

x50376
2000
246

Université des Sciences et Technologies de Lille I.
U.F.R de Biologie

N°

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé.

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mr BODART Jean-François

Le 24 octobre 2000

Titre :

Rôle des protéines-kinases et protéines phosphatases
dans la levée du blocage métaphasique des ovocytes de *Xenopus laevis*.

Directeur de thèse :

Mr FLAMENT Stéphane.

Jury :

Mr VILAIN Jean-Pierre ,
Mme JESSUS Catherine,
Mme MULNER-LORILLON Odile,
Mme DUTERQUE Martine,
Mr MICHALSKI Jean-Claude,
Mr FLAMENT Stéphane,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse



D 030 176188 7

Remerciements.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Jean-Pierre Vilain, qui m'a accueilli dans son équipe "Régulation Ionique et Moléculaire du Cycle Cellulaire".

Je voudrais exprimer ma gratitude à Stéphane Flament, avec qui j'ai beaucoup appris durant ces dernières années.

Je tiens à remercier madame Jessus et madame Mulner-Lorillon d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements à monsieur Michalski et à madame Duterque pour avoir accepté de participer à ce jury.

Merci à Xavier Desbiens, qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire.

Je tiens à dire tout le plaisir que j'ai eu à travailler dans le groupe de "Régulation Ionique et Moléculaire du Cycle Cellulaire" : un grand merci à Arlette qui m'a aidé dans bien des aspects de ce travail...et qui m'a souvent offert son soutien moral. Merci également à Edith, Katia, et Marc, sans oublier Frédéric et Patrice. A tous, merci pour tous vos conseils, et merci d'avoir supporté mon humeur parfois massacrant et mes râleries quotidiennes...

Je souhaite aussi remercier Jean-Luc Rodeau, pour sa patience et sa disponibilité lors de mes séjours strasbourgeois.

Je tiens également à remercier la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé ma dernière année de thèse et m'a permis de terminer ce travail dans de bonnes conditions. Je remercie également la Fondation Boehringer Ingelheim qui a financé mon séjour dans l'équipe du Dr T.Hunt afin d'apprendre les techniques d'extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénopé et enfin, la Société de Secours des Amis des Sciences, qui a rendu possible les mesures de variation de la concentration de calcium.

Merci à Nick Duesbery, Georges Vande Woude, et Jan-Michael Peters pour leurs discussions au sujet de ces travaux.

Merci également au Dr P. Sautière, de m'avoir encouragé à continuer dans le domaine de la recherche.



A Anne-Sophie, qui est venue partager ma vie et mes angoisses.

A mes parents, pour leur soutien de tous les instants.

A ma grand-mère et à Emile, pour leur soutien et leur enthousiasme.

A mon grand-père Laurent, à qui tout ceci aurait sûrement plu.

A mes filleules, Claire-Marie et Audrey,

A mon meilleur ami Laurent, qui y a cru dès le départ, sans jamais douter.

A tous mes parents et amis qui m'ont soutenus.

Sans oublier tous ceux qui n'y ont pas cru, tous ceux qui ne m'ont pas soutenu. Ils ont leur responsabilité dans ce travail dans la mesure où ils ont nourri mon entêtement.

Abréviations.

6-DMAP	: 6-diméthylaminopurine.
APC	: Anaphase Promoting Complex.
BAPTA	: 1,2 bis (2-AminoPhenoxy) ethane N,N, N', N'-Tetra Acetic Acid.
CAK	: Cdk Activating Kinase.
CAKAK	: Cdk Activating Kinase Activating Kinase.
CaMKII	: Calmodulin Kinase II.
Cdc	: Cell Division Cycle.
Cdk	: Cyclin Dependent Kinase.
CEN-P	: Centrosomal Associated Protein.
CICR	: Calcium Induced Calcium Release.
CPE	: Cytoplasmic Polyadenylation Element.
CPEB	: Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein.
CSF	: Cytostatic Factor.
DAG	: Diacyl glycérol.
EGF	: Epidermal Growth Factor.
GC	: Granules Corticaux.
GVBD	: Germinal Vesicle BreakDown.
IP3	: Inositol 1,4,5 triphosphate.
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase.
MAPKK (MEK)	: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase.
MPF	: Maturation (M-Phase) Promoting Factor.
PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate.
PKA	: Protéine Kinase A.
PKC	: Protéine Kinase C.
PLC	: Phospholipase C.
Plkk1	: Polokinase kinasé.
Plx1	: Polokinase 1.
PP1	: Protéine Phosphatase 1.
PP2A	: Protéine Phosphatase 2A.
Rsk	: Ribosomal S6 Kinase.
TFIIH	: Transcription Factor II H.

