an exact treatment of the MAPK cascade equilibria based on a phenomenological model introduced in Ref. [15].

Here we show (a) that for the case of a Michaelis–Menten kinetics, the equilibria of the cascade can be computed analytically by exploiting a parameter-based symmetry of the equations. (For a simple linear kinetics, this is a text book matter, see [16].) We then further address the two following issues: (b) how can the cooperativity of the cascade be changed? We show that by an indirect feedforward loop, the input signal–response curve of the cascade can become more pronounced, i.e. acquire a higher effective Hill coefficient; this results has repercussions on the notion of modularity of the cascade. Finally, (c), we reconsider results by Angeli et al. on the feedback-induced bistability of the cascade and introduce a simple biological mechanism by which the cascade can switch off.

2. A Michaelis–Menten model of the MAPK cascade

Fig. 2 presents the basic scheme of the interactions in the cascade as we discuss it here. The cascade is initiated by Mos, of which the concentration x is taken first as given (i.e., we neglect the kinetics of Mos for the moment). Mos activates the phosphorylations of MEK, y_1 , whose once- and doubly-phosphorylated forms are denoted by y_2 and y_3 , respectively. The second level of the cascade is a repetition of the first level in which now, however, the role of Mos is played by doubly-phosphorylated MEK, y_3 . The second layer of the cascade is the sequence of phosphorylations of MAPK, denoted by z_1 , leading to z_2 and z_3 in complete analogy to the MEK-level of the cascade (Fig. 2(A)). Indicated in Fig. 2(B) is the case in which Mos can also act within the cascade by promoting phosphorylation of downstream targets in an indirect way [17]. Finally, Fig. 2(C) shows that the cascade output, z_3 , can act back on the input level x by way of a feedback loop and hence affect the concentration of Mos—we will turn to this case in the discussion of bistability.

Following [15] we write the kinetic equations for the system as follows

$$\dot{y}_1 = \frac{V_6 y_2}{K_6 + y_2} - \frac{V_3 x y_1}{K_3 + y_1} \quad (1)$$

$$\dot{y}_2 = -(\dot{y}_1 + \dot{y}_3) \quad (2)$$

$$\dot{y}_3 = \frac{V_4 x y_2}{K_4 + y_2} - \frac{V_5 y_3}{K_5 + y_3} \quad (3)$$

$$\dot{z}_1 = \frac{V_{10} z_2}{K_{10} + z_2} - \frac{V_7 y_3 z_1}{K_7 + z_1} \quad (4)$$

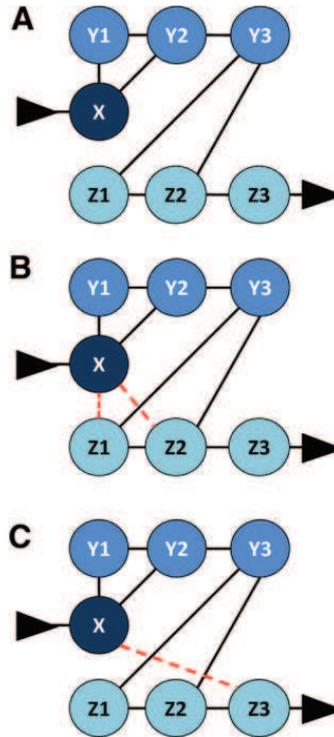


Fig. 2. (Color online.) Schematics of the MAPK cascade in the simplified model proposed in Ref. [15] and extended here. The nomenclature is as follows: x Mos, $y_{1,2,3}$ MEK of different, increasing phosphorylation status, and likewise $z_{1,2,3}$ for MAPK. (A) shows the basic cascade: Mos promotes the phosphorylation of MEK, doubly-phosphorylated MEK, y_3 , promotes the phosphorylation of MAPK. (B) Mos promotes the phosphorylation of MAPK in an indirect way, as discussed in the text; (C) the cascade with feedback of z_3 on x .

$$\dot{z}_2 = -(\dot{z}_1 + \dot{z}_3) \quad (5)$$

$$\dot{z}_3 = \frac{V_8 y_3 z_2}{K_8 + z_2} - \frac{V_9 z_3}{K_9 + z_3} \quad (6)$$

where the V_i and K_i are reaction speeds and equilibrium constants, respectively, and where the numbering of the reactions follows the scheme by [11] which is also used in Ref. [15]. This scheme simply numbers the reactions sequentially layer by layer, first all phosphorylations, and then all dephosphorylations.

Eqs. (2) and (5) are a consequence of the conservation of the total number of the proteins MEK and MAPK, i.e.,

$$\sum_{i=1,2,3} y_i = y_T, \quad \sum_{i=1,2,3} z_i = z_T. \quad (7)$$

Thus, $\dot{y}_2 = -(\dot{y}_1 + \dot{y}_3)$, and likewise for \dot{z}_2 . The system of kinetic equations hence reduces to four independent equations only.

We now show that the equilibria of the MAPK cascade can be determined analytically in an exact way; given that the kinetics is nonlinear, this is a non-trivial result. To demonstrate it we begin with the equation for \dot{y}_1 (i.e., non-phosphorylated MEK), Eq. (1). Dividing this equation by V_6 and redefining the variables via

$$x' \equiv \frac{V_3}{V_6} x, \quad y_i \equiv y'_i y_T, \quad i = 1, 2, 3 \quad (8)$$

we find

$$\frac{y_T}{V_6} \dot{y}'_1 = \frac{y'_2 y_T}{K_6 + y'_2 y_T} - x' \frac{y'_1 y_T}{K_3 + y'_1 y_T}. \quad (9)$$

The kinetic parameters and reaction speeds are as estimated in the Supplementary Material of Ref. [15]. Although not exact, $K_3 = K_6 = y_T$, is a reasonable assumption which we follow throughout this paper. Making use of this symmetry, the equation then simplifies to

$$\frac{y_T}{V_6} \dot{y}'_1 = \frac{y'_2}{1 + y'_2} - x' \frac{y'_1}{1 + y'_1}. \quad (10)$$

What remains is to redefine time according to $t' = (V_6/y_T)t$. Dropping the primes we obtain

$$\dot{y}_1 = \frac{y_2}{1 + y_2} - x \frac{y_1}{1 + y_1}. \quad (11)$$

Due to the further parameter symmetries deduced from experiment by Angeli et al., ($V_3 = V_4, V_5 = V_6, K_3 = K_4 = K_5 = K_6 = y_T$), the same procedure also works for the equations for \dot{y}_2 and \dot{y}_3 .

In fact, the same strategy can also be applied to the equations for $z_i, i = 1, 2, 3$. The only differences now are that we have already redefined the variable y_3 and time t ; this means that the equations for z_i do have to contain two additional parameters which reflect the different timescales of the dynamics for y_i and z_i , and the concentration scales of the y_i and z_i . These two new parameters are given by

$$v \equiv \frac{V_7}{V_{10}} y_T, \quad \tau \equiv \frac{V_6}{V_{10}} \frac{z_T}{y_T}. \quad (12)$$

For example, the equation for z_1 reads

$$\tau \dot{z}_1 = \frac{z_2}{1+z_2} - v y_3 \frac{z_1}{1+z_1}, \quad (13)$$

and as before, due to the parameter symmetries ($K_7 = K_8 = K_9 = K_{10} = z_T, V_7 = V_8, V_9 = V_{10}$), the same procedure can be applied to the equations for z_2 and z_3 .

We have been able to rewrite the system of four equations (plus two which are the trivial consequence of the conservation laws) with two parameters only, whereby only one of them affects the time course of the cascade. This is clearly possible in an exact way only for the parameter symmetries uncovered by Angeli et al. We believe, however, that this does not constitute a major restriction for our intention to perform analytic calculations. In case the parameters do deviate from the exactly symmetrical values, our calculation can be used to develop an expansion in the perturbed parameters.

In a subsequent step we can now profit from the fact that the equations have acquired a homogeneous form in the variables

$$w_i \equiv \frac{y_i}{1+y_i}, \quad q_i \equiv \frac{z_i}{1+z_i}. \quad (14)$$

Noting further that the time derivative, e.g. of w_i , is given by

$$\dot{w}_i = \frac{\dot{y}_i}{(1+y_i)^2}, \quad (15)$$

and similar for the \dot{q}_i , we find that the model can be cast into the simple form

$$\dot{w}_1 = (1-w_1)^2 (w_2 - x w_1) \quad (16)$$

$$\dot{w}_2 = (1-w_2)^2 (x w_1 + w_3 - x w_2 - w_2) \quad (17)$$

$$\dot{w}_3 = (1-w_3)^2 (x w_2 - w_3) \quad (18)$$

$$\tau \dot{q}_1 = (1-q_1)^2 (q_2 - s q_1) \quad (19)$$

$$\tau \dot{q}_2 = (1-q_2)^2 (s q_1 + q_3 - q_2(1+s)) \quad (20)$$

$$\tau \dot{q}_3 = (1-q_3)^2 (s q_2 - q_3) \quad (21)$$

where

$$s \equiv v \frac{w_3}{1-w_3}. \quad (22)$$

From these equations, the fixed-point conditions $\dot{w}_i = \dot{q}_i = 0$ can now easily be read off. Note that since $w_i \leq 1/2$, zeroes can only appear in the right-most bracket of each equation. For the w_i one has

$$w_3 = x w_2 = x^2 w_1 \quad (23)$$

which expresses the character of the phosphorylation mechanism in a very clear way (and in fact, analogously to the linear kinetics [16]). Similarly, for the q_i

$$q_3 = s q_2 = s^2 q_1. \quad (24)$$

In order to determine the fixed-point values of these quantities explicitly, we have to invoke the constraints on y_i and z_i , which have to be expressed in terms of the new variables. The condition

$$y_1 + y_2 + y_3 = 1 \quad (25)$$

becomes in terms of w_i

$$\frac{w_1}{1-w_1} + \frac{w_2}{1-w_2} + \frac{w_3}{1-w_3} = 1. \quad (26)$$

Putting in the fixed-point conditions for w_2 and w_3 , this equation turns into a cubic equation for w_1 ,

$$4x^3 w_1^3 - 3x(1+x+x^2)w_1^2 + 2(1+x+x^2)w_1 - 1 = 0. \quad (27)$$

Due to the symmetry of the first and the second level of the cascade, the corresponding equation for q_1 is obtained by replacing w_1 by q_1 , and x by s .

Clearly, the cubic equations for w_1 and q_1 can be solved exactly with textbook formulae. There is a unique real solution which fulfills the condition $w_1(x=0) = 1/2$, as follows from a study of Eq. (27) near $x=0$. Since for $x \rightarrow 0$, $w_1 \rightarrow 1/2$, we can neglect the cubic and quadratic terms and find

$$w_1 = \frac{1}{2} \frac{1}{1+x+x^2}, \quad (28)$$

which is a result analogous to the linear kinetics. Fig. 3 (top) compares Eq. (28) with the numerical solution to Eq. (27). One sees that also for large values of x , the full solution asymptotically approaches the profile given by (28). We note that the two other solutions to Eq. (27) are singular for $x \rightarrow 0$, as can be seen by neglecting the constant term -1 and solving the remaining quadratic equation. For increasing values of x , the solutions become complex.

From the fixed-point conditions $w_2 = xw_1$ and $w_3 = x^2w_1$ one immediately obtains from Eq. (28)

$$w_2 = \frac{1}{2} \frac{x}{1+x+x^2}, \quad (29)$$

and

$$w_3 = \frac{1}{2} \frac{x^2}{1+x+x^2}. \quad (30)$$

Thus we see that while w_1 diminishes as a function of x , w_2 first rises linearly, and then drops $\propto 1/x$ for large x , due to the depletion for the doubly-phosphorylated form. The concentration of doubly-phosphorylated MEK, by contrast, shows exactly the expected sigmoidal Hill-type profile with a Hill coefficient of two. As far as the asymptotics of the Hill coefficients is concerned, there is no difference between the linear and the Michaelis–Menten kinetics. The precise details of the concentration profiles are, however, essential in a comparison to experiment. We illustrate this point here by comparing our approximate (linear) and the exact solution of the cubic equation for the case of Michaelis–Menten kinetics.

Fig. 3 (top) illustrates the difference between the approximate solution (linear) and the exact numerically calculated solution of the cubic equation for $w_1(x)$. If one tries to fit the curve to a pure powerlaw $w_1(x) \sim x^b$ over a range of values $1.5 \leq x \leq 3$, which is roughly an experimentally accessible window for Mos based on the parameters used and experimental data for Mos concentrations [15,5], the best fit is obtained for a value of $b = -1.557$. Fitting of the curve over a much wider range, one order of magnitude in x , reveals that the value of b converges to a value of two; we find $b = -1.942$. This result of Fig. 3 (bottom) shows that the attribution of the Hill coefficient (the highest nonlinearity in the concentration law) from experiment is difficult since the lower order terms, which decay less rapidly, strongly affect the result.

Due to the formal identity of the equation for q_1 with that of w_1 , we immediately find the analogous results for q_1 , q_2 , q_3 , this time with x replaced by s . If we transform the final result for q_3 back to z_3 , we find

$$z_3 = \frac{s^2}{2(1+s+s^2)} \quad (31)$$

which, due to the quadratic dependence of s from x is actually a sigmoidal function with a Hill coefficient of four, as is common for the MAPK cascade; see Fig. 4. Again, there is no difference in the asymptotic value of the Hill coefficient between the linear and the exact cubic case.

3. Increasing cooperativity, breaking modularity

We now turn to the second question we want to address: how can one increase the Hill coefficient, i.e. the cooperativity of the cascade? From the foregoing section we have found that the Michaelis–Menten MAPK cascade has a maximal Hill coefficient of four, the highest nonlinearity in the denominator of Eq. (31). Evidently, the effectivity of the cascade is based on a sufficiently steep rise in concentration of MAPK at threshold. Is there a way to increase this steepness, i.e. having a still higher cooperativity?

In order to answer this question it is useful to investigate the impact of possible modifications of the cascade. Two cases may be distinguished: (i) additional levels of phosphorylation and (ii) rewirings of the cascade by the introduction of feedback and/or feedforward loops.

In the first case one can either have more phosphorylation steps within one given level, or an increase in the number of cascade levels. Although both will lead to an increase in cooperativity – increase the Hill coefficient – but this comes at a cost.

If more phosphorylation levels are introduced, the unphosphorylated and maximally phosphorylated states become disfavoured with respect to intermediate states, since the overall population of these states has thus to go down for a given

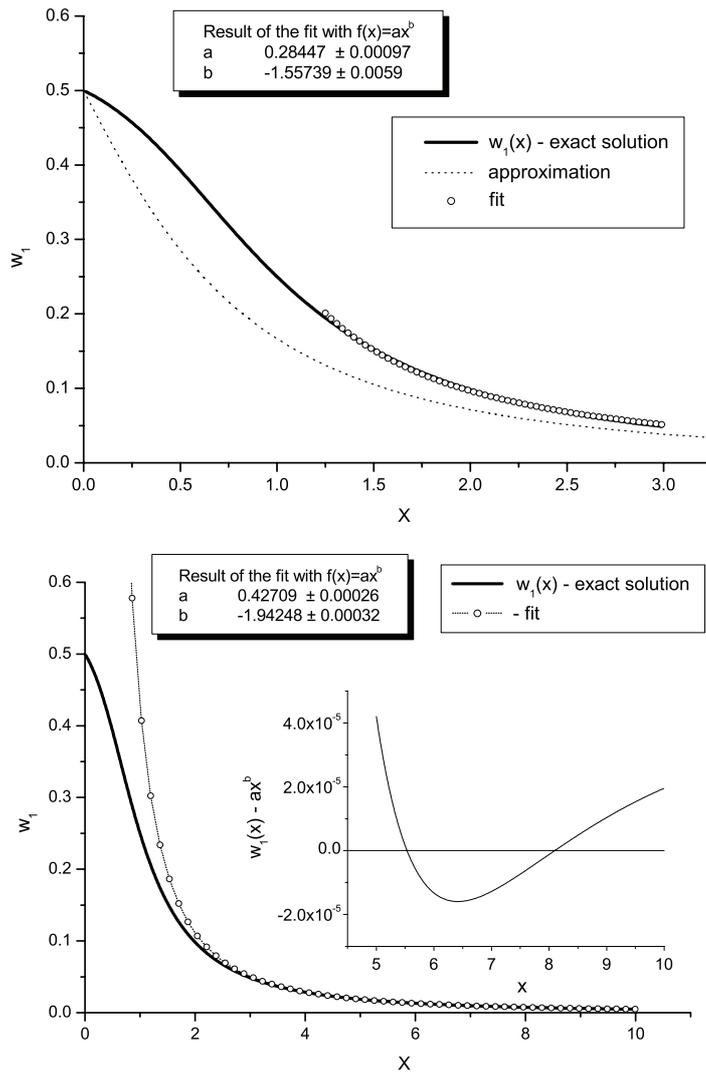


Fig. 3. The concentration of w_1 (the transformed concentration of non-phosphorylated MEK, y_1) as a function of concentration of Mos, x . The Hill exponent deviates from a value of two over the accessible concentration ranges; the asymptotic regime, for which this value would be reached, is out of range, see the discussion in the main text.

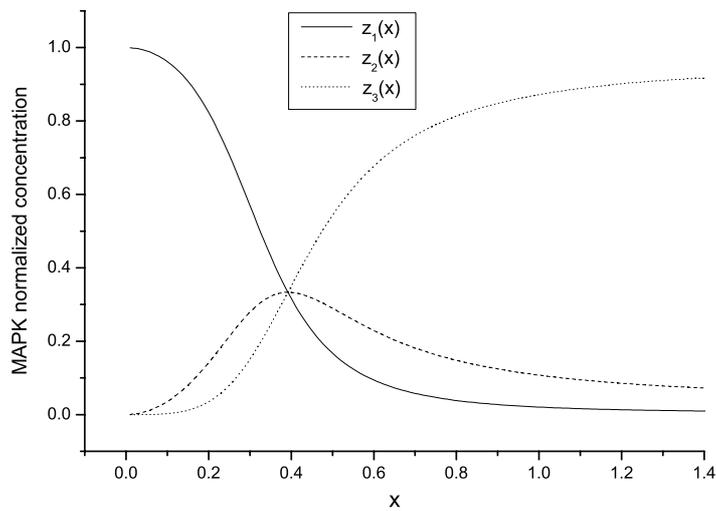


Fig. 4. The dependence of z_1 and its phosphorylated forms z_2 and z_3 as obtained from the full solution to Eq. (27), using the stationary state conditions, and transforming back to the original variables.

constant number of proteins. More levels thus means favoring the intermediate states, while it is the entry and exit states that are really important. The function of the intermediate level is just to separate entry and exit state by separating them from each other—but the separation should not be too ‘large’, i.e. involve too many states.

On the other hand, an increasing the number of cascade levels requires that another molecular partner has to be involved. This would have as a consequence a decrease in the ‘robustness’ of the cascade. The notion of robustness is used here in the sense that building a cascade based on many different molecules increases the probability of cascade failure.

By contrast, feedback and feedforward loops are schemes through which the cascade can, in principle, increase its cooperativity without increasing the type of molecules intervening and maintaining both phosphorylation levels and cascade levels.

We now show that a feedforward loop in the cascade can indeed lead to an increase of cooperativity. Such a loop may be introduced in the cascade when one considers Mos to act through two opposite pathways within the cascade. It has been observed that the MAPKKKinase phosphatases and/or MAPK phosphatases are down-regulated and inhibited for MAPK activation, because MAPKKKinase introduced experimentally fails to properly activate MAPK on its own [17]. Similar results have been obtained in *Xenopus* oocytes [18]. As proposed in mice oocytes Mos may intervene at one of the downstream levels by affecting the phosphorylation/dephosphorylation equilibrium in a concentration-dependent manner, by favoring phosphorylation such that the feedforward loop stabilizes z_3 , as sketched in Fig. 2(B).

In the context of our phenomenological model this shift of the phosphorylation equilibria leads to an effective concentration dependence of the kinetic parameters V_9 and V_{10} . We propose therefore the replacement of the reaction constants

$$V_9 \rightarrow V_9(x) = \frac{V_9^*}{K^* + x}, \quad V_{10} \rightarrow V_{10}(x) = \frac{V_{10}^*}{K^* + x}. \quad (32)$$

This modification of the reaction constants increases the cooperativity of the network, as characterized by the Hill coefficient, from four to six. The reason for this is the inverse polynomial dependence we assumed for simplicity. The same effect would be brought about by a similar intervention at the level of MEK.

This result has an important consequence on the idea of ‘modularity’ of the cascade. As argued in the introduction, the ubiquitous presence of the MAPK signaling pathway and its nonlinear characteristics make it attractive to consider it as a recurrent ‘invariable module’ that is programmed at cascade entry, and whose output interacts with other network elements. Our simple argument above reveals that an intervention *inside* the cascade, by affecting the phosphorylation/dephosphorylation equilibrium, can have a significant effect on the output (a more nonlinear signal). In this context, it would not make sense anymore to consider the MAPK cascade as an invariable modular element.

4. Bistability: Reconsidering the de Angeli model

The foregoing discussion has established how a gradual signal of Mos, x , is transformed into a response downstream of the cascade. We now discuss what happens when this nonlinear signal transformation is embedded into a circuit via a feedback loop, see Fig. 2(C). In this loop, the cascade output interacts back on the input, x , and therefore favors the production of x , autoactivating the cascade.

In order to implement the feedback loop, one has to postulate a dynamics of Mos. Angeli et al. chose the phenomenological expression [15].

$$\dot{x} = -\gamma \frac{x}{K_2 + x} + \tilde{V}_0 z_3(x)x + \tilde{V}_1, \quad (33)$$

In this model, the first term describes the degradation of Mos with a Michaelis–Menten kinetics. The second term gives the feedback activation of Mos by MAPK, the output of the cascade. The function $z_3(x)$ can be calculated exactly for both the linear kinetics as well as for the Michaelis–Menten kinetics, as shown before. Finally, the last term in the equation describes a basal production of Mos due to translation from its mRNA. We note that the parameters in this equation have been renamed with respect to the equations before, taking into account that we had normalized the variables previously.

In a subsequent erratum published on their website, the authors modified this equation by changing the feedback term into $\tilde{V}_0 z_3(x)$. We now discuss the consequences of this change. We start out from a yet slightly modified version of the Mos-dynamics, namely

$$\dot{x} = -\gamma x + \tilde{V}_0 z_3(x)x, \quad (34)$$

i.e., we include only a linear degradation term in x , and drop the constant production term \tilde{V}_1 , since it has no qualitative effect on the dynamics.

Fig. 5 (top) shows the two curves γx and $\tilde{V}_0 z_3(x)x$ whose intersections determine the equilibria. It can be seen that there are at most two intersections, not three. This is due to the fact that for large x , since $z_3(x)$ saturates, both curves behave as linear functions with z_3 turning linear *from below*. Thus, there cannot be three solutions. This is even more apparent if one determines the mechanical potential W which is easy to do now, since the dynamics is one-dimensional, i.e., we have

$$\dot{x} = -\frac{dW}{dx}. \quad (35)$$

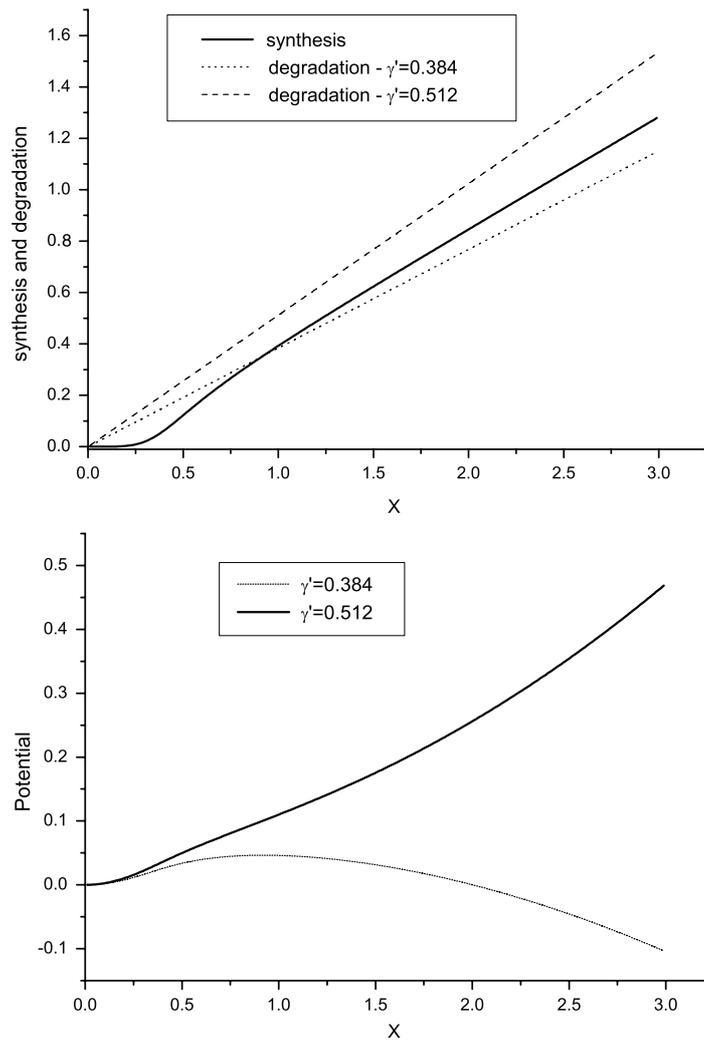


Fig. 5. Top: Stationary state conditions for the model by Angeli et al. Two intersections correspond to a stable and an unstable state. See bottom: Potential.

The potential $W(x)$ is shown in Fig. 5 (bottom). It shows either a single stable minimum at $x = 0$ or a stable minimum at $x = 0$ and an unstable maximum at a value $x = x_{um}$.

The effect of the modification of the feedback term made by Angeli et al. now becomes clear: it is needed in order to obtain three intersections, and hence an additional, stable minimum in $W(x)$. However, the mathematical expression given by Angeli et al. still has problems. First, it is not in accord with what is shown in Fig. 5c of their paper, since there a linear curve and the curve $z_3(x)$ are superimposed. This would correspond to our Eq. (34) with the production term modified as suggested by Angeli et al. However, this modification leads to yet another problem: it means that doubly-phosphorylated MAPK can act as a source for Mos, since $\dot{x} \sim z_3$.

In order to be in qualitative accord with the results deduced by Angeli et al. one can therefore suggest a phenomenological expression

$$\dot{x} = -\gamma x + \frac{\tilde{V}_0 z_3(x)x}{\tilde{K} + x} \tag{36}$$

which indeed does the give the three intersections, and hence two stable and an unstable solutions, as can be seen in Fig. 6, top and bottom.

The origin of this modeling ambiguity is easy to understand. If there is only one type of Mos considered, it has to be an active form, capable of initiating the cascade. On the other hand, if it is MAPK, z_3 , which activates Mos, there is evidently one species lacking, non-activated Mos. For this, one has to properly distinguish between two active forms, only one of which is stable. In order to make the Angeli et al. model more biologically realistic, therefore at least a distinction between a stable and a non-stable form of Mos is needed. Within the Angeli model, this can be implemented on the level of the degradation of Mos. We therefore close the paper by showing how the distinction between stable and non-stable Mos can lead to a switching of the cascade by acting on the degradation rate, γ .

The biological origin of this mechanism is easily justified, see the illustration in Fig. 7. At early times, non-stable Mos is produced from its mRNA stock and degraded by the proteasome. Upon phosphorylation, Mos is shielded against

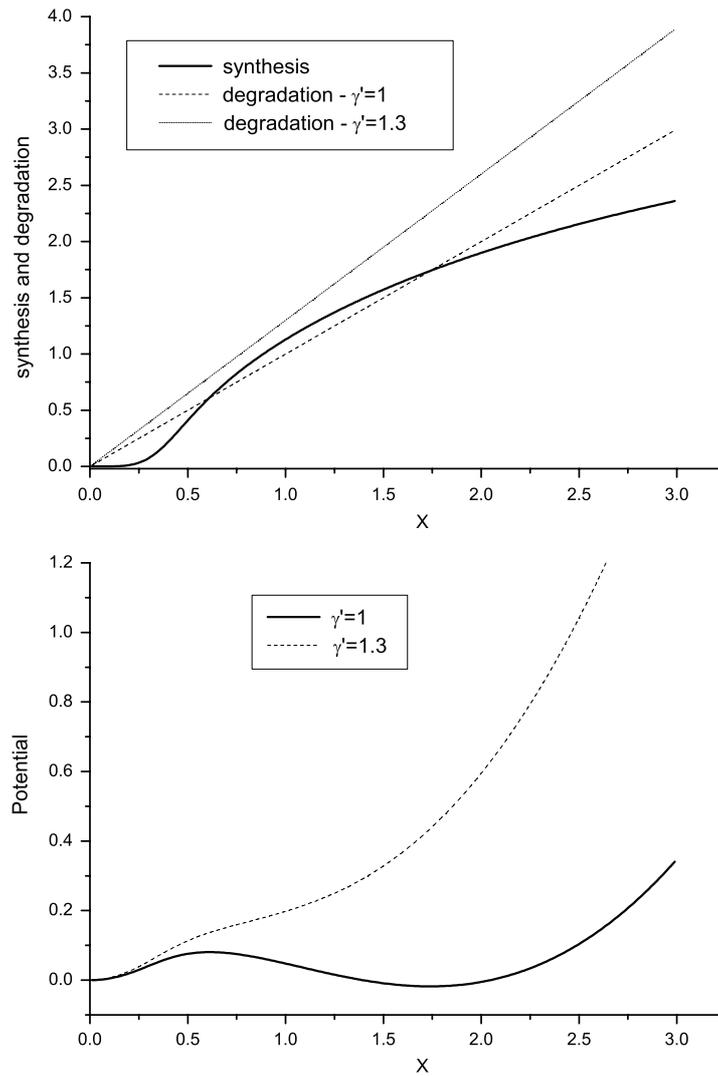


Fig. 6. Top: Stationary state conditions for the model given by Eq. (36). Three intersections exist. See bottom: Potential.

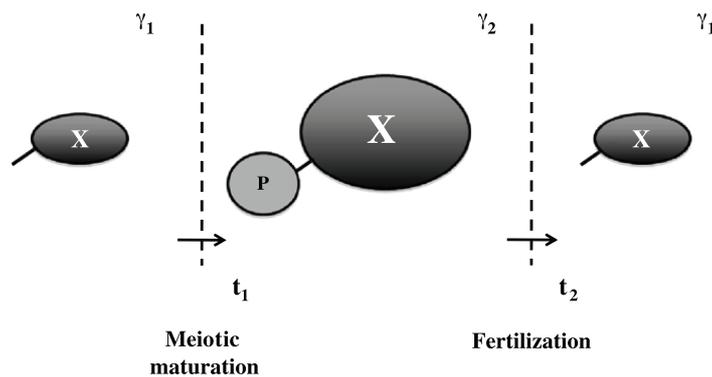


Fig. 7. The switching mechanism by modulating Mos-degradation.

degradation. Indeed, Mos stability is brought about by phosphorylation which leads to changes in the degradation rate of Mos [20]. Two types of kinases have been shown to be responsible for phosphorylation site modification on residues essential to Mos protein stability. These proteins are either components of the MAPK network or components of the M-phase Promoting Complex (MPF) [22,21]. Changes in Mos phosphorylation have been observed at two key steps in the oocyte cell cycle: (1), during meiosis resumption (G2/M cell cycle transition, here denoted by t_1) and, (2), upon fertilization (the metaphase–anaphase transition, here denoted by t_2). During the time interval $t_2 - t_1$, Mos is shielded against degradation, allowing its accumulation from its mRNA stock (note that this interval is on a timescale of 24 h). Upon dephosphorylation

the system goes back to a high degradation rate, driving the disappearance of Mos and the inactivation of Mos activity within 30 min [19,21].

When fertilization occurs, Mos is dephosphorylated and the system goes back to an effectively high degradation rate. Note that the interval $t_2 - t_1$ is on the timescale of 24 h, while the transition from high to low degradation is much faster (30 min).

This mechanism is easily implemented in the phenomenological model. As shown in Fig. 6, if the degradation rate is high, the two curves γx and $\sim z_3(x)x/(K + x)$ do not have any common intersection other than at zero: the switch is off. Upon a decrease in the degradation rate both curves can intersect, giving rise to the three intersections discussed before. Coming back to our model, Eq. (36), we recognize that it is indeed simplified in the sense that we had omitted a source for Mos, x , which is independent from MAPK. We now put it back in and neglect the presence of the MAPK-induced Mos production because all we need in order to realize the above scenario is a mechanism to modulate Mos concentration from low values (which corresponds to an effective high degradation rate) to high values (low rate of degradation) back to low values.

The ODE with an effective time-dependent degradation rate which contains a time-varying production and a constant degradation term has the very simple form

$$\dot{x} = -\gamma_{\text{eff}}x \equiv (m(t) - \gamma)x \quad (37)$$

where we suppose that for all times, $m(t) \leq \gamma$. The experimental observations allow to conclude a variation of $m(t)$ such that

$$\gamma_{\text{eff}}(t) = \gamma_1, \quad t < t_1, \quad t > t_2 \quad (38)$$

and

$$\gamma_{\text{eff}}(t) = \gamma_2, \quad t_1 < t < t_2 \quad (39)$$

with $\gamma_1 > \gamma_2$. We thus obtain a switching-on and -off of the cascade.

Since the change in the effective degradation rate is fast, the slope of the degradation curve changes quickly from a steep to a flat profile. Therefore, the barrier separating the two stable states becomes shallow and its location moves close to the minimum of $W(x)$ at low concentration of Mos (see Fig. 6). This switch enables the system to quickly exit from a now unstable state.

5. Conclusion

In this paper we have presented a discussion of a phenomenological model of the MAPK cascade. We have shown that the equilibrium states of the MAPK cascade can be determined exactly even for a model with Michaelis–Menten kinetics, a fact to our knowledge so far overlooked.

Linear and Michaelis–Menten kinetics lead to identical asymptotic Hill coefficients. The comparison of Hill coefficients from theory to experimental data, however, must be taken with caution, since the values seen in experiment are essentially effective exponents, i.e. most likely not in the proper asymptotic regime. In this respect it is therefore very important whether a linear or Michaelis–Menten kinetics is assumed.

Further, we have shown how a simple feedforward mechanism acting on the inner levels of the cascade can increase the cooperativity of the cascade. This is an important result since it means that a ‘simple’ rewiring of the cascade can increase cooperativity without the addition of new cascade levels or phosphorylation steps.

This result has two important consequences. The first is obviously again for experiment, since a high measured value of the Hill coefficient might need an explanation in terms of a more detailed study of the interactions in the network; such study is currently under way [18]. The second consequence arises for the notion of modularity. In its strongest interpretation one might wish to consider the MAPK cascade as an *invariable* module to be implemented in a network all ‘around it’. In order to optimize the response, the feedforward mechanism we propose can be advantageous, since it increases the cooperativity of the cascade, but it does so at an expense of cascade modularity. Our finding supports the idea that it is best to understand the cascade as a particular motif within a network: a motif which has no boundaries at any level to molecular interactions across the whole network.

Finally, we pointed out that the phenomenological modeling of the feedback loop which turns the MAPK cascade into a switch by selecting two out of an infinitude of possible states of the cascade needs to be done with caution. We have put forward a discussion which addresses some problems present in the model and its solution as presented by Angeli et al. The origin of this ambiguity is the fact that the model is too reduced: a proper distinction between the different states of Mos is needed. We have argued that the Angeli model needs at least a time-dependent degradation constant in order to properly account for the cascade dynamics.

Acknowledgment

CR gratefully acknowledges support through a grant from the French National Cancer Institute, INCa.