Table des Matières.

INTRODUCTION.....	7
HISTORIQUE.....	8
1. LA MATURATION DES OVOCYTES DE XÉNOPE, UN MODÈLE DE LA TRANSITION G2/M.	8
1.1 ASPECTS CYTOLOGIQUES.....	8
1.2 DÉCLENCHEMENT DE LA REPRISSE DE LA MÉIOSE.....	13
1.3 LE MPF.....	13
1.4 RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉINE-KINASE DU MPF.....	14
1.4.1 <i>Cycline B : sous-unité régulatrice</i>	14
1.4.2 <i>cdk1(p34^{cdc2}) : sous-unité catalytique</i>	16
1.4.2.1 Phosphorylation activatrice par la Cdk-Activating Kinase (CAK).....	16
1.4.2.2 Phosphorylations inhibitrices : Wee1, Myt1.....	17
1.4.2.3 Déphosphorylation activatrice par Cdc25.....	19
1.4.3 <i>Protéines associées</i>	20
1.5 CIBLES DU MPF.....	21
1.6 DE LA PROGESTÉRONE AU MPF.....	22
1.6.1 <i>AMP_C et Protéine Kinase A</i>	22
1.6.2 <i>pH intracellulaire</i>	23
1.6.3 <i>Synthèse protéique</i>	24
1.6.3.1 <i>Cyclines</i>	24
1.6.3.2 <i>c-mos</i>	24
1.6.3.3 <i>Cdk 2</i>	26
1.6.4 <i>Activation et régulation de la voie MAPK lors de la reprise de la méiose</i>	27
1.6.4.1 <i>S6 Kinase/MAPK</i>	27
1.6.4.2 <i>Activation de la voie MAPK durant la maturation</i>	27
1.6.4.3 <i>Régulation de c-mos durant la maturation</i>	29
1.6.4.3.1 <i>Polyadénylation des ARN messagers</i>	29
1.6.4.3.2 <i>Régulation de mos par phosphorylation</i>	31
2 BLOCAGE EN MÉTAPHASE II.....	34
2.1 DEUXIÈME ARRÊT DE LA MÉIOSE.....	34
2.2 DÉCOUVERTE DU CSF DANS LES OVOCYTES D'AMPHIBIENS.....	34
2.3 ACTIVITÉ CSF DANS LES AUTRES MODÈLES ANIMAUX.....	36
2.3.1 <i>Arrêt en métaphase II des ovocytes de souris</i>	36
2.3.2 <i>Arrêt en métaphase I des ovocytes d'invertébrés</i>	37
2.4 PROTÉINES-KINASES IMPLIQUÉES DANS L'ACTIVITÉ CYTOSTATIQUE.....	37
2.4.1 <i>c-mos</i>	37
2.4.2 <i>MAPK</i>	40
2.4.3 <i>cdk 2</i>	41

3 SORTIE DE PHASE M : TRANSITION MÉTAPHASE-ANAPHASE.....	42
3.1 EVÉNEMENTS DE LA TRANSITION MÉTAPHASE-ANAPHASE.....	42
3.2 ANAPHASE PROMOTING COMPLEX.	42
3.2.1 <i>Identité</i>	42
3.2.2 <i>Régulation</i>	44
3.4 LE POINT DE CONTRÔLE D'ASSEMBLAGE DU FUSEAU ("SPINDLE CHECKPOINT").	46
4 LEVÉE DU BLOCAGE MÉTAPHASIQUE.	49
4.1 OVOCYTE D'AMPHIBIEN.....	49
4.1.1 <i>Modifications morphologiques</i>	49
4.1.2 <i>Modifications ioniques</i>	49
4.1.3 <i>Modifications biochimiques</i>	56
4.1.3.1 Inactivation du MPF.....	56
4.1.3.2 Inactivation du CSF.	58
4.1.3.2.1 Inactivation des MAPK.	58
4.1.3.2.2. Dégradation de c-mos.	58
4.2 AUTRES MODÈLES D'ÉTUDE DE LA LEVÉE DE BLOCAGE MÉTAPHASIQUE.....	59
4.2.1 <i>Ovocytes d'invertébrés : levée du blocage en métaphase I</i>	59
4.2.2 <i>Ovocyte de mammifère : levée du blocage en métaphase II</i>	60
RESULTATS.....	63
PUBLICATION 1.....	64
PUBLICATION 2.....	70
PUBLICATION 3.....	71
PUBLICATION 4.....	82
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	87
REFERENCES.....	93
ANNEXES.....	130
ABSTRACT	131

Index des illustrations et des tableaux.

Figures

- Figure 1** : Ovocyte immature de *Xenopus laevis*, p9.
- Figure 2** : Maturation des ovocytes de *Xenopus laevis*, p11.
- Figure 3** : Structure des cyclines B, p15.
- Figure 4** : Régulation du MPF, p18
- Figure 5** : Expression et fonction de c-mos au cours de la division méiotique de l'ovocyte de Xénope, p25.
- Figure 6** : Modèle de régulation de c-mos lors de la maturation, p30.
- Figure 7** : Sites de phosphorylation de v-mos et de c-mos, p33.
- Figure 8** : Différents types de méiose, p35.
- Figure 9** : L'activité cytotatique (CSF), p38.
- Figure 10** : Protéolyse dépendante de la voie ubiquitine, p43.
- Figure 11** : Régulation de l'APC par le "spindle assembly checkpoint", p47.
- Figure 12** : Activation des ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, p51.
- Figure 13** : Hypothèse de libération du calcium, p53.
- Figure 14** : Evénements biochimiques de la fécondation, p57.
- Figure 15** : Structure de différents inhibiteurs de cdks, p67.
- Figure 16** : Effets de la 6-DMAP sur l'exocytose des granules corticaux, p74.
- Figure 17** : Inhibition de la dégradation de la cycline B2 par des inhibiteurs de cdks dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, p76.
- Figure 18** : Dégradation de c-mos induite par la 6-DMAP dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, p76.
- Figure 19** : Hypothèse d'activation des ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, p90.

Tableaux

- Tableau 1** : disparition du pronucleus induit par la 6-DMAP après rinçages, p73.
- Tableau 2** : Inhibition de la réaction corticale par la 6-DMAP, p73.

Introduction

Les ovocytes immatures de Xénope sont bloqués en prophase de première division de méiose. La reprise de la méiose est déclenchée *in vivo* et *in vitro* par la progestérone. Cette hormone permet l'activation du MPF (M-Phase Promoting Factor), facteur universel d'entrée en phase M, de MAPK et de c-mos (MAPKKK en amont dans la voie d'activation de MAPK). A l'issue de la première division de méiose, la deuxième division s'engage mais s'arrête aussitôt en métaphase. Ce deuxième blocage est dû au facteur cytotatique (CSF) présent dans les ovocytes matures d'amphibien. Il a été décrit dès 1971, mais son identité n'est pas connue. Cependant, plusieurs kinases sont impliquées dans l'activité cytotatique : c-mos, MAPK. En outre, l'arrêt métaphasique est associé à une activité MPF élevée. La fécondation ou des agents qui imitent la libération de calcium survenant lors de la fécondation entraînent la levée du blocage métaphasique qui s'accompagne de la chute de l'activité des kinases mentionnées ci-dessus.

Dans la mesure où le système phosphorylation/déphosphorylation joue un rôle primordial tant dans le blocage métaphasique que dans les mécanismes qui président à sa levée, nous avons utilisé des inhibiteurs de protéines-kinases et de protéines-phosphatases afin d'appréhender le rôle de ces protéines dans ce phénomène.

Notre mémoire débutera par des généralités concernant les étapes initiales de la maturation ovocytaire puisque c'est au cours de la reprise de la méiose que sont synthétisées ou activées plusieurs protéines-kinases supposées jouer un rôle dans l'arrêt métaphasique. Nous décrirons l'arrêt en métaphase ainsi que les mécanismes de sortie de phase M et de la levée du blocage métaphasique. Nous présenterons ensuite les articles auxquels notre travail a donné lieu.