References

- [1] B.D. Gomperts, I.M. Kramer, P.E.R. Tatham, *Signal Transduction*, Academic Press, San Diego, 2002.
- [2] J.E. Ferrell Jr., *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 460.
- [3] J.E. Ferrell Jr., W. Xiong, *Chaos* 11 (2001) 227.
- [4] J.J. Tyson, K.C. Chen, B. Novak, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 221.
- [5] N. Sagata, et al., *Nature* 335 (1988) 519.
- [6] C.-Y.F. Huang, J.E. Ferrell Jr., *PNAS* 93 (1996) 10078.
- [7] N. Blüthgen, H. Herzel, 2nd Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks - Berlin: Logos, 55, 2001.
- [8] N.I. Markevich, J.B. Hoek, B.N. Kholodenko, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 353.
- [9] J. Gunawardena, *PNAS* 102 (2005) 14617.
- [10] W. Xiong, J.E. Ferrell Jr., *Nature* 426 (2003) 460.
- [11] B.N. Kholodenko, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1583.
- [12] X. Wang, N. Hao, H.G. Dohlmann, T.C. Elston, *Biophys. J.* 90 (2006) 1961.
- [13] N.I. Markevich, M.I. Tayganov, J.B. Hoek, B.N. Kholodenko, *Mol. Sys. Biol.* (2006) doi:10.1038/msb4100108.
- [14] A.C. Ventura, J.-A. Sepulchre, S.D. Merajver, *PLoS Comp. Biol.* 4 (2008) e1000041.
- [15] D. Angeli, J.E. Ferrell Jr., E.D. Sontag, *PNAS* 101 (2004) 1822.
- [16] U. Alon, *An Introduction to Systems Biology*, CRC Press, 2006.
- [17] M.H. Verlhac, et al., *EMBO J.* 19 (2000) 6065.
- [18] R. Beaujois, J.F. Bodart, (2009) unpublished.
- [19] J.-F. Bodart, S. Flament, J.-P. Vilain, *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2002) 570.
- [20] J. Sheng, A. Kumagai, W.G. Dunphy, A. Varshavsky, *EMBO J.* 21 (2002) 6061.
- [21] A. Castro, et al., *Mol. Biol. Cell.* 12 (2001) 2660.
- [22] W.T. Matten, T.D. Copeland, N.G. Ahn, G.F. Vande Woude, *Dev. Biol.* 179 (1996) 485.

Modularity within the MAPK cascade network

Author(s) : Blossey Ralf¹, Russo Christophe^{1,2} and Bodart Jean-François^{1,2,¥}.

1. Institut de Recherche Interdisciplinaire, CNRS FRE 2963, Nanosystèmes Biologiques, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.
2. Laboratoire de Regulation des Signaux de Division, EA 4020, building SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

¥ Corresponding author.

Category : Commentary.

Abstract :

There is currently an increasing interest in the notion of modules in biological networks. In a very general way, modules can be defined as compartmentalized sets of molecular devices with interconnected functions that perform complex tasks. The specific modularity of a network may then translate into cellular behaviors or phenotypes. The biological relevance of such a module seems thus evident, but its precise definition is less clear.

Here we comment on several aspects of modularity of the MAPK / Erk pathway in *Xenopus* oocytes, of which the basic cascade topology has been described more than a decade ago. Oocytes offer to study protein-protein interaction (PPI) networks and their functions during cell cycle transitions, independently of transcription. In these cells, the MAPK / Erk cascade may either be considered as one module among others in the MAPK family (vs JNK (Jun N-terminal Kinase) and p38MAPK pathways) or as composed of three modules reminding of domino toppling, where each module phosphorylates and activates the downstream one.

We demonstrate that the construction of modules and their interconnections are highly dependent on the biological questions addressed. Whereas two modules, (i) oncoprotein Mos (MAPK Kinase Kinase responsible for Erk cascade activation) and (ii) MAPK Kinase - MAPK - MAPK Activated Kinase, may be defined considering meiotic spindle morphogenesis in amphibian oocytes, these two modules are neither relevant nor sufficient to address both the regulation and the dynamics of this cascade within the same cellular model.

Modularity : A key notion for cell biology?

The advent of high-throughput technologies in biology is accompanied by a paradigm shift in the conceptual understanding of biological systems : systems biologists believe the answers to the key biological questions cannot be uncovered from a knowledge of all molecular details, but rather be obtained from an understanding of the concerted action of the molecules within the dynamic interactive networks they constitute in the cell. The shift from a molecular perspective to a network perspective has brought with it the transfer of concepts from computational disciplines to biology ; one such notion is modularity. Within computer science, « a module can be defined variously, but generally must be a component of a larger system, and operate within that system independently from the operations of the other components. » (Wikipedia). The transferral of this concept to biological systems at a molecular level may be appealing, but it is in practice less than obvious to implement. In fact, systems biologists try to find a descriptive level below conventional cellular structure and function which cannot be easily delimited and identified with specific (spatial) structures within the cell. Without a generally applicable rule, the concept of modularity is therefore strongly context–dependent, as we illustrate for the MAPK cascade.

MAPK cascade : pathways

In many cellular models, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) have been involved in cell cycle control, through the regulation of transcription (G1/S and early to mid G2 phases) or through non-genomic functions (late G2 and M phases). Among the numerous members of the MAPK family, different MAPK pathways can be distinguished and each such pathway may be regarded as a specific 'node' which integrates one or more stimuli (growth factors, inflammation, cytokines) and promotes different cellular responses (proliferation, differentiation, apoptosis, inflammation and / or angiogenesis).

Several MAPK pathways may then be distinguished through the involvement of specific molecules (although they are not necessarily independent): Erk 1/2 (Extracellular Regulated Kinases), JNK (Jun N-terminal Kinase), p38MAPK isoforms,

Erk3 and Erk5. Within each one of these pathways, three essential functional components can be noted, with which is associated the concept of phosphorylation cascade: a MEKK, a MEK and a MAPK. These three components may also be regarded as individually independent and then remind of domino toppling, where each component phosphorylates and activates the downstream one.

The functional organization of MAPK/Erk signal transduction pathway greatly enhances the sensitivity of cellular targets to external stimuli and leads to ultrasensitivity of Erk to the input signal; the basis of the topological representation has been performed ten years ago by Huang and Ferrell in *Xenopus* oocytes [1]. Levels of MAPK/Erk activity are not transitory or sustained but bistable in these oocytes. In somatic cells such as PC12 cells, the cellular effects of MAPK/Erk activation are dependent upon the configuration of the network the cascade is embedded in. On NGF stimulation, MAPK/Erk shows a sustain activation and leads to differentiation whereas EGF stimulation induced transitory response of MAPK/Erk and proliferation [2]. These dynamics originate from a configuration driven by the upstream processes activated by the receptors. EGF-dependent MAPK / Erk activation involves tyrosine-phosphorylation of EGF-receptor, SOS-dependent Ras activation, followed by the activation of Raf (MAPKKK / MEK Kinase). Transitory activation of MAPK / Erk results from a MAPK / Erk-dependent feedback inhibition of SOS. While NGF-dependent activation of MAPK / Erk also involves Ras, the Rap1 system mediates the sustain MAPK / Erk activation by activating B-Raf [3]. Depending upon the stimulation and the cellular context, the MAPK/Erk cascade may then be controlled by positive and/or negative feedback loops.

MAPK cascade: from pathways to networks

Vertebrate oocytes offer opportunities to study protein-protein interaction networks and their functions during M phase progression, independently of transcription, with an amenability that is not offered by somatic cells or *in vitro* systems. The paradigm of the *Xenopus* oocyte has been advantageously used to analyze the role of the Mos/MEKK – MEK – MAPK/Erk as well as the role of each component of this cascade in morphological events of M-Phase. During meiosis, the stability of MAPK/Erk activity for several hours, depending upon the accumulation of

the oncoprotein Mos, enables the cascade to perform or being involved in different successive tasks: spindle morphogenesis, replication inhibition and cytostatic activity establishment. The latter activity sets the arrest in metaphase II characteristic of most vertebrate oocytes [4, 5]. G2 arrested-synchronized oocytes in ovaries can easily be stimulated to enter MPhase through MEK1/2 or Mos overexpression or insulin stimulation (oocytes express endogenous IGF1 receptor) or even through progesterone stimulation (Ras-independent pathway) [4, 6, 7]. The model also offers impressive opportunities for studies at the biochemical level : oocytes contain high level of proteins (each oocyte contains for example 50 to 70 ng of the catalytic subunit of PKA), and enable to perform anti-MAPK immunoblotting on one-tenth of a single cell, allowing to study feed-back regulation in one cell [8].

In these cells, the Mos - MAPK/Erk cascade may either be considered alone or as a part of a protein-protein interaction network, involving JNK and p38MAPK cascades, which are both activated during meiosis resumption [9, 10]. In the latter case, it is to note that: (i) JNK may reinforce MAPK/Erk cascade ultrasensibility through MEK-phosphorylated JNK, which phosphorylates in turn Raf, another MEKK [11], (ii) the Mos - MAPK/Erk and the p38MAPK pathways converge to regulate the activation of the MPhase Promoting Factor (MPF). This heterodimer made up of a catalytic subunit, Cdk1, and a regulatory subunit, the Cyclin B, is negatively regulated by its phosphorylation *via* Myt1 or Wee1, and positively regulated by being dephosphorylated by the dual-phosphatase Cdc25 (4). p38MAPK? [10] and MAPK/Erk [12] may phosphorylate Cdc25 and then promote MPF activation whereas MAPK/Erk could also negatively regulate Myt1 activity, through its phosphorylation by Rsk, a MAPK activated protein kinase [13]. Moreover, the idea to consider the MAPK/Erk pathway itself as a network in vertebrate oocytes came from studies suggesting MAPK-independent roles or functions for Mos oncoprotein in amphibian and mice [14, 15].

Dealing with modules within the MAPK cascade network

While Mos - MAPK/Erk cascade plays a role *in vitro* and *in vivo* in the establishment of a bipolar axis during meiotic spindle morphogenesis (Figure 1A, [7, 16]), the cascade may not be considered as one single functional module for spindle morphogenesis (Figure 1B) but has to be split into two different modules. If Rsk has

been considered for a long time as the key-mediator or Mos effects, like in the establishment of the cytostatic activity [17, 18], Rsk is not sufficient on its own to promote spindle morphogenesis in absence of Mos : both Mos and Rsk appeared to be necessary and to play complementary roles in the establishment of the meiotic spindle bipolar axis [7]. From our experiments, two functional modules may be defined, as essentials for spindle morphogenesis in amphibian oocytes (Figure 1C). Nevertheless, these two modules are neither relevant nor sufficient to address both the regulation and the dynamics of this cascade within the same cellular model (Figure 1D).

Therefore, depending on context, the MAPK/Erk cascade may either be considered as a single functional module with pleiotropic cellular effects or as a network with pleiotropic cellular effects built from different functional modules.

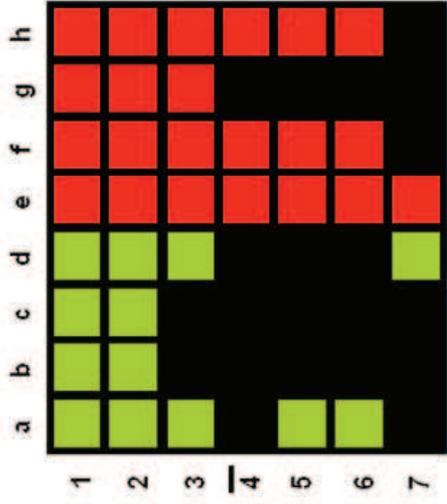
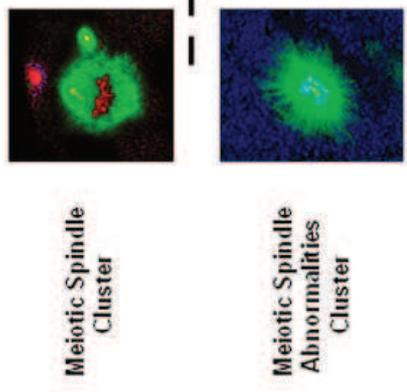
As a final note we remark that the indicated modules in Figure 1D are not homogeneous and are to be considered more than three push-pull modules connected in series: the MAPK/Erk module exhibits one input (MEK phosphorylation) while it has several potential outputs (Mos and Cdc25 phosphorylations) in addition to its main one (Rsk phosphorylation and activation). In contrast to the MAPK/Erk module, while showing at least two outputs (MEK and Myt1 phosphorylation), the Mos module exhibits several potential inputs (phosphorylation by MAPK/Erk, phosphorylation by MPF), in addition to the one driven by progesterone through the stimulation of Mos synthesis. Additional complexity arises from the orchestration of protein synthesis upregulation, chaperones activity and impairment of degradation mechanisms which together sustain the accumulation and activity of the oncoprotein Mos. In order to capture and experimentally test the meaningful definition of modules we are currently developing a detailed computational model for the regulatory roles played by Mos which in particular allows to uncouple the feedbacks involving the active and inactive form of Mos [19].

Acknowledgements : We thank R. Beaujois and J.-P. Vilain for critical review of the manuscript, discussions and comments. Our work is partially supported by the 'Ligue Régionale contre le Cancer'. C.R. is supported by a fellowship from the french National Institute of Cancer (INCa).

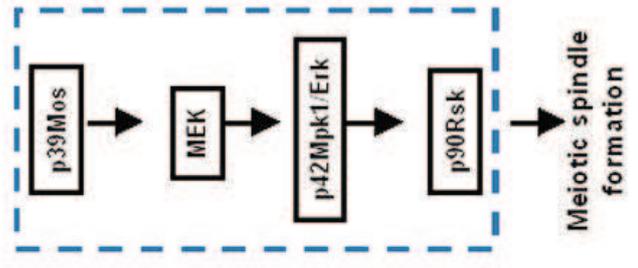
Figure 1: Building modules within the MAPK/Erk cascade network.

(A) Mos and Rsk are both required for meiotic spindle morphogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. MEK 1 & 2 chemical inhibitor U0126 and oligonucleotides antisense strategies were employed. Left side : experimental procedures. 1 = Morpholinos antisense oligonucleotides injection + DMSO (U0126 solvent) and progesterone coincubation ; 2 = Morpholinos antisense Mos oligonucleotides and murine Mos protein coinjection + progesterone incubation ; 3 = Rsk injection + U0126 and progesterone coincubation ; 4 = Morpholinos antisense Mos oligonucleotides injection + progesterone incubation; 5 = U0126 and progesterone coincubation; 6 = murine Mos protein injection + U0126 and progesterone coincubation ; 7 = Morpholinos antisense Mos oligonucleotides and constitutively active Rsk coinjection + progesterone incubation. On top of the diagram, proteins and cellular events considered: a = Mos oncoprotein, b = MEK, c = MAPK/Erk, d = Rsk, e = Germinal Vesicle Breakdown, f = microtubules nucleation, g = bipolar spindle organization, h = chromosomes condensation. Green: proteins are active, red : cellular events are complete, black : proteins are inactive or cellular events are not completed. Please report to [6, 7] for protocole details and data. Two clusters are defined according to treated oocytes exhibiting correct spindle formation (1-3) or showing spindle abnormalities (4-7). (B) Though the cascade Mos – MAPK/Erk itself may be considered as functional module, it may also be split into two functional modules (C). (D) Regulation motifs that have been reported for each molecule, drawing a complex pattern of interactions: Mos phosphorylates MEK and could promote MPF activation through Myt1 downregulation directly ; a short positive feedback loop has been described Adler and colleagues [11] at MEK level, involving JNK and Raf ; MAPK phosphorylates Mos directly and promotes Mos both stability and synthesis, but also may phosphorylate Cdc25 and then promote MPF activation ; Rsk activates MPF through Myt1 downregulation. Input = hormonal stimulation ; output = meiotic spindle formation, inhibition of DNA replication and establishment of cytostatic activity.

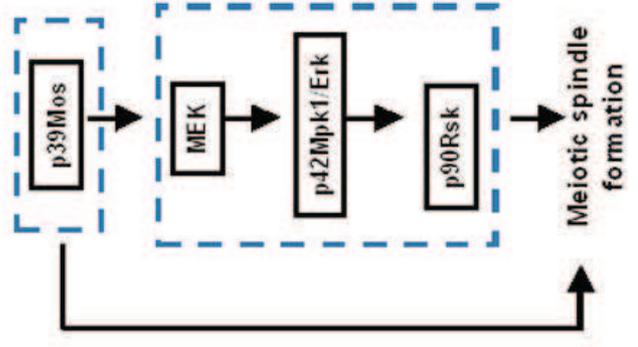
A



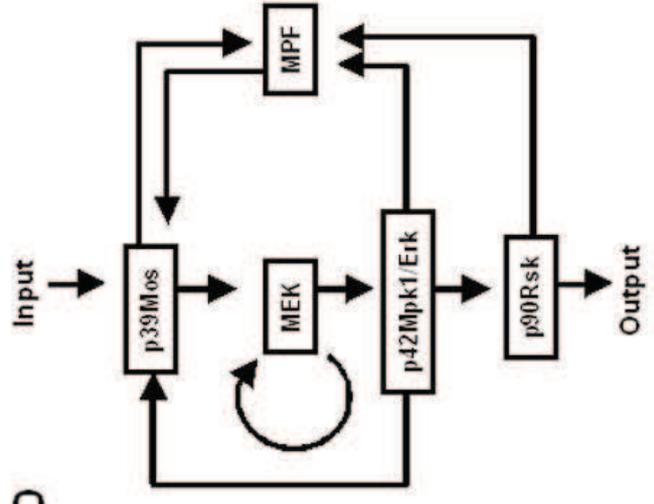
B



C



D



References

1. Huang, C. Y., and Ferrell, J. E., Jr. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10078-10083
2. Santos, S. D., Verveer, P. J., and Bastiaens, P. I. (2007) Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 9, 324-330
3. Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K., and Kuroda, S. (2005) Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* 7, 365-373
4. Haccard, O., and Jessus, C. (2006) Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle* 5, 1152-1159
5. Bodart, J. F., Flament, S., and Vilain, J. P. (2002) Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol Reprod Dev* 61, 570-574
6. Baert, F., Bodart, J. F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A., and Vilain, J. P. (2003) Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 278, 49714-49720
7. Bodart, J. F., Baert, F. Y., Sellier, C., Duesbery, N. S., Flament, S., and Vilain, J. P. (2005) Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 283, 373-383
8. Ferrell, J. E., Jr., and Machleder, E. M. (1998) The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 280, 895-898
9. Bagowski, C. P., Xiong, W., and Ferrell, J. E., Jr. (2001) 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, 1459-1465

10. Perdiguero, E., Pillaire, M. J., Bodart, J. F., Hennesdorf, F., Frodin, M., Duesbery, N. S., Alonso, G., and Nebreda, A. R. (2003) Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C. *Embo J* 22, 5746-5756
11. 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., and 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, 10784-10795
12. Wang, R., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Ashorn, C. L., Gallick, G. E., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W., and Kuang, J. (2007) Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* 128, 1119-1132
13. Palmer, A., Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1998) A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* 17, 5037-5047
14. 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
15. Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Kubiak, J. Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W., and Maro, B. (2000) Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J* 19, 6065-6074
16. Horne, M. M., and Guadagno, T. M. (2003) A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol* 161, 1021-1028
17. Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., and Sagata, N. (2007) A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446, 1100-1104

18. Nishiyama, T., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. (2007) Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytosstatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446, 1096-1099
19. Giuraniuc C., Russo, C., Bodart, J.-F., and Blossey R. (2007) On the Equilibria of the MAPK cascade, arXiv:q-bio/0702051, and in preparation.

Annexe C

Article accepté

La version d'un article accepté au journal "Human Frontier Science Program" (HFSP) est présentée ci-après.

Les figures sont situées hors du corps de texte en accord avec la procédure de soumission du journal.

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

C. Russo^{1,2,*}, R. Beaujouis^{2,*}, J.-F. Bodart² and R. Blossey¹

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*

(Dated: September 24, 2009)

Abstract

The MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) 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 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 towards a more complete and biologically realistic quantitative understanding of the dynamic interdependence of Mos and MPF in *Xenopus* oocytes.

* These authors contributed equally to the work.

PACS numbers:

INTRODUCTION

The MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) 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 MAPK 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; Horne and Guadagno, 2003; Bodart *et al.*, 2005), (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 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, Sagata *et al.*, 1989). In immature amphibian oocytes, Mos mRNA is stored but not translated. Upon hormonal 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 phosphorylation and MAPK activation.

Mos is not the only molecule implied in the activation of the MAPK cascade. Another

important actor is MPF (M-Phase Promoting Factor), 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). 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 an MPF-regulated stimulator of the MAPK activation during meiosis, though 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 non-degradable Cyclin B in these conditions prevented the loss of Mos (Hochegger *et al.*, 2001). 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 minutes (Watanabe *et al.*, 1989; Bodart *et al.*, 1999). Similarly, when chemical kinase inhibitors, like 6-dimethyl amino purine, impair MPF activity, Mos disappears 30 minutes 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 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 organised 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 (ODE's) for the concentrations of the molecules. Subsequently, the model is parametrized 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 Figure 1 A.

Firstly, a distinction between active versus non-active 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), though Ser-3 mutations were initially not reported to impair Mos activity, since Mos phosphorylation could be observed even in absence of catalytic activity of the protein (Freeman *et al.*, 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, (ii) inhibition of chaperone Hsp90 by geldanamycin 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.

Secondly, a distinction between stable versus non-stable Mos is made. The main residue involved in Mos stability appears to be Ser-3, though 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; Nishizawa *et al.*, 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 towards 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 MEK (Y_1, Y_2). Both X and X_a half-lives have been estimated to be about 30 minutes (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 Figure 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 , 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}), 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 non-phosphorylated form of the kinase, the singly-phosphorylated form of the kinase and the doubly-phosphorylated form of the kinase, the latter of which is only the 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 ordinary differential equations (ODE's):

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

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

$$\dot{[X_{as}]} = [X_a](k_3[MPF] + k_4[Z_3]) - k_5[P_x][X_{as}] \quad (3)$$

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

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

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

$$\dot{[Z_1]} = k_{15}[Z_2][P_z] - k_{12}[Z_1][Y_3] \quad (7)$$

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

$$\dot{[Z_3]} = k_{13}[Z_2][Y_3] - k_{14}[Z_3][P_z] \quad (9)$$

For this set of equations two relations of mass conservation exist (see eqs. (4)-(6) and (7) to (9)):

$$[Y_1] + [Y_2] + [Y_3] = [Y_T] \quad (10)$$

$$[Z_1] + [Z_2] + [Z_3] = [Z_T] \quad (11)$$

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 parameterization 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 concentration 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 ($k_{cat} = 0.064 \text{ s}^{-1}$) and MAPK phosphorylation by MEK ($k_{cat} = 0.06 \text{ s}^{-1}$), and the Michaelis-Menten constants associated with the affinity of the complex Mos/MEK ($K_M = 1200 \text{ nM}$) and the complex MEK/MAPK ($K_M = 300 \text{ nM}$). 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 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 $k_{8,\dots,15}$ constants. We remark that $k_8 = k_9$, $k_{10} = k_{11}$, $k_{12} = k_{13}$, $k_{14} = k_{15}$ 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 nM s^{-1}). We fixed $[P_y]=0.3 \text{ nM}$ 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 $[P_z]=120 \text{ nM}$, 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

Name	Value	unity	reference
k_8, k_9	0.0000533	$nM^{-1}s^{-1}$	Angeli <i>et al.</i>
k_{10}, k_{11}	0.0139	$nM^{-1}s^{-1}$	Angeli <i>et al.</i>
k_{12}, k_{13}	0.0002	$nM^{-1}s^{-1}$	Angeli <i>et al.</i>
k_{14}, k_{15}	0.0000139	$nM^{-1}s^{-1}$	Angeli <i>et al.</i>
$[Y_T]$	1200	nM	Huang & Ferrell, Angeli <i>et al.</i>
$[Z_T]$	300	nM	Angeli <i>et al.</i>
$[P_x]$	0.3	nM	Huang & Ferrell
$[P_y]$	0.3	nM	Huang & Ferrell
$[P_z]$	120	nM	Huang & Ferrell

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

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

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

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 behaviour 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 Figure 2 A-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 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 (Guidi and Goldbeter, 1997).

The behaviours in regions II and III are further illustrated in Figures 2 B and 2 C. Figure 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 (shown in black, Figure 3 A) or not (red, Figure 3 B). 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 semi-quantification and normalization, and no significant differences were observed in Mos levels between U0126-treated oocytes and control oocytes treated with DMSO vehicle (Figure 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 Figure 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 insuline 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 Figure 1 B) and the dynamic of Mos accumulation was monitored (Figures 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 GVBD) was about 4 hours post-injection 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 hours and 3 hours post-cytoplasm-injection in control and U0126-treated oocytes. Activity of MPF was sustained in control oocyte whereas it is observed to faint 7-8 hours post-injection as attested by both rephosphorylation of Cyclin

B2 and decrease in Cyclin B2 levels (Figure 5 A). Such observation is in accord with loss of MPF activity in U0126-treated oocytes stimulated by progesterone (Figure 6) and is explained by MAPK involvement in Cyclin B synthesis and MPF up-regulation (Palmer *et al.*, 1998; Abrieu *et al.*, 2001).

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. Non-treated cytoplasm injected oocytes exhibited a level of Mos slightly inferior at 4 hours and slightly superior at 6 hours 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 hours. 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 Figure 4, 5 represent the network structure of the MAPK cascade activation in *Xenopus* oocytes. The black 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 blue 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 Figure 4, 5 illustrate the time evolution of the total active form of Mos ($X_a + X_{as}$) calculated with two time-dependent variations of 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 non-active), 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 Figure 4 A, we note that two hours 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 concentration (grey 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 Figure 5 C. In this set of experiments the variability of the experimental signal over a timescale 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, Figure 4 C), we found a good correlation between the quantified Mos amount and the expected one: both exhibit accumulation of the oncoprotein Mos. In 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 presence of MEK-inhibitor U0126 (50 μ M) is depicted in Figure 6 A-C. This experimental condition allows to turn MPF activation into a single peak: MPF activity had been reported to peak around GVBD time and drop 1 to 2 hours after GVBD (Gross et al., 2000). In our hands, when oocytes were stimulated by progesterone in presence of U0126, fully-phosphorylated CyclinB2 were observed at $0.718 \text{ GVBD}50 \pm 0.046$, attesting MPF activation. A decrease in the amount of Cyclin B2 detected by western blot, due to its degradation, was observed at about $1.14 \text{ GVBD}50 \pm 0.04$. Mos accumulation was assessed as previously described and progesterone-stimulated oocytes at GVBD were used as a control for semi-quantification and normalization. Mos semi-quantification 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 (Figure 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 Figure 6 C is a consequence of the better statistics obtained over the time course, since the size of the oocyte population in Figures 4 C, 5 C and 6 C is identical. However, as shown by way of example in Figure 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 $0.728 \text{ GVBD}50 \pm 0.09$, almost simultaneously to detection of MPF under its active state, while the second peak is observed at $1.039 \text{ GVBD}50 \pm 0.085$, 4.5 hours 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 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 behaviour potentially important for the explanation of such features. Going back to the case of hormonal stimulation shown in Figure 6, while we observe an excellent agreement of the overall behaviour of Mos over an extended time-scale shown in Figure 6 C, still a significant variability on the level of individual animals persists, as exemplified in Figure 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 Figure 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, USA). Rabbit polyclonal anti-phospho-Tyr15-Cdc2 antibody was purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology™ USA) and rabbit polyclonal anti-CyclinB2 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 g.L⁻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). Fullygrown stage VI oocytes according to Dumonts classification, were isolated and follicle cells were partially removed by a collagenase treatment for 30 min (1 mg.mL⁻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 μ M 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). U0126 was prepared in DMSO and used at a final concentration of 50 μ M. Treatments began over-night before Progesterone addition or Cytoplasm injection. Control oocytes were treated with an identical amount of DMSO (1 ‰). Kinetic of Germinal Vesicle Breakdown (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, 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, CyclinB2 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) non-fat milk in TBS (Tris-buffered saline)-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min. Rabbit polyclonal anti-Mos(xe) (1/500), anti-Phospho-Tyr15-Cdc2 (1/5000) (not shown), anti-tubulin (1/5000) primary antibodies were incubated over-night at 4°C. Mouse monoclonal anti-Erk2 (1/500), Rabbit polyclonal anti-Rsk1 (1/500) and anti-CyclinB2 (1/1250) antibodies were incubated 2 hours at room temperature. 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. 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 (O.D.) measurement using Quantity One V4.21 1-D 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 quantitated in each plot. It corresponds to the intensity data (Mos O.D.) 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 non-data background pixels included in the volume quantification after area drawing. Data treatment is multi-step : (i) we subtracted local background from volume intensity for each plot, (ii) we subtracted global gel background from every volume intensity, (iii) we finally normalized Mos O.D. = 1 relative to a standardized positive control sample (i.e. progesterone stimulated control oocytes). We chose O.D. 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 doesn't occur during *Xenopus* oocyte maturation, we considered this protein as a representative loading control to adjust Mos semi-quantification 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, 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 softwares 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, $[X] = [X_a] = [X_{as}] = 0$ nM. This choice corresponds to an initiation of the cascade in absence of Mos protein and without phosphorylated forms of MEK and MAPK.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work by CR was supported by a doctoral grant from the French National Cancer Institute (INCa). Rémy 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 programme 2008.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- 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**: 257-267
- 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
- Angeli D, Ferrell JE Jr, Sontag ED (2004) Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1822-1827
- Baert FY, 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
- 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) Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol Reprod Dev* **61**: 570-574
- Bodart JF, Baert FY, Sellier C, Duesbery, NS, Flament S, Vilain JP (2005) Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **283**: 373-383
- Brandman O, Ferrell JE Jr, Li R, Meyer T (2005) Interlinked fast and Slow Positive Feedback Loops Drive Reliable Cell Decisions. *Science* **310**: 496-498
- Castro A, Peter M, Lorca T, 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, 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, MacNicol AM (2006) Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* **25**: 2792-801.
- Chen M, 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, Bonnac G, Tardivel A, 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, Evans MJ (1994) Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* **370**: 65-68

Cowley S, Paterson H, Kemp P, 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, Richter JD (1997) The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **17**: 6419-6426

Dupré 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

Ermentrout B (2007) XPPAUT. *Scholarpedia* **2**: 1399

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

Ferrell JE Jr, 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, 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, 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, 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, Donoghue DJ (1992) Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mos protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytoskeletal factor. *J Cell Biol* **116**: 725-735

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

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

Giudi GM, 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, 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, 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 *et al* (1994) Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. *Nature* **370**: 68-71

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

Horne MM, 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, 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, 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

Ishida N, Tanaka K, Tamura T, Nishizawa M, Okazaki K, Sagata N, 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, Shokat KM (2009) Tuning the activation threshold of a kinase network by nested feedback loops. *Science* **324**: 509-511

Kajiura-Kobayashi H, Yoshida N, Sagata N, Yamashita M, 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, 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, Arlinghaus RB (1990) Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene* **5**: 171-178
- Ma C, Cummings C, 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, 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, Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**: 129-145
- 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
- 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
- Mendez R, Hake LE, Andresson T, Littlepage LE, Ruderman JV, Richter JD (2000) Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **404**: 302-307
- Nebreda AR, 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
- Nebreda AR, Gannon JV, 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
- 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**: 2433-2446
- 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**: 4021-4027

Palmer A, Gavin AC, 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, 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, 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, Vande Woude GF (1988) Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* **335**: 519-525

Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y (1989) The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342**: 512-518

Sheets MD, Wu M, Wickens M (1995) Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature* **374**: 511-516

Sheng J, Kumagai A, Dunphy WG, Varshavsky A (2002) Dissection of c-mos degran. *EMBO J* **21**: 6061-6071

Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y, Sagata N (1989) Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **342**: 505-511

Tyson JJ (1991) Modeling the cell division cycle: cdc2 and cyclin interactions. *Proc Natl Acad Sci* **88**:7328-7332

Wu JQ, Kornbluth S (2008) Across the meiotic divide - CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *J Cell Sci* **121**: 3509-3514

Xiong W, Ferrell JE Jr (2003) A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell-fate decision. *Nature* **426**: 460-465

Yew N, Mellini ML, Vande Woude GF (1992) Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature* **355**:, 649652

Yue J, Ferrell JE Jr (2006) Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol Cell Biol* **26**: 5300-5309

Zeeb M, Balbach J (2005) NMR spectroscopic characterization of millisecond protein

folding by transverse relaxation dispersion measurements. *J Am Chem Soc* **127**: 13207-13212

FIGURE CAPTIONS

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 CK2 β . 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} towards 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 stand for the three corresponding phosphorylation states of Mos, MEK and MAPK, respectively.

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).

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%, green) and in U0126-treated oocytes (50 μ M, red). 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.

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 (blue dashed line); (C) Normalized values for Mos from western blots, theoretical time evolution of the concentration of MPF 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.

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 (red dashed line). MPF activation is achieved in the absence of input as described in (A) and MPF is proposed to interact with S (blue 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, 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.

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 (red dashed line). 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, and total active form of Mos ($X_a + X_{as}$).

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.