Historique

1. La maturation des ovocytes de Xénope, un modèle de la transition G2/M.

1.1 Aspects cytologiques.

A l'issue de leur croissance, les ovocytes de Xénope sont bloqués en prophase de première division de méiose, au stade diplotène. L'aspect externe de ces ovocytes de stade VI (classification de Dumont, 1972) est caractérisé par un hémisphère animal pigmenté et un hémisphère végétatif clair (Figure 1A). Le noyau, encore appelé vésicule germinative, occupe une place excentrée vers le pôle animal (Figure 1B). La reprise de la méiose, ou maturation ovocytaire, est déclenchée par une stimulation hormonale. D'un point de vue cytologique, la reprise de la méiose débute par l'apparition d'une zone dépourvue de plaquettes vitellines au niveau de la face inférieure de la vésicule germinative, où des faisceaux de fibres constitués principalement de microtubules, sont disposés tangentielllement. La rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown, figure 2A) se produit à la base de la vésicule germinative (Tchou-su et Wang, 1958). Certains microtubules envahissent le nucléoplasme alors que d'autres s'étendent latéralement (Brachet et coll., 1970 ; Huchon et coll., 1981). La migration de l'appareil microtubulaire et de la vésicule germinative vers le pôle animal s'accompagne d'une dépigmentation locale à l'apex de la cellule, que l'on appelle la tache de maturation (Figure 2B).

Finalement, à proximité de la membrane plasmique, les chromosomes condensés sont collectés par le fuseau métaphasique. Etant donné l'absence de centrioles, ce fuseau ne possède pas d'asters. Les chromosomes homologues se séparent et le premier globule polaire est émis. La deuxième division s'engage mais elle n'évolue pas au delà de la métaphase (figure 2C). Au centre de la tache de maturation, il est possible d'observer le premier globule polaire et l'extrémité du fuseau ancrée dans la membrane plasmique (figure 2C).

In vivo, les ovocytes matures sont expulsés des follicules dans la cavité péritonéale, puis ils sont transportés via l'oviducte pour être pondus. Au cours de leur passage dans l'oviducte, la gangue se dépose autour des ovocytes. Ils sont alors prêts à être fécondés. C'est le spermatozoïde qui permettra à l'ovocyte de terminer sa deuxième division et qui déclenchera le développement embryonnaire.

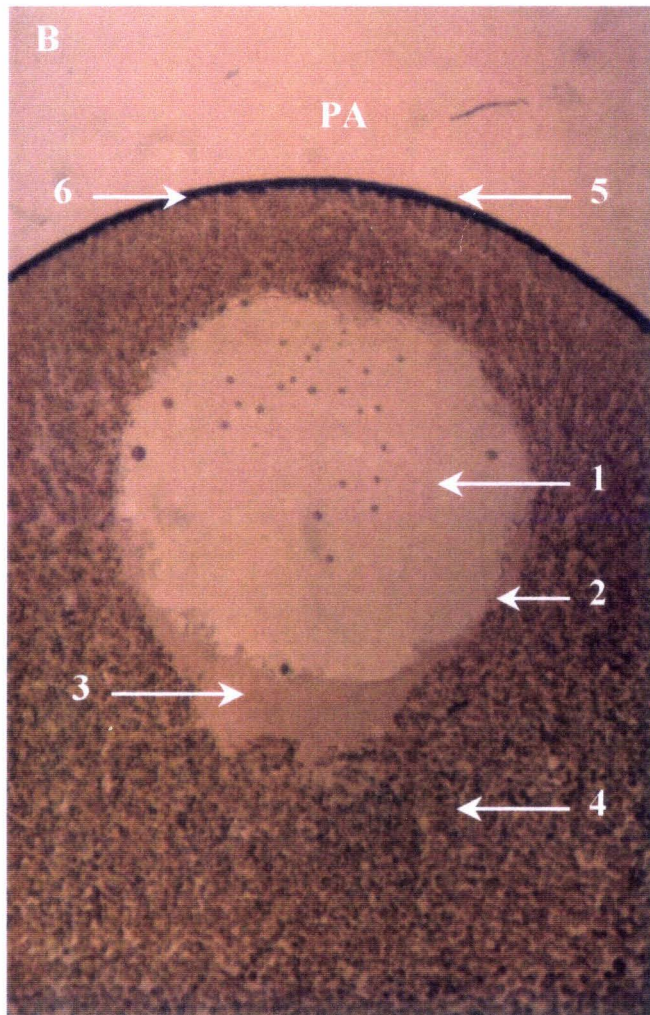
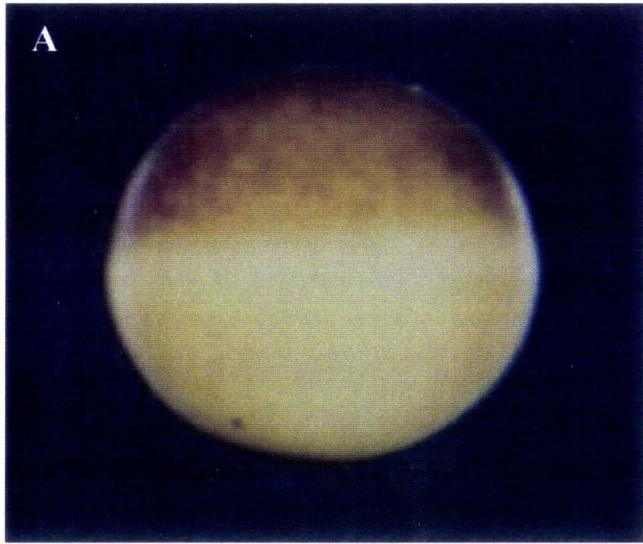