A

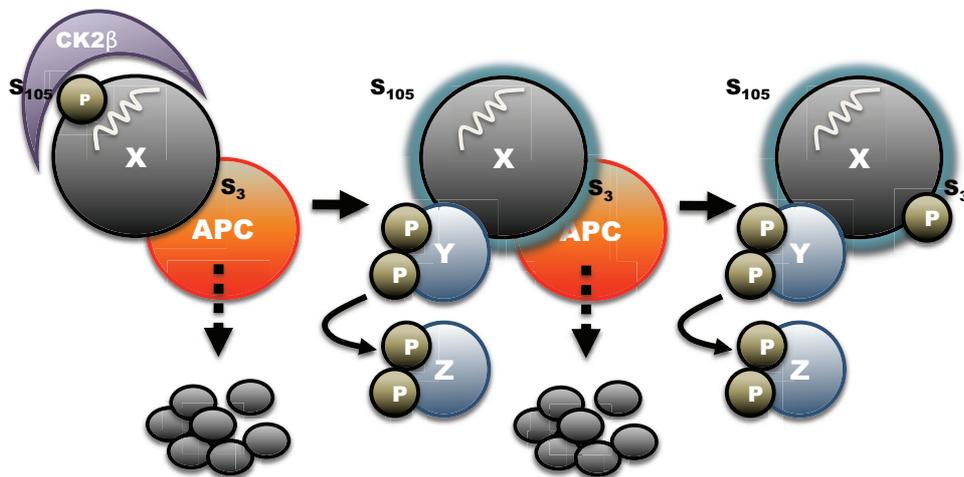


Figure 1A

B

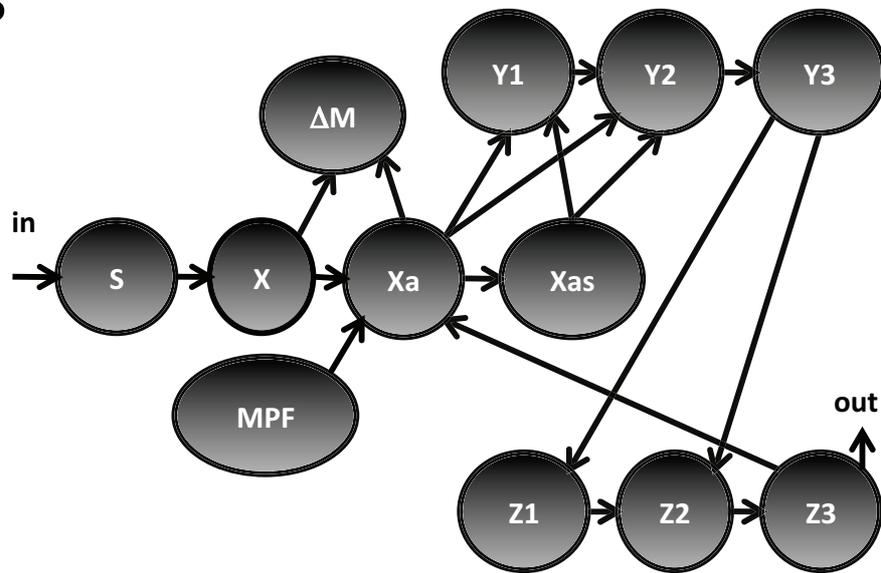


Figure 1B

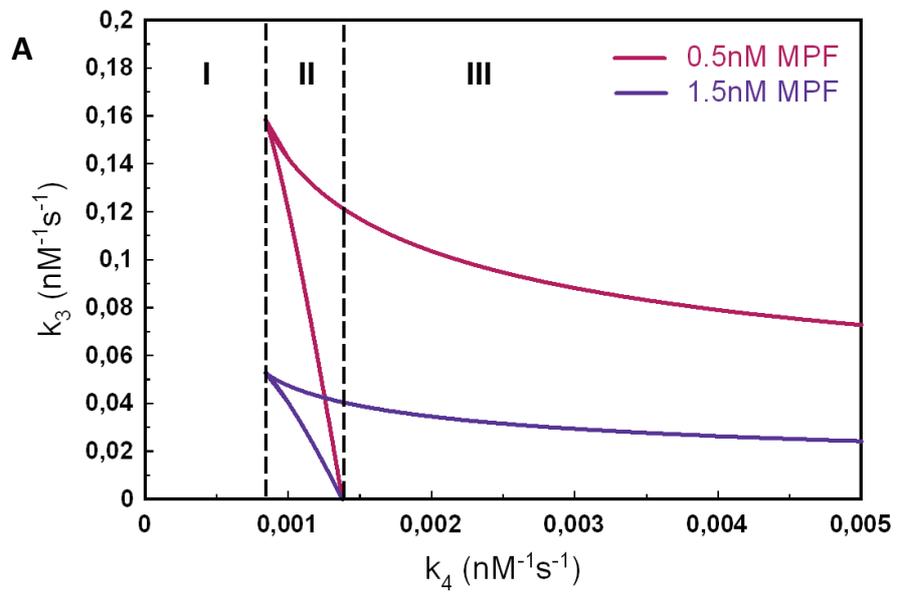


Figure 2A

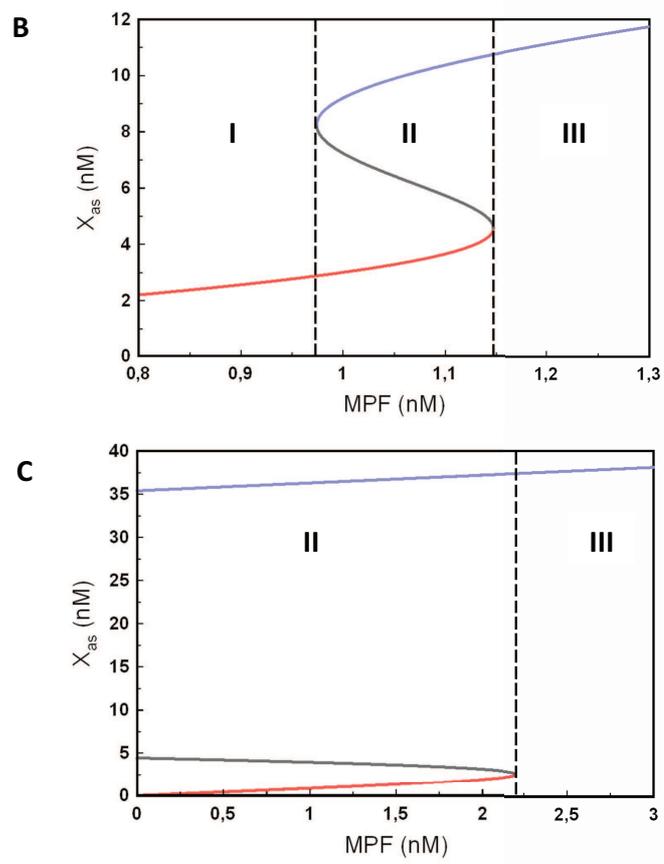


Figure 2B, C

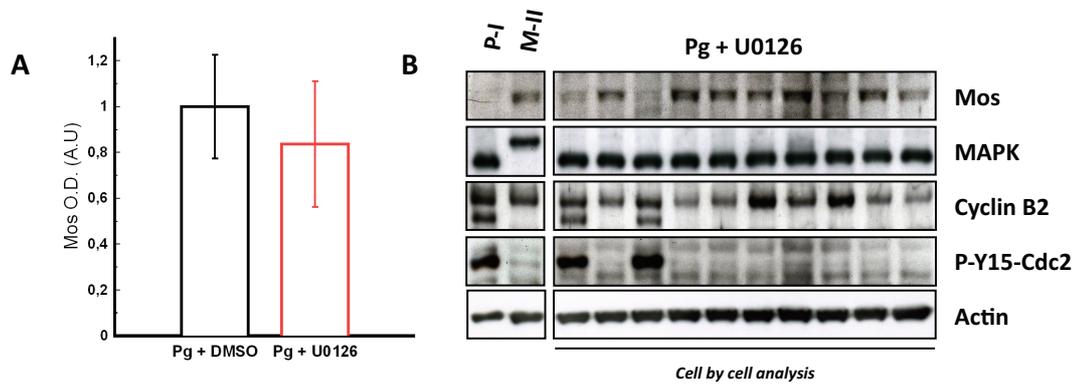


Figure 3

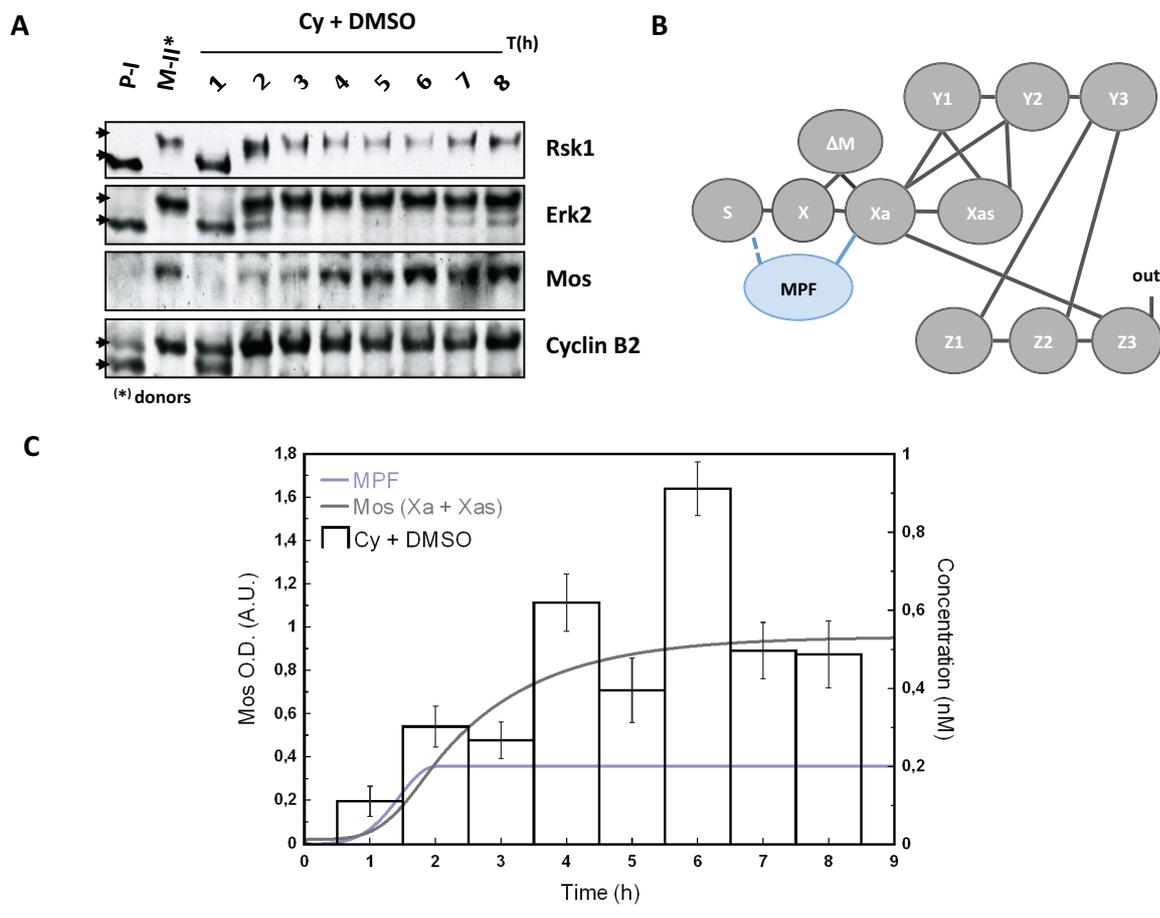


Figure 4

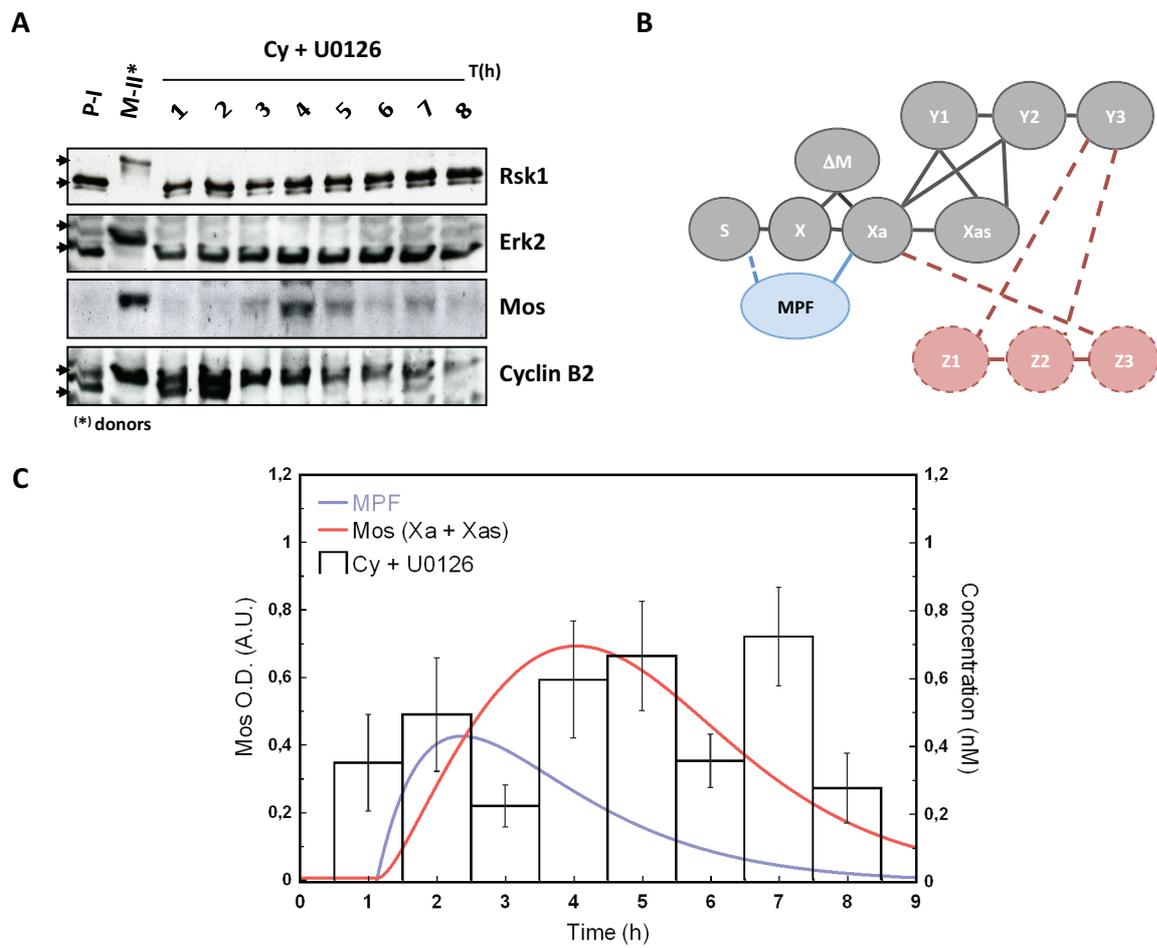
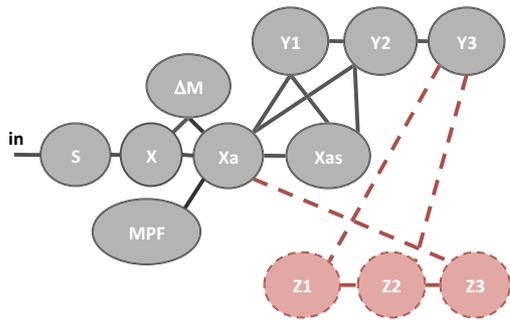
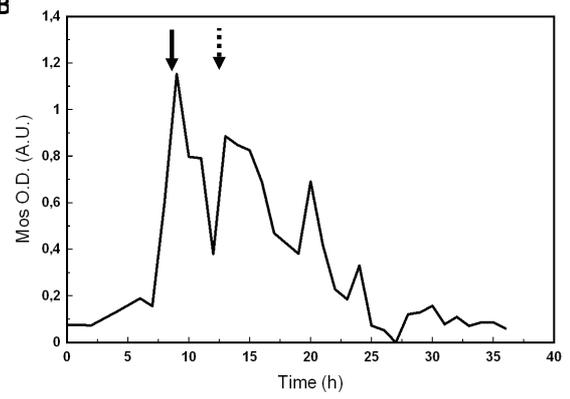
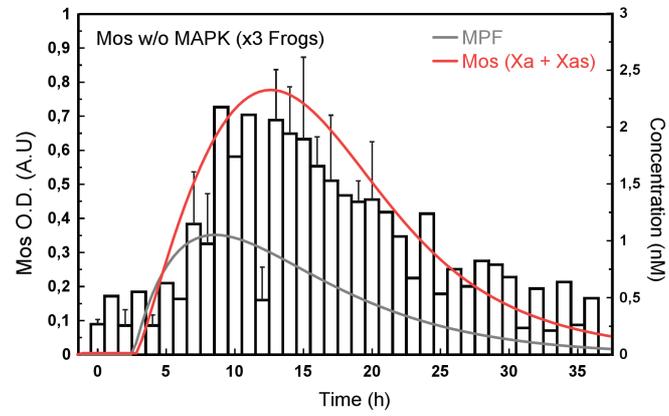


Figure 5

A**B****C****Figure 6**

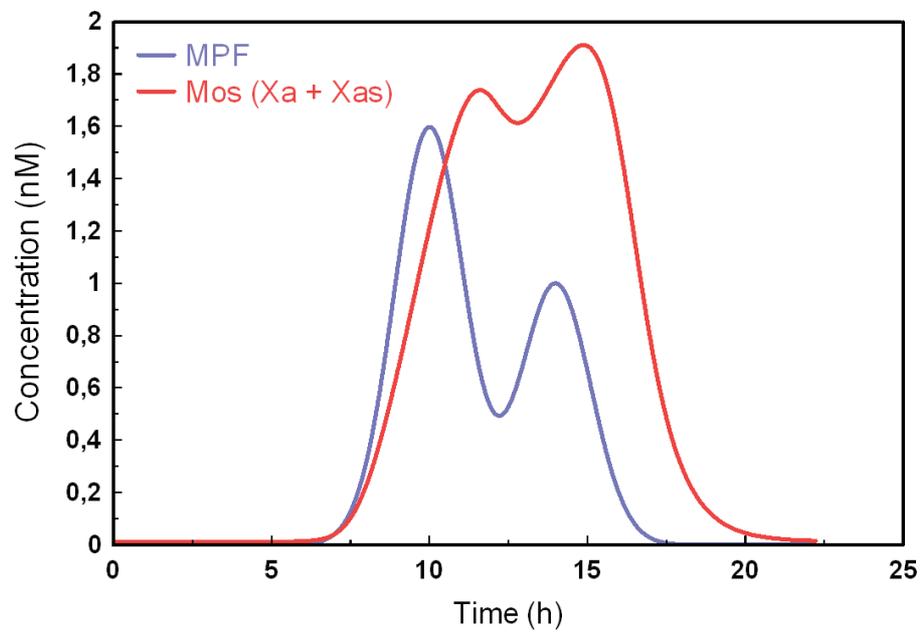


Figure 7

Annexe D

Dynamique d'activation ultrasensible de MAPK/Erk2 induite par la 1,10-phénanthroline monohydrate dans les ovocytes de Xénope

Les données non publiées présentées ci-après font l'objet d'une préparation d'article. Elles ont été réalisées en collaboration avec Rémy Beaujois, Edith Browaeys, Katia Cailliau-Maggio, Franck Riquet du Laboratoire de Régulation des Signaux de Division ; et Dorothee Vicogne Dorothee de l'unité "Multicellular Dynamics Group", Institut de Recherche Interdisciplinaire. Cet travail a bénéficié de l'aide technique apportée par A. Rousseau-Lescuyer et du travail d'une étudiante en M1, Mlle Djamila Rahli.

D.1 Introduction

Afin d'étudier le rôle de la Mos dans le recrutement de motifs de régulation des MAPK/Erk, et de la dynamique d'activation des MAPK, diverses méthodologies ont été testées pour activer la voie MAPK indépendamment de la synthèse de Mos. Un chélateur de zinc, la 1,10-phénanthroline monohydrate (1,10-PA), a été utilisé à cet effet.

En 2003, les travaux de Watanabe *et al.* ont suggéré que la chélation du zinc par la 1,10-phénanthroline monohydrate entraîne la phosphorylation des MAPK. Les travaux réalisés au laboratoire (Beaujois *et al.*, en préparation) démontrent que les mécanismes par lesquels agit la 1,10-phénanthroline conduisent une forte activation des MAPK sur de très long temps de culture (entre 32 et 48 h après incubation). L'activation des MAPK par la 1,10-phénanthroline dépend de la chélation du zinc, et de l'activation de MEK. Cette activation de MAPK reste néanmoins indépendante de l'accumulation de Mos ou de toute synthèse protéique, ainsi que de la production de ROS (reactive oxygen species). Dans ce contexte, l'activation du MPF n'est jamais observée et serait due à l'inhibition de Cdc25 par la chélation du zinc. En effet, Cdc25 est une phosphatase dont l'activité catalytique nécessite la présence de zinc (Sun *et al.*, 2007).

D.2 Analyse cellule par cellule des effets de la 1,10-Phenanthroline

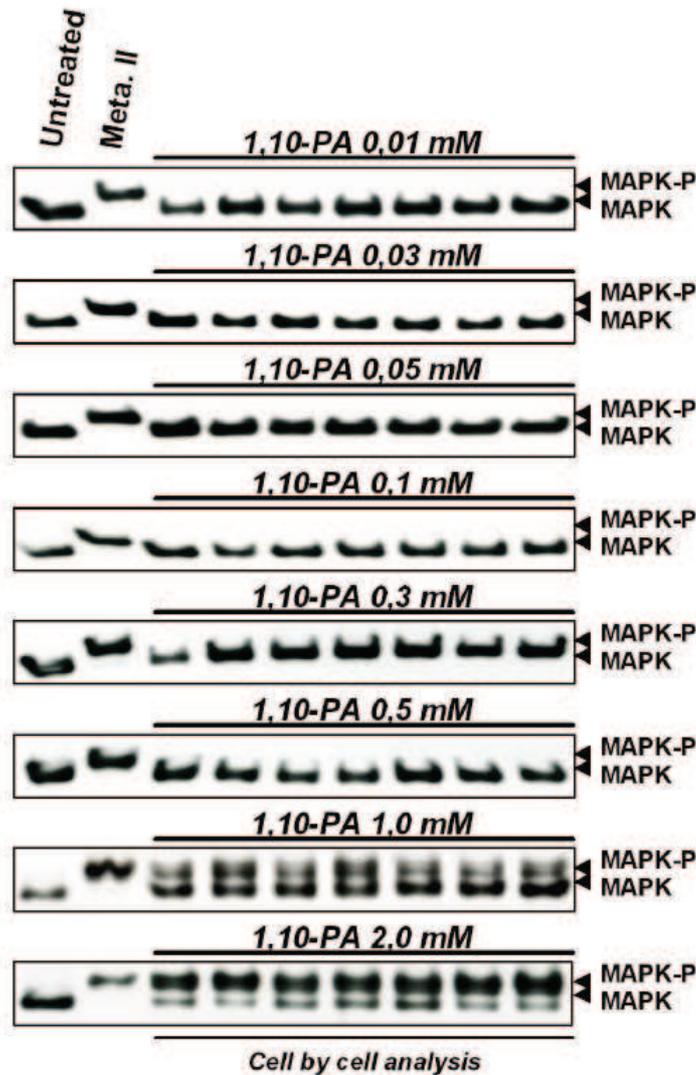


FIG. D.1 – Analyse par immunoempreinte du profil électrophorétiques de MAPK/Erk issus de 376 ovocytes (N = 5 femelles), cellule par cellule, traités par la 1,10-PA.

Pour étudier plus finement la dynamique de réponse des MAPK stimulée par la 1,10-PA, nous avons réalisé une étude cellule par cellule. Ainsi, les profils électrophorétiques de MAPK/Erk issus de 376 ovocytes (N = 5 femelles) traités par la 1,10-PA ont été analysés individuellement par immunoblot (figure D.1). L'analyse des immunoblots est réalisée sur logiciel à partir des bandes de MAPK et de phospho-MAPK issues de chacune des cellules traitées par la 1,10-PA. À de faibles concentrations en 1,10-PA (entre 0,01 et 0,5 mM), 15 à 40% de la population des ovocytes présentent une faible phosphorylation

de MAPK, soit 11 à 20% de phosphorylation par cellule. Cette phosphorylation peut cependant être négligée, et peut s'expliquer par la présence de bruit de fond sur les films. À une concentration de 1 mM, 34% des ovocytes présentent de 31% à 50% de phospho-MAPK ; et 33% des ovocytes analysés présentent une phosphorylation de 51% à 60% de leur population en MAPK. Enfin, à 2 mM, la majorité des MAPK/Erk est activée dans des cellules : 56% des cellules montrent 81 à 100% de MAPK phosphorylées ; et 38% des ovocytes présentent 61% à 80% de MAPK phosphorylées (figure D.2).

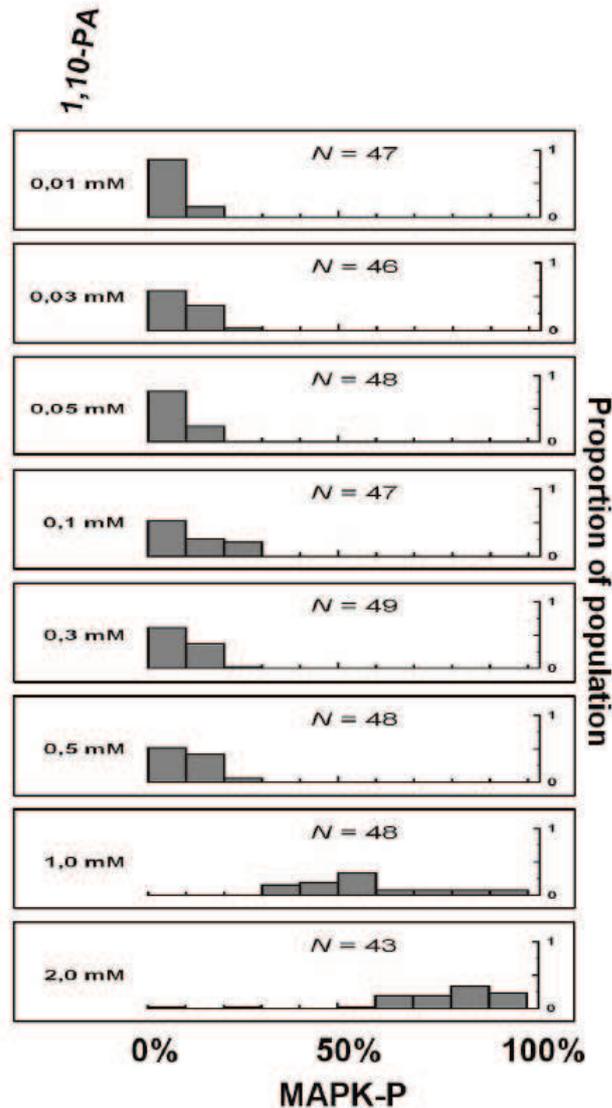


FIG. D.2 – Pourcentage de MAPK activé en fonction de la concentration de 1,10-PA.

Des ovocytes traités en progestérone ont été également analysés individuellement. Après maturation, ces derniers ovocytes ne présentent que la forme active phosphorylée de Erk en immunoblot (non montré), résultats en accord avec des données précédemment rapportées (Ferrell et Machleder, 1998).

D.3 Détermination de la nature de la réponse des MAPK à la 1,10-phénanthroline

La fraction en MAPK phosphorylé est d'abord moyennée pour chaque concentration en phénanthroline, et est reportée sur graphe (figure D.3). Les taux de phospho-MAPK varient de façon négligeable pour les concentrations en 1,10-PA allant de 0,01 à 0,5 mM. Dans ces conditions, les MAPK ne sont pas phosphorylées. À 1 mM de 1,10-PA, une moyenne de 58% de MAPK actives par cellule est déterminée. À 2 mM de 1,10-PA, 78% des MAPK sont phosphorylées par cellule. La courbe expérimentale (figure D.3) est ensuite soumise à une méthode statistique d'ajustement par l'intermédiaire du logiciel Gnuplot (développé par Thomas Williams, Colin Kelley *et al.*). Une courbe sigmoïdale théorique a été définie, et comparée à notre résultat expérimental (figure D.3). La fonction de notre courbe théorique est la suivante :

$$F(x) = \frac{V \cdot x^n}{x^n + a^n} + b$$

En nous référant à l'équation de Hill, $F(x)$ correspond à la réponse du substrat en pourcentage de phospho-MAPK ; x , à la concentration en 1,10-PA (mM) ; a , au K_a ; et l'indice n , au coefficient de Hill. Dans cette fonction, les facteurs V et b symbolisent les valeurs maximale et minimale de réponse en phospho-MAPK, c'est-à-dire des moyennes respectives de 78% et 8% de MAPK actives par cellule. La valeur de $K_a = 0,895845 (+/-0,06974)$ obtenue par cette méthode d'ajustement peut être vérifiée expérimentalement par la détermination de l'EC50 sur la courbe. Enfin, la valeur du coefficient de Hill déterminée s'élève à 6,20552 (+/-1,249). L'analyse cellule par cellule du profil des MAPK démontre donc que les cellules répondent de manière ultrasensible à la phénanthroline, même si les deux formes de MAPK (phosphorylée et non phosphorylée) sont parfois retrouvées en proportions équivalentes dans une même cellule.

D.4 Discussion

La figure D.3 permet de visualiser le profil d'activation des MAPK en fonction de la concentration de 1,10-phénanthroline. La valeur estimée du coefficient de Hill est de 6,20552 (+/-1,249). Cette valeur nous informe sur le caractère ultrasensible de la réponse des MAPK suite à une stimulation des ovocytes par notre chélateur du zinc. En effet, le coefficient obtenu durant ce travail est très élevé, même s'il reste inférieur à celui qui définit la coopérativité entre le progestérone et les MAPK ($n = 42$). Une réponse ultrasensible peut donc être générée en absence de l'activateur principal de la cascade, et en absence de rétro-contrôle. Cette réponse ultrasensible en absence de rétro-contrôle est surprenante

parce qu'en absence de synthèse protéique, l'activation des MAPK *in ovo* par une protéine de synthèse malE-Mos ne fournit qu'un coefficient de Hill égal à 3 (Ferrell et Machleder, 1998).

La réponse moins abrupte des cellules à la 1,10-phénanthroline par rapport à la progestérone pourrait néanmoins s'expliquer par l'absence de rétro-contrôles exercés *via* la synthèse protéique. En effet dans les ovocytes traités par la progestérone, deux boucles de rétro-contrôles positives entretenues par le MPF et MAPK viennent renforcer l'activation de la cascade en stimulant la synthèse de Mos, et en la stabilisant.

Dans les ovocytes traités par 1,10-phénanthroline, le MPF n'est pas activé et la synthèse protéique est inhibée sous l'action chélatrice de zinc. Dans ces conditions, la cascade n'est pas stimulée par Mos, et la réponse ultrasensible des MAPK est diminuée ($n = 6,2$).

Les mécanismes d'action de la 1,10-PA restent à élucider. L'hypothèse d'action la plus probable est l'inhibition, par la chélation du zinc, d'une phosphatase impliquée dans la régulation des MAPK. Cet effet pourrait être analogue à celui observé pour la Cdc25 (Sun *et al.*, 2007). Cette hypothèse est en cours d'évaluation par l'utilisation d'un inhibiteur de protéines tyrosine phosphatases (PTP) dérivé de la 1,10-PA : le bpV(phen). L'inhibition d'une phosphatase par le bais de la 1,10-PA pourrait expliquer l'ultrasensibilité de la réponse caractérisée. Enfin, une analyse approfondie du rôle de la bpV(phen) dans les ovocytes de Xénope nous indiquera si la réponse des MAPK est en tous points similaire à celle observée en présence de la 1,10-phénanthroline.

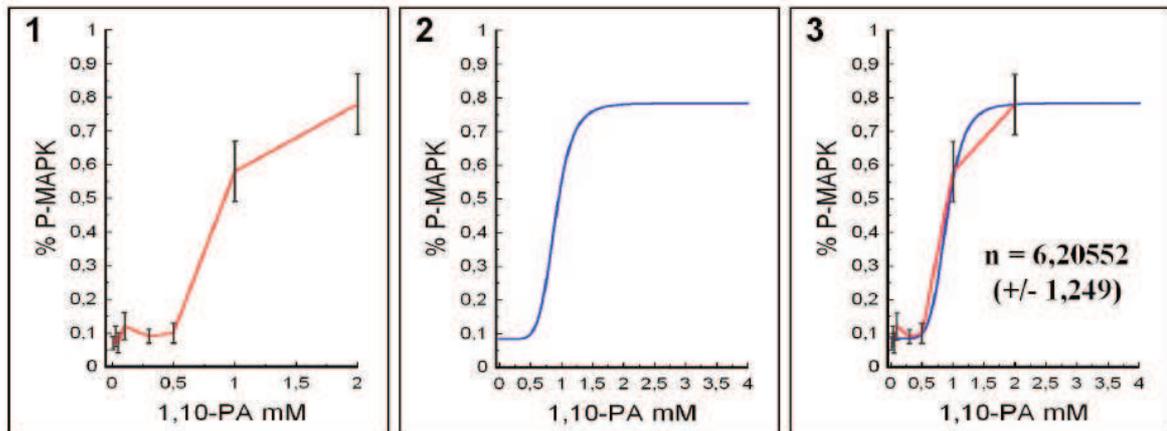


FIG. D.3 – Variation de la proportion théorique et expérimentale de MAPK phosphorylé en fonction de la concentration en 1,10-PA.

Bibliographie

- A. ABRIEU, T. BRASSAC, S. GALAS, D. FISHER, J.-C. LABBE et M. DOREE : 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. *Journal of Cell Science*, 111(12):1751–1757, 1998.
- A. ABRIEU, M. DOREE et D. FISHER : The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci*, 114(Pt 2):257–67, 2001.
- A. ABRIEU, T. LORCA, J. C. LABBE, N. MORIN, S. KEYSE et M. DOREE : 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):239–46, 1996.
- V. ADLER, Y. QU, S. J. SMITH, L. IZOTOVA, S. PESTKA, H. F. KUNG, M. LIN, F. K. FRIEDMAN, L. CHIE, D. CHUNG, M. BOUTJDIR et M. R. PINCUS : 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(32):10784–95, 2005.
- G. ALEXANDRU, W. ZACHARIAE, A. SCHLEIFFER et K. NASMYTH : Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J*, 18(10):2707–21, 1999.
- David ANGELI, J. E. FERRELL et Eduardo D. SONTAG : Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):1822–1827, Feb 2004. ISSN 0027-8424.
- F. BAERT, J. F. BODART, B. BOCQUET-MUCHEMBLED, A. LESCUYER-ROUSSEAU et J. P. VILAIN : Xp42 (Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated xenopus oocytes. *J Biol Chem*, 278(50):49714–20, 2003.
- C. P. BAGOWSKI et Jr. FERRELL, J. E. : Bistability in the JNK cascade. *Curr Biol*, 11 (15):1176–82, 2001.
- W. L. BAI, B. SINGH, W. L. KARSHIN, R. A. SHONK et R. B. ARLINGHAUS : Phosphorylation of v-mos ser 47 by the mitotic form of p34cdc2. *Oncogene*, 6(10):1715–23, 1991.

BIBLIOGRAPHIE

- E. BALTUS, J. BRACHET, J. HANOCQ-QUERTIER et E. HUBERT : Cytochemical and biochemical studies on progesterone-induced maturation in amphibian oocytes. *Differentiation*, 1(2):127–143, 1973.
- A. BANDYOPADHYAY, J. BANDYOPADHYAY, H. H. CHOI, H. S. CHOI et H. B. KWON : Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (*Rana dybowskii*) oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol*, 109(3):293–301, 1998.
- A. F. BARKOFF, K. S. DICKSON, N. K. GRAY et M. WICKENS : Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation : coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol*, 220(1):97–109, 2000.
- C. B. BARRETT, R. M. SCHROETKE, F. A. Van der HOORN, S. K. NORDEEN et J. L. MALLER : 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(1):310–5, 1990.
- R. R. BHATT et Jr. FERRELL, J. E. : The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*, 286(5443):1362–5, 1999.
- J. F. BODART, F. Y. BAERT, C. SELLIER, N. S. DUESBERY, S. FLAMENT et J. P. VILAIN : Differential roles of p39Mos-Xp42 Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in xenopus oocytes. *Dev Biol*, 283(2):373–83, 2005.
- J. F. BODART, A. CHOPRA, X. LIANG et N. DUESBERY : Anthrax, MEK and cancer. *Cell Cycle*, 1(1):10–5, 2002a.
- J. F. BODART, D. V. GUTIERREZ, A. R. NEBREDA, B. D. BUCKNER, J. R. RESAU et N. S. DUESBERY : Characterization of MPF and mapk activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev Biol*, 245(2):348–61, 2002b.
- A. BORGNE, A. C. OSTVOLD, S. FLAMENT et L. MEIJER : Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem*, 274(17):11977–86, 1999.
- M. T. BORISUK et J. J. TYSON : Bifurcation analysis of a model of mitotic control in frog eggs. *J Theor Biol*, 195(1):69–85, 1998.
- J. BRACHET, E. BALTUS, A. DE SCHUTTER-PAYS, J. HANOCQ-QUERTIER, E. HUBERT et G. STEINERT : Induction of maturation (meiosis) in *Xenopus laevis* oocytes by three organomercurials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(4):1574–1578, 1975a.
- J. BRACHET, P.D. SCHUTTER et E. HUBERT : Studies on maturation in *Xenopus laevis* oocytes. iii. energy production and requirements for protein synthesis. *Differentiation*, 3(1-3):3–14, 1975b.
- M. BRANDEIS, I. ROSEWELL, M. CARRINGTON, T. CROMPTON, M. A. JACOBS, J. KIRK, J. GANNON et T. HUNT : Cyclin b2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4344–9, 1998.

- O. BRANDMAN, Jr. FERRELL, J. E., R. LI et T. MEYER : Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions. *Science*, 310(5747):496–8, 2005.
- A. CASTRO, M. PETER, T. LORCA et E. MANDART : c-Mos and cyclin b/cdc2 connections during xenopus oocyte maturation. *Biol Cell*, 93(1-2):15–25, 2001.
- A. CHARLESWORTH, L. L. COX et A. M. MACNICOL : 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(17):17650–9, 2004.
- A. CHARLESWORTH, J. A. RIDGE, L. A. KING, M. C. MACNICOL et A. M. MACNICOL : A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during xenopus oocyte maturation. *Embo J*, 21(11):2798–806, 2002.
- M. CHEN et J. A. COOPER : Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol*, 15(9):4727–34, 1995.
- R. H. CHEN, J. C. WATERS, E. D. SALMON et A. W. MURRAY : Association of spindle assembly checkpoint component xmad2 with unattached kinetochores. *Science*, 274(5285):242–6, 1996.
- A. P. CHOPRA, S. A. BOONE, X. LIANG et N. S. DUESBERY : Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of mapk kinase. *J Biol Chem*, 278(11):9402–6, 2003.
- S. COWLEY, H. PATERSON, P. KEMP et C. J. MARSHALL : Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for pc12 differentiation and for transformation of nih 3t3 cells. *Cell*, 77(6):841–52, 1994.
- D. A. CROSS et C. SMYTHE : 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(1):12–22, 1998.
- H. L. DE BONDT, J. ROSENBLATT, J. JANCARIK, H. D. JONES, D. O. MORGAN et S. H. KIM : Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363(6430):595–602, 1993.
- C. H. de MOOR et J. D. RICHTER : The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in xenopus oocytes. *Mol Cell Biol*, 17(11):6419–26, 1997.
- R. DERUA, I. STEVENS, E. WAEKENS, A. FERNANDEZ, N. LAMB, W. MERLEVEDE et J. GORIS : Characterization and physiological importance of a novel cell cycle regulated protein kinase in *Xenopus laevis* oocytes that phosphorylates cyclin b2. *Exp Cell Res*, 230(2):310–24, 1997.
- P. DESCOMBES et E. A. NIGG : The polo-like kinase Plx1 is required for m phase exit and destruction of mitotic regulators in xenopus egg extracts. *Embo J*, 17(5):1328–35, 1998.