Figure 1. Ovocyte immature de *Xenopus laevis*.

- A. Ovocyte immature de Stade VI de Xénope (x 50). La pigmentation des ovocytes permet de distinguer deux hémisphères : un hémisphère animal de couleur brune et un hémisphère végétatif plus clair, moins riche en pigments.
- B. Coupe d'un ovocyte de stade VI (x 210) : 1. Vésicule germinative, 2. Enveloppe nucléaire, 3. Zone sous-nucléaire dépourvue de plaquettes vitellines, 4. Plaquettes vitellines, 5. Membrane plasmique, 6. Pigments, PA : Pôle animal.

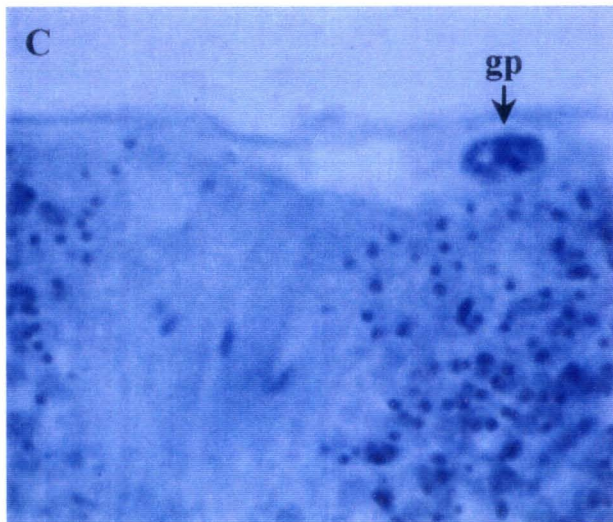
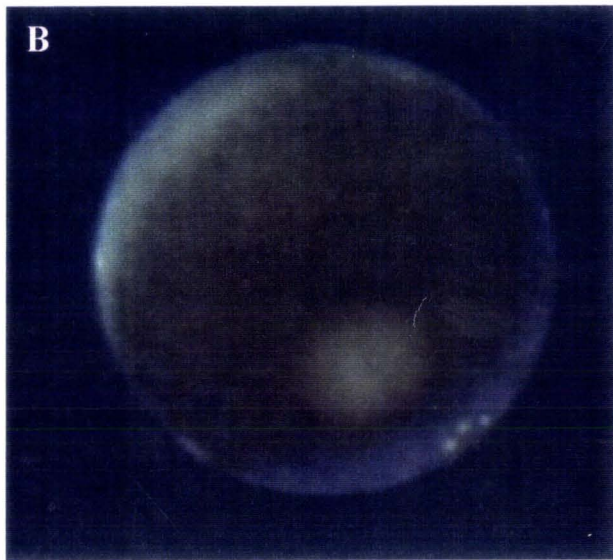
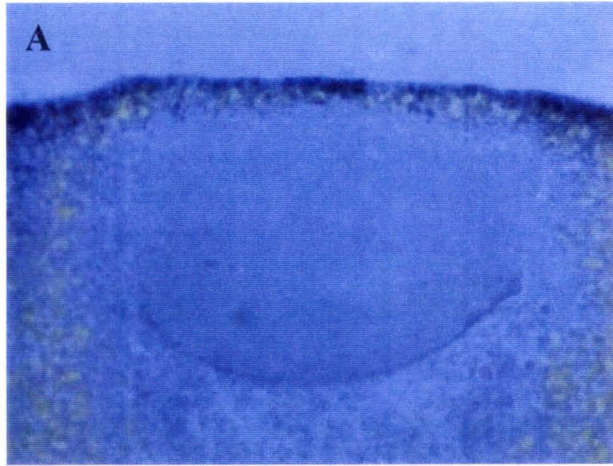


Figure 2. Maturation des ovocytes de *Xenopus laevis*.

- A. Coupe d'un ovocyte au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD ; x 200).
- B. Ovocyte mature (x 55). La migration de la vésicule germinative vers le pôle animal entraîne l'apparition d'une zone dépourvue de pigments à l'apex de la cellule : la tache de maturation.
- C. Coupe d'un ovocyte mature bloqué en métaphase II (x 800) : le fuseau de métaphase est ancré dans la membrane plasmique, perpendiculaire à la membrane ; gp : premier globule polaire.

1.2 Déclenchement de la reprise de la méiose.

Sous l'action des gonadotropines, les cellules folliculaires sécrètent une hormone analogue à la progestérone. En effet, lorsqu'elle est ajoutée dans le milieu physiologique elle est capable de déclencher la maturation des ovocytes d'amphibiens anoures (Masui, 1967 ; Schuetz, 1967 ; Smith et coll., 1968) et urodèles (Vilain, 1977). Le mode d'action habituel de cette hormone stéroïde fait intervenir des récepteurs nucléaires. Cependant, l'injection de progestérone est sans effet sur les ovocytes de *Rana pipiens* (Masui et Markert, 1971 ; Smith et Ecker, 1969, 1971) ou de *Xenopus laevis* (Jacobelli, 1974 ; Drury et Schorderet-Slatkine, 1975). La maturation peut être obtenue en incubant les ovocytes de Xénope en présence de progestérone sous forme non perméante (Ishikawa et coll., 1977 ; Beaulieu et coll., 1978 ; Godeau et coll., 1978 ; Bandyopadhyay et coll., 1998). Pour induire la maturation, la progestérone agit donc au niveau membranaire mais aucun récepteur n'a pu être identifié, la majorité des études réalisées n'ayant révélé que des liaisons non spécifiques ou artéfactuelles (Liu et Patino, 1993 ; Maller, 1998). Toutefois, une protéine membranaire qui pourrait participer à la composition du récepteur de la progestérone a été isolée (Falkenstein et coll., 1996 ; Meyer et coll., 1996).

Par ailleurs, la progestérone stimule dans des préparations de membranes plasmiques d'ovocytes de Xénope une activité tyrosine kinase responsable de l'activation de la phospholipase C (Morrison et coll., 2000). Elle provoque également une augmentation de la concentration d'IP₃ (Carrasco et coll., 1990, Stith et coll., 1992 ; Whitacker, 1995), nécessaire à la maturation (Han et Lee, 1995). L'IP₃ se fixe au niveau du réticulum endoplasmique et induit la libération des ions calcium stockés dans cet organite. Cette libération de calcium pourrait jouer un rôle dans la reprise de la méiose induite par la progestérone (Kobrinsky et coll., 1995 ; Duesbery et Masui, 1996a ; 1996b).

1.3 Le MPF.

L'existence d'un facteur cytoplasmique responsable de la reprise de la méiose des ovocytes d'amphibien a été mise en évidence par des expériences de transfert de cytoplasme. En effet, 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 cytoplasmique a été appelé Maturation-Promoting Factor (MPF).

Il est apparu que l'activité du MPF est dépendante de son état de phosphorylation (Wu et Gerhart, 1980). La purification du MPF a révélé qu'il est composé de deux sous-unités (Lohka et coll., 1988) et des études menées sur les levures ont contribué à l'identification des composants du MPF. En premier lieu, le gène *cdc2* a été cloné et séquencé : il code une protéine