BIBLIOGRAPHIE

- K. C. DRURY et S. SCHORDERET-SLATKINE : Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell*, 4(3):269–74, 1975.
- N. S. DUESBERY, T. CHOI, K. D. BROWN, K. W. WOOD, J. RESAU, K. FUKASAWA, D. W. CLEVELAND et G. F. VANDE WOUDE : Cenp-e is an essential kinetochore motor in maturing oocytes and is masked during mos-dependent, cell cycle arrest at metaphase ii. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17):9165–70, 1997.
- N. S. DUESBERY, C. P. WEBB, S. H. LEPPLA, V. M. GORDON, K. R. KLIMPEL, T. D. COPELAND, N. G. AHN, M. K. OSKARSSON, K. FUKASAWA, K. D. PAULL et G. F. VANDE WOUDE : Proteolytic inactivation of map-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 280(5364):734–7, 1998.
- A. DUPRE, C. JESSUS, R. OZON et O. HACCARD : Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in xenopus oocytes. *Embo J*, 21(15):4026–36, 2002a.
- A. DUPRE, K. SUZIEDELIS, R. VALUCKAITE, J. de GUNZBURG, R. OZON, C. JESSUS et O. HACCARD : Xenopus h-rasv12 promotes entry into meiotic m phase and cdc2 activation independently of Mos and p42(mapk). *Oncogene*, 21(42):6425–33, 2002b.
- M. EBISUYA, K. KONDOH et E. NISHIDA : The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity : mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci*, 118(Pt 14):2997–3002, 2005.
- J. A. ENDICOTT, M. E. NOBLE et J. A. TUCKER : Cyclin-dependent kinases : inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol*, 9(6):738–44, 1999.
- E. ERIKSON et J. L. MALLER : A protein kinase from xenopus eggs specific for ribosomal protein s6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(3):742–6, 1985.
- E. ERIKSON et J. L. MALLER : Biochemical characterization of the p34cdc2 protein kinase component of purified maturation-promoting factor from xenopus eggs. *J Biol Chem*, 264(33):19577–82, 1989.
- Bard ERMENTROUT : *Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems : A Guide To Xppaut for Researchers and Students*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA, USA, 2002. ISBN 0898715067.
- T. EVANS, E. T. ROSENTHAL, J. YOUNGBLOM, D. DISTEL et T. HUNT : Cyclin : a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2):389–96, 1983.
- J. R. FABIAN, D. K. MORRISON et I. O. DAAR : Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of xenopus oocytes. *J Cell Biol*, 122(3):645–52, 1993.

- G. FANG, H. YU et M. W. KIRSCHNER : The checkpoint protein mad2 and the mitotic regulator cdc20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev*, 12(12):1871–83, 1998.
- D.A. FELL : *Understanding the control of metabolism*. Portland Press, London, 1997.
- J. E. FERRELL : Building a cellular switch : more lessons from a good egg. *Bioessays*, 21(10):866–870, Oct 1999a. ISSN 0265-9247.
- J. E. FERRELL : Xenopus oocyte maturation : new lessons from a good egg. *Bioessays*, 21(10):833–842, Oct 1999b. ISSN 0265-9247.
- J. E. FERRELL et E. M. MACHLEDER : The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in xenopus oocytes. *Science*, 280(5365):895–898, May 1998. ISSN 0036-8075.
- J. E. FERRELL et Wen XIONG : Bistability in cell signaling : How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos*, 11(1):227–236, Mar 2001. ISSN 1089-7682.
- Jr. FERRELL, J. E. : Tripping the switch fantastic : how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, 21(12):460–6, 1996.
- Jr. FERRELL, J. E. : Self-perpetuating states in signal transduction : positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol*, 14(2):140–8, 2002.
- Jr. FERRELL, J. E. et R. R. BHATT : Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 272(30):19008–16, 1997.
- Jr. FERRELL, J. E., M. WU, J. C. GERHART et G. S. MARTIN : Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in xenopus oocytes and eggs. *Mol Cell Biol*, 11(4):1965–71, 1991.
- D. FESQUET, P. J. FITZPATRICK, A. L. JOHNSON, K. M. KRAMER, J. H. TOYN et L. H. JOHNSTON : A bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the dbf2p kinase in budding yeast. *Embo J*, 18(9):2424–34, 1999.
- D. L. FISHER, T. BRASSAC, S. GALAS et M. DOREE : Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of xenopus oocytes. *Development*, 126(20):4537–46, 1999.
- D. L. FISHER, E. MANDART et M. DOREE : Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in xenopus oocytes. *Embo J*, 19(7):1516–24, 2000.
- S. FLAMENT, J. F. BODART, M. BERTOUT, E. BROWAEYS, A. ROUSSEAU et J. P. VILAIN : Differential effects of 6-dmap, olomoucine and roscovitine on xenopus oocytes and eggs. *Zygote*, 8(1):3–14, 2000.
- M. FRANK-VAILLANT, C. JESSUS, R. OZON, J. L. MALLER et O. HACCARD : Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in xenopus oocytes in response to progesterone. *Mol Biol Cell*, 10(10):3279–88, 1999.

- R. FRASCHINI, E. FORMENTI, G. LUCCHINI et S. PIATTI : Budding yeast bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from mad2. *J Cell Biol*, 145(5):979–91, 1999.
- M. FREEMAN : Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature*, 408 (6810):313–9, 2000.
- R. S. FREEMAN, A. N. MEYER, J. LI et D. J. DONOGHUE : Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mos protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J Cell Biol*, 116(3):725–35, 1992.
- R. S. FREEMAN, K. M. PICKHAM, J. P. KANKI, B. A. LEE, S. V. PENA et D. J. DONOGHUE : Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(15):5805–9, 1989.
- A. FUNAHASHI, M. MOROHASHI, H. KITANO et N. TANIMURA : Celldesigner : a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *BIOSILICO*, 1(5):159–162, November 2003. ISSN 14785382.
- N. FURUNO, A. KAWASAKI et N. SAGATA : Expression of cell-cycle regulators during xenopus oogenesis. *Gene Expr Patterns*, 3(2):165–8, 2003.
- N. FURUNO, M. NISHIZAWA, K. OKAZAKI, H. TANAKA, J. IWASHITA, N. NAKAJO, Y. OGAWA et N. SAGATA : Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in xenopus oocytes. *Embo J*, 13(10):2399–410, 1994.
- M. GAFFRE, A. DUPRE, R. VALUCKAITE, K. SUZIEDELIS, C. JESSUS et O. HACCARD : Deciphering the h-ras pathway in xenopus oocyte. *Oncogene*, 25(37):5155–62, 2006.
- J. GAUTIER, J. MINSHULL, M. LOHKA, M. GLOTZER, T. HUNT et J. L. MALLER : Cyclin is a component of maturation-promoting factor from xenopus. *Cell*, 60(3):487–94, 1990.
- F. GEBAUER et J. D. RICHTER : Synthesis and function of Mos : the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bioessays*, 19(1):23–8, 1997.
- J. GERHART, M. WU et M. KIRSCHNER : Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *Cell. Biol.*, (98):1247–1255, 1984.
- J. F. GODEAU, S. SCHORDERET-SLATKINE, P. HUBERT et E. E. BAULIEU : Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(5):2353–7, 1978.
- A. GOLDBETER : A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20):9107–9111, October 1991.

- Albert GOLDBETER et Daniel E. KOSHLAND : An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11):6840–6844, 1981. ISSN 00278424.
- G. J. GORBSKY, R. H. CHEN et A. W. MURRAY : Microinjection of antibody to mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol*, 141(5):1193–205, 1998.
- Y. GOTOH, N. MASUYAMA, K. DELL, K. SHIRAKABE et E. NISHIDA : Initiation of xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, 270(43):25898–904, 1995.
- Y. GOTOH et E. NISHIDA : The MAP kinase cascade : its role in xenopus oocytes, eggs and embryos. *Prog Cell Cycle Res*, 1:287–97, 1995.
- K. L. GOULD et P. NURSE : Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342(6245):39–45, 1989.
- L. A. GROOM, A. A. SNEDDON, D. R. ALESSI, S. DOWD et S. M. KEYSE : Differential regulation of the map, sap and rk/p38 kinases by *pyst1*, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J*, 15(14):3621–32, 1996.
- S. D. GROSS, M. S. SCHWAB, A. L. LEWELLYN et J. L. MALLER : Induction of metaphase arrest in cleaving xenopus embryos by the protein kinase p90rsk. *Science*, 286(5443):1365–7, 1999.
- S. D. GROSS, M. S. SCHWAB, F. E. TAIEB, A. L. LEWELLYN, Y. W. QIAN et J. L. MALLER : The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis ii in xenopus oocytes is mediated by p90(rsk). *Curr Biol*, 10(8):430–8, 2000.
- K. L. GUAN, C. FIGUEROA, T. R. BRTVA, T. ZHU, J. TAYLOR, T. D. BARBER et A. B. VOJTEK : Negative regulation of the serine/threonine kinase b-Raf by akt. *J Biol Chem*, 275(35):27354–9, 2000.
- Gianluca M. GUIDI et Albert GOLDBETER : Bistability without hysteresis in chemical reaction systems : A theoretical analysis of irreversible transitions between multiple steady states. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(49):9367–9376, December 1997. ISSN 1089-5639.
- O. HACCARD et C. JESSUS : Oocyte maturation, Mos and cyclins—a matter of synthesis : two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle*, 5(11):1152–9, 2006a.
- O. HACCARD et C. JESSUS : Redundant pathways for *cdc2* activation in xenopus oocyte : either cyclin b or Mos synthesis. *EMBO Rep*, 7(3):321–5, 2006b.
- O. HACCARD, C. JESSUS, X. CAYLA, J. GORIS, W. MERLEVEDE et R. OZON : In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the xenopus oocyte. *Eur J Biochem*, 192(3):633–42, 1990.

- O. HACCARD, A. LEWELLYN, R. S. HARTLEY, E. ERIKSON et J. L. MALLER : Induction of xenopus oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol*, 168(2):677–82, 1995.
- O. HACCARD, B. SARCEVIC, A. LEWELLYN, R. HARTLEY, L. ROY, T. IZUMI, E. ERIKSON et J. L. MALLER : Induction of metaphase arrest in cleaving xenopus embryos by map kinase. *Science*, 262(5137):1262–5, 1993.
- A. HAGTING, M. JACKMAN, K. SIMPSON et J. PINES : Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, 9(13):680–9, 1999.
- P. HAINAUT, A. KOWALSKI, S. GIORGETTI, V. BARON et E. VAN OBERGHEEN : 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):673–8, 1991.
- L. E. HAKE et J. D. RICHTER : Cpeb is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during xenopus oocyte maturation. *Cell*, 79(4):617–27, 1994.
- Riebesell M. HAUSEN, P. : *The early development of Xenopus laevis*. Springer-Verlag, 1991.
- A. V. HILL : The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. *J. Physiol.*, 40:iv–vii, 1910.
- H. HOCHEGGER, A. KLOTZBUCHER, J. KIRK, M. HOWELL, K. le GUELLEC, K. FLETCHER, T. DUNCAN, M. SOHAIL et T. HUNT : New b-type cyclin synthesis is required between meiosis i and ii during xenopus oocyte maturation. *Development*, 128(19):3795–807, 2001.
- M. M. HORNE et T. M. GUADAGNO : A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol*, 161(6):1021–8, 2003.
- E. L. HOWARD, A. CHARLESWORTH, J. WELK et A. M. MACNICOL : The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, 19(3):1990–9, 1999.
- C. Y. HUANG et J. E. FERRELL : Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(19):10078–10083, Sep 1996. ISSN 0027-8424.
- D. HUCHON, H. RIME, C. JESSUS et R. OZON : Control of metaphase i formation in xenopus oocyte : effects of an indestructible cyclin b and of protein synthesis. *Biol Cell*, 77(2):133–41, 1993.
- D. INOUE, M. OHE, Y. KANEMORI, T. NOBUI et N. SAGATA : A direct link of the Mos-mapk pathway to erp1/emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature*, 446 (7139):1100–4, 2007.

- M. IWABUCHI, K. OHSUMI, T. M. YAMAMOTO, W. SAWADA et T. KISHIMOTO : Residual cdc2 activity remaining at meiosis i exit is essential for meiotic M-M transition in xenopus oocyte extracts. *Embo J*, 19(17):4513–23, 2000.
- T. IZUMI et J. L. MALLER : Phosphorylation of xenopus cyclins B1 and b2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol*, 11(8):3860–7, 1991.
- M. JANICOT, J. R. FLORES-RIVEROS et M. D. LANE : 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(15):9382–91, 1991.
- C. JESSUS et R. OZON : How does xenopus oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol Cell*, 96(3):187–92, 2004.
- Quincey A. JUSTMAN, Zach SERBER, James E. FERRELL, Hana EL-SAMAD et Kevan M. SHOKAT : Tuning the activation threshold of a kinase network by nested feedback loops. *Science*, 324(5926):509–512, Apr 2009. ISSN 1095-9203.
- M. KALLIO, J. WEINSTEIN, J. R. DAUM, D. J. BURKE et G. J. GORBSKY : 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(6):1393–406, 1998.
- A. KARAIKOU, A. DUPRE, O. HACCARD et C. JESSUS : From progesterone to active cdc2 in xenopus oocytes : a puzzling signalling pathway. *Biol Cell*, 93(1-2):35–46, 2001.
- A. KARAIKOU, C. JESSUS, T. BRASSAC et R. OZON : Phosphatase 2a and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of Cell Science*, 112(21):3747–3756, 1999. cited By (since 1996) 63.
- A. KARAIKOU, A. C. LEPRETRE, G. PAHLAVAN, D. DU PASQUIER, R. OZON et C. JESSUS : Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing xenopus oocytes. *Development*, 131(7):1543–52, 2004.
- Y. KATSU, N. MINSHALL, Y. NAGAHAMA et N. STANDART : Ca²⁺ is required for phosphorylation of clam p82/cpeb in vitro : implications for dual and independent roles of MAP and cdc2 kinases. *Dev Biol*, 209(1):186–99, 1999.
- B. T. KEADY, P. KUO, S. E. MARTINEZ, L. YUAN et L. E. HAKE : Mapk interacts with xgef and is required for cpeb activation during meiosis in xenopus oocytes. *J Cell Sci*, 120(Pt 6):1093–103, 2007.
- B. N. KHOLODENKO : Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur J Biochem*, 267(6):1583–1588, Mar 2000. ISSN 0014-2956.
- B. N. KHOLODENKO : Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(3):165–76, 2006.

- B. N. KHOLODENKO, A. KIYATKIN, F. J. BRUGGEMAN, E. SONTAG, H. V. WESTERHOFF et J. B. HOEK : Untangling the wires : a strategy to trace functional interactions in signaling and gene networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12841–6, 2002.
- Hiroaki KITANO : A graphical notation for biochemical networks. *BIOSILICO*, 1(5):169–176, 2003. ISSN 1478-5382.
- H. KOBAYASHI, J. MINSHULL, C. FORD, R. GOLSTEYN, R. POON et T. HUNT : On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol*, 114(4):755–65, 1991.
- H. KOBAYASHI, E. STEWART, R. POON, J. P. ADAMCZEWSKI, J. GANNON et T. HUNT : Identification of the domains in cyclin a required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell*, 3(11):1279–94, 1992.
- M. KOHNO et J. POUYSSEGUR : Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med*, 38(3):200–11, 2006.
- M. KOLLMANN, L. LOVDOK, K. BARTHOLOME, J. TIMMER et V. SOURJIK : Design principles of a bacterial signalling network. *Nature*, 438(7067):504–507, 2005.
- H. KOSAKO, Y. GOTOH et E. NISHIDA : Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J Biol Chem*, 269(45):28354–8, 1994a.
- H. KOSAKO, Y. GOTOH et E. NISHIDA : Requirement for the MAP kinase kinase/map kinase cascade in xenopus oocyte maturation. *Embo J*, 13(9):2131–8, 1994b.
- H. KOSAKO, E. NISHIDA et Y. GOTOH : cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *Embo J*, 12(2):787–94, 1993.
- T. KOTANI et M. YAMASHITA : Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol*, 252(2):271–86, 2002.
- E. M. LEES et E. HARLOW : Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin a are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*, 13(2):1194–201, 1993.
- T. LEWIS, L. A. GROOM, A. A. SNEDDON, C. SMYTHE et S. M. KEYSE : 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):2885–96, 1995.
- Y. LI et R. BENEZRA : Identification of a human mitotic checkpoint gene : hsmad2. *Science*, 274(5285):246–8, 1996.
- Y. LI, C. GORBEA, D. MAHAFFEY, M. RECHSTEINER et R. BENEZRA : Mad2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23):12431–6, 1997.

- J. LIU et J. L. MALLER : Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of xerp1/emi2 by Plx1 and camk ii to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol*, 15(16):1458–68, 2005.
- J. X. LIU, B. SINGH, D. WLODEK et R. B. ARLINGHAUS : Cell cycle-mediated structural and functional alteration of p85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene*, 5(2):171–8, 1990.
- X. J. LIU : *Xenopus Protocols Cell Biology and Signal Transduction*, volume 322. 2006. ISBN 978-1-58829-362-6.
- Z. LIU et R. PATINO : High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of xenopus oocytes : characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod*, 49(5):980–8, 1993.
- M. J. LOHKA, M. K. HAYES et J. L. MALLER : Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(9):3009–13, 1988.
- T. LORCA, F. H. CRUZALEGUI, D. FESQUET, J. C. CAVADORE, J. MERY, A. MEANS et M. DOREE : Calmodulin-dependent protein kinase ii mediates inactivation of MPF and csf upon fertilization of xenopus eggs. *Nature*, 366(6452):270–3, 1993.
- T. LORCA, J. C. LABBE, A. DEVAULT, D. FESQUET, J. P. CAPONY, J. C. CAVADORE, F. LE BOUFFANT et M. DOREE : Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J*, 11(7):2381–90, 1992.
- L. B. LUTZ, B. KIM, D. JAHANI et S. R. HAMMES : 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(52):41512–20, 2000.
- Chunqi MA, Cathy CUMMINGS et X. Johne LIU : Biphasic Activation of Aurora-A Kinase during the Meiosis I- Meiosis II Transition in *Xenopus* Oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 23(5):1703–1716, 2003.
- J. MALLER, M. WU et J. C. GERHART : Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol*, 58(2):295–312, 1977.
- S. J. MANSOUR, W. T. MATTEN, A. S. HERMANN, J. M. CANDIA, S. RONG, K. FUKASAWA, G. F. VANDE WOUDE et N. G. AHN : Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, 265(5174):966–70, 1994.
- S.J. MANSOUR, J.M. CANDIA, J.E. MATSUURA, M.C. MANNING et N.G. AHN : Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochemistry*, 35(48):15529–15536, December 1996.

BIBLIOGRAPHIE

- Nick I. MARKEVICH, Mikhail A. TSYGANOV, Jan B. HOEK et Boris N. KHOLODENKO : Long-range signaling by phosphoprotein waves arising from bistability in protein kinase cascades. *Mol Syst Biol*, 2:61, Nov 2006. ISSN 1744-4292.
- Y. MASUI : A quest for cytoplasmic factors that control the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res*, 2:1–13, 1996.
- Y. MASUI : 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):1–17, 2001.
- Y. MASUI et C. L. MARKERT : Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*, 177(2):129–45, 1971.
- Gilliane MATON, Thierry LORCA, Jean-Antoine GIRAULT, Rene OZON et Catherine JES-SUS : Differential regulation of cdc2 and aurora-a in xenopus oocytes : a crucial role of phosphatase 2a. *J Cell Sci*, 118(11):2485–2494, 2005.
- W. T. MATTEN, T. D. COPELAND, N. G. AHN et G. F. VANDE WOUDE : Positive feedback between MAP kinase and Mos during xenopus oocyte maturation. *Dev Biol*, 179(2):485–92, 1996.
- R. MENDEZ, L. E. HAKE, T. ANDRESSON, L. E. LITTLEPAGE, J. V. RUDERMAN et J. D. RICHTER : Phosphorylation of cpe binding factor by eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature*, 404(6775):302–7, 2000.
- P. G. MEYERHOF et Y. MASUI : Ca and mg control of cytostatic factors from *Rana pipiens* oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. *Dev Biol*, 61(2):214–29, 1977.
- J. MINSHULL, A. MURRAY, A. COLMAN et T. HUNT : Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol*, 114(4):767–72, 1991.
- K. MOELLING, B. HEIMANN, P. BEIMLING, U. R. RAPP et T. SANDER : Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature*, 312(5994):558–61, 1984.
- G. A. MORRILL, G. Y. MA et A. KOSTELLOW : Progesterone binding to plasma membrane and cytosol receptors in the amphibian oocyte. *Biochem Biophys Res Commun*, 232 (1):213–7, 1997.
- D. K. MORRISON et R. E. CUTLER : The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2):174–9, 1997.
- D. K. MORRISON, G. HEIDECKER, U. R. RAPP et T. D. COPELAND : Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*, 268(23):17309–16, 1993.

- M. MUDA, A. THEODOSIOU, N. RODRIGUES, U. BOSCHERT, M. CAMPS, C. GILLIERON, K. DAVIES, A. ASHWORTH et S. ARKINSTALL : The dual specificity phosphatases m3/6 and mkp-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 271(44):27205–8, 1996.
- A. W. MURRAY et M. W. KIRSCHNER : Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339(6222):275–80, 1989.
- A. W. MURRAY, M. J. SOLOMON et M. W. KIRSCHNER : The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*, 339(6222):280–6, 1989.
- A. J. MUSLIN, A. M. MACNICOL et L. T. WILLIAMS : Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced xenopus oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol*, 13(7):4197–202, 1993.
- N. NASSAR, G. HORN, C. HERRMANN, A. SCHERER, F. MCCORMICK et A. WITTINGHOFER : The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with rap1a and a gtp analogue. *Nature*, 375(6532):554–60, 1995.
- A. R. NEBREDA, J. V. GANNON et T. HUNT : Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate map kinase and MPF during progesterone-induced maturation of xenopus oocytes. *Embo J*, 14(22):5597–607, 1995.
- A.R. NEBREDA et T. HUNT : 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(5):1979–86, 1993.
- T. NISHIYAMA, K. OHSUMI et T. KISHIMOTO : Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature*, 446(7139):1096–9, 2007.
- M. NISHIZAWA, N. FURUNO, K. OKAZAKI, H. TANAKA, Y. OGAWA et N. SAGATA : 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(10):4021–7, 1993.
- M. NISHIZAWA, K. OKAZAKI, N. FURUNO, N. WATANABE et N. SAGATA : The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in xenopus oocytes. *Embo J*, 11(7):2433–46, 1992.
- B. NOVAK, Z. PATAKI, A. CILIBERTO et J.J. TYSON : Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos*, 11:277–286, 2001.
- B. NOVAK et J. J. TYSON : Numerical analysis of a comprehensive model of m-phase control in xenopus oocyte extracts and intact embryos. *J Cell Sci*, 106 (Pt 4):1153–1168, Dec 1993. ISSN 0021-9533.

BIBLIOGRAPHIE

- B. NOVAK et J. J. TYSON : A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *Journal of Theoretical Biology*, 230(4):563 – 579, 2004.
- P. NURSE : Interview : Sir paul nurse, phd, nobel prize for medicine winner. *MedGenMed*, 3(4):4, 2001.
- P. NURSE : The nobel prize and beyond : an interview with sir paul nurse. interview by susan r. owens. *EMBO Rep*, 3(3):204–6, 2002.
- K. OHSUMI, W. SAWADA et T. KISHIMOTO : Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing xenopus oocytes. *J Cell Sci*, 107 (Pt 11):3005–13, 1994.
- E. O'NEILL et W. KOLCH : Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer*, 90(2):283–8, 2004.
- M. OSKARSSON, W. L. McCLEMENTS, D. G. BLAIR, J. V. MAIZEL et G. F. VANDE WOUDE : Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of moloney sarcoma virus. *Science*, 207(4436):1222–4, 1980.
- A. PALMER, A. C. GAVIN et A. R. NEBREDA : 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(17):5037–47, 1998.
- J. PARIS, K. SWENSON, H. PIWNICA-WORMS, et J.D. RICHTER : Maturation-specific polyadenylation : in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kd cpe binding protein. *Genes Dev*, 5:1697–708, 1991.
- E. PERDIGUERO, M. J. PILLAIRE, J. F. BODART, F. HENNERSDORF, M. FRODIN, N. S. DUESBERY, G. ALONSO et A. R. NEBREDA : Xp38gamma/sapk3 promotes meiotic g(2)/m transition in xenopus oocytes and activates cdc25c. *Embo J*, 22(21):5746–56, 2003.
- M. PETER, J. C. LABBE, M. DOREE et E. MANDART : A new role for Mos in xenopus oocyte maturation : targeting myt1 independently of mapk. *Development*, 129(9):2129–39, 2002.
- C. D. PHAM, V. B. VUYYURU, Y. YANG, W. BAI et B. SINGH : Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene*, 18 (30):4287–94, 1999.
- A. PICARD, S. GALAS, G. PEAUCELLIER et M. DOREE : Newly assembled cyclin b-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis i and meiosis ii in starfish oocytes. *Embo J*, 15(14):3590–8, 1996.
- J. PINES et T. HUNTER : The differential localization of human cyclins a and b is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin b. *Embo J*, 13(16):3772–81, 1994.

- J. POSADA, N. YEW, N. G. AHN, G. F. VANDE WOUDE et J. A. COOPER : Mos stimulates MAP kinase in xenopus oocytes and activates a map kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol*, 13(4):2546–53, 1993.
- U. R. RAPP, M. D. GOLDSBOROUGH, G. E. MARK, T. I. BONNER, J. GROFFEN, Jr. REYNOLDS, F. H. et J. R. STEPHENSON : Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(14):4218–22, 1983.
- N. R. RAUH, A. SCHMIDT, J. BORMANN, E. A. NIGG et T. U. MAYER : Calcium triggers exit from meiosis ii by targeting the apc/c inhibitor xerp1 for degradation. *Nature*, 437(7061):1048–52, 2005.
- J. D. REIMANN, E. FREED, J. Y. HSU, E. R. KRAMER, J. M. PETERS et P. K. JACKSON : Emil is a mitotic regulator that interacts with cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell*, 105(5):645–55, 2001.
- J. K. REYNHOUT et L. D. SMITH : Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol*, 38(2):394–400, 1974.
- H. RIME, D. HUCHON, V. DE SMEDT, C. THIBIER, K. GALAKTIONOV, C. JESSUS et R. OZON : Microinjection of cdc25 protein phosphatase into xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase i. *Biol Cell*, 82(1):11–22, 1994.
- L. M. ROY, K. I. SWENSON, D. H. WALKER, B. G. GABRIELLI, R. S. LI, H. PIWNICA-WORMS et J. L. MALLER : Activation of p34cdc2 kinase by cyclin a. *J Cell Biol*, 113(3):507–14, 1991.
- N. SAGATA : What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays*, 19(1):13–21, 1997.
- N. SAGATA, I. DAAR, M. OSKARSSON, S. D. SHOWALTER et G. F. VANDE WOUDE : The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science*, 245(4918):643–6, 1989a.
- N. SAGATA, M. OSKARSSON, T. COPELAND, J. BRUMBAUGH et G. F. VANDE WOUDE : Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in xenopus oocytes. *Nature*, 335(6190):519–25, 1988.
- N. SAGATA, N. WATANABE, G. F. VANDE WOUDE et Y. IKAWA : The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342(6249):512–8, 1989b.
- S. D. SANTOS, P. J. VERVEER et P. I. BASTIAENS : Growth factor-induced mapk network topology shapes erk response determining pc-12 cell fate. *Nat Cell Biol*, 9(3):324–30, 2007.

- S. SASAGAWA, Y. OZAKI, K. FUJITA et S. KURODA : Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol*, 7(4):365–73, 2005.
- A. SCHMIDT, P. I. DUNCAN, N. R. RAUH, G. SAUER, A. M. FRY, E. A. NIGG et T. U. MAYER : Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates xerp1, a novel inhibitor of apc/c activity. *Genes Dev*, 19(4):502–13, 2005.
- S. SCHORDERET SLATKINE et K.C. DRURY : Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differentiation*, 2(4):247–254, 1973.
- M. S. SCHWAB, B. T. ROBERTS, S. D. GROSS, B. J. TUNQUIST, F. E. TAIEB, A. L. LEWELLYN et J. L. MALLER : Bub1 is activated by the protein kinase p90(rsk) during xenopus oocyte maturation. *Curr Biol*, 11(3):141–50, 2001.
- C. SELLIER, J. F. BODART, S. FLAMENT, F. BAERT, J. GANNON et J. P. VILAIN : Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated mapk in xenopus oocytes. *J Cell Biochem*, 98(2):287–300, 2006.
- M. D. SHEETS, M. WU et M. WICKENS : Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in xenopus meiotic maturation. *Nature*, 374(6522):511–6, 1995.
- J. SHENG, A. KUMAGAI, W. G. DUNPHY et A. VARSHAVSKY : Dissection of c-mos degran. *Embo J*, 21(22):6061–71, 2002.
- E. K. SHIBUYA, J. MORRIS, U. R. RAPP et J. V. RUDERMAN : Activation of the xenopus oocyte mitogen-activated protein kinase pathway by Mos is independent of Raf. *Cell Growth Differ*, 7(2):235–41, 1996.
- L. D. SMITH et R. E. ECKER : The biochemistry of amphibian development. anl-7535. *ANL Rep*, pages 19–25, 1968.
- M. L. SOHASKEY et J. E. FERRELL : Distinct, constitutively active mapk phosphatases function in xenopus oocytes : implications for p42 mapk regulation in vivo. *Mol Biol Cell*, 10(11):3729–3743, Nov 1999. ISSN 1059-1524.
- M. J. SOLOMON : Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol*, 5(2):180–6, 1993.
- M. J. SOLOMON, M. GLOTZER, T. H. LEE, M. PHILIPPE et M. W. KIRSCHNER : Cyclin activation of p34cdc2. *Cell*, 63(5):1013–24, 1990.
- M. J. SOLOMON, T. LEE et M. W. KIRSCHNER : Role of phosphorylation in p34cdc2 activation : identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell*, 3(1):13–27, 1992.
- E.D. SONTAG : Network reconstruction based on steady-state data. *Essays in Biochemistry*, 45:161–176, 2008.

- I. STEVENS, R. DERUA, E. RONDELEZ, E. WAELKENS, W. MERLEVEDE et J. GORIS : 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 (2):303–18, 1999.
- U. STRAUSFELD, A. FERNANDEZ, J. P. CAPONY, F. GIRARD, N. LAUTREDOU, J. DERANCOURT, J. C. LABBE et N. J. LAMB : 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 (8):5989–6000, 1994.
- L. STRYER : *Biochemistry*. Ed. New York : W. H. Freeman and co, 1988. ISBN 071671843X.
- L. SUN, Y. CHAI, R. HANNIGAN, V. K. BHOGARAJU et K. MACHACA : Zinc regulates the ability of cdc25c to activate MPF /cdk1. *J Cell Physiol*, 213(1):98–104, 2007.
- P. S. SUNKARA, D. A. WRIGHT et P. N. RAO : Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(6):2799–802, 1979.
- K. I. SWENSON, K. M. FARRELL et J. V. RUDERMAN : The clam embryo protein cyclin a induces entry into m phase and the resumption of meiosis in xenopus oocytes. *Cell*, 47(6):861–70, 1986.
- T. TANOUE, T. YAMAMOTO, R. MAEDA et E. NISHIDA : A novel mapk phosphatase mkp-7 acts preferentially on JNK/sapk and p38 alpha and beta mapks. *J Biol Chem*, 276(28):26629–39, 2001.
- S. S. TAYLOR, E. HA et F. MCKEON : The human homologue of bub3 is required for kinetochore localization of bub1 and a mad3/bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, 142(1):1–11, 1998.
- S. S. TAYLOR et F. MCKEON : Kinetochore localization of murine bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, 89(5):727–35, 1997.
- A. THEODOSIOU et A. ASHWORTH : Map kinase phosphatases. *Genome Biol*, 3(7):REVIEWS3009, 2002.
- P. THOMAS, Y. ZHU et M. PACE : Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes : a review with some new findings. *Steroids*, 67(6):511–7, 2002.
- M. THOMSON et J. GUNAWARDENA : Unlimited multistability in multisite phosphorylation systems. *Nature*, 460(7):274–277, 2009. ISSN 0027-8424.

- Alejandra C. VENTURA, Jacques-A SEPULCHRE et Sofia D. MERAJVER : A hidden feedback in signaling cascades is revealed. *PLoS Comput Biol*, 4(3):e1000041, Mar 2008. ISSN 1553-7358.
- M. H. VERLHAC, C. LEFEBVRE, P. GUILLAUD, P. RASSINIER et B. MARO : Asymmetric division in mouse oocytes : with or without Mos. *Curr Biol*, 10(20):1303–6, 2000a.
- M. H. VERLHAC, C. LEFEBVRE, J. Z. KUBIAK, M. UMBHAUER, P. RASSINIER, W. COLLEDGE et B. MARO : Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J*, 19(22):6065–74, 2000b.
- A. B. VOJTEK, S. M. HOLLENBERG et J. A. COOPER : Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 74(1):205–14, 1993.
- P. WAAGE et C.M. GULDBERG : Studies concerning affinity. *Forhandlinger I Videnskabs Selskabet I Cristiana*, pages 35–40, 92–94, 111–120, 1864.
- R. WANG, G. HE, M. NELMAN-GONZALEZ, C. L. ASHORN, G. E. GALLICK, P. T. STUKENBERG, M. W. KIRSCHNER et J. KUANG : Regulation of cdc25c by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*, 128(6):1119–32, 2007.
- Xiang WANG, Nan HAO, Henrik G. DOHLMAN et Timothy C. ELSTON : Bistability, stochasticity, and oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biophysical Journal*, 90(6):1961 – 1978, 2006. ISSN 0006-3495.
- W. J. WASSERMAN et L. D. SMITH : The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol*, 78(1):R15–22, 1978.
- K. WATANABE, T. TOKUMOTO et K. ISHIKAWA : 1,10-phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in xenopus oocytes. *Cell Signal*, 15(12):1139–47, 2003.
- N. WATANABE, T. HUNT, Y. IKAWA et N. SAGATA : Independent inactivation of MPF and cytotostatic factor (Mos) upon fertilization of xenopus eggs. *Nature*, 352(6332):247–8, 1991.
- N. WATANABE, G. F. VANDE WOUDE, Y. IKAWA et N. SAGATA : Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of xenopus eggs. *Nature*, 342(6249):505–11, 1989.
- W. A. WELLS et A. W. MURRAY : Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol*, 133(1):75–84, 1996.
- J.Q. WU et S. KORNBLUTH : Across the meiotic divide - csf activity in the post-emi2/xerp1 era. *J Cell Sci*, 121:3509–3514, 2009.
- M. WU et J. C. GERHART : Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 79(2):465–77, 1980.

- Wen XIONG et J. E. FERRELL : A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature*, 426(6965):460–465, Nov 2003. ISSN 1476-4687.
- Y. YANG, C. H. HERRMANN, R. B. ARLINGHAUS et B. SINGH : Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase a. *Mol Cell Biol*, 16(3):800–9, 1996.
- Y. YANG, C. D. PHAM, V. B. VUYYURU, H. LIU, R. B. ARLINGHAUS et B. SINGH : Evidence of a functional interaction between serine 3 and serine 25 Mos phosphorylation sites. a dominant inhibitory role of serine 25 phosphorylation on Mos protein kinase. *J Biol Chem*, 273(26):15946–53, 1998.
- B. YAO, Y. ZHANG, S. DELIKAT, S. MATHIAS, S. BASU et R. KOLESNICK : Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*, 378(6554):307–10, 1995.
- S. YOON et R. SEGER : The extracellular signal-regulated kinase : multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1):21–44, 2006.
- S. YOSHITOME, N. FURUNO et N. SAGATA : 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(6-7):509–18, 1998.
- J. YUE et Jr. FERRELL, J. E. : Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol Cell Biol*, 26(14):5300–9, 2006.
- W. ZACHARIAE : Destruction with a box : substrate recognition by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell*, 13(1):2–3, 2004.
- B. H. ZHANG et K. L. GUAN : Activation of b-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues thr598 and ser601. *Embo J*, 19(20):5429–39, 2000.
- L. ZHU, N. OHAN, Y. AGAZIE, C. CUMMINGS, S. FARAH et X. J. LIU : Molecular cloning and characterization of xenopus insulin-like growth factor-1 receptor : its role in mediating insulin-induced xenopus oocyte maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinology*, 139(3):949–54, 1998.
- S. ZIMMERMANN et K. MOELLING : Phosphorylation and regulation of Raf by akt (protein kinase b). *Science*, 286(5445):1741–4, 1999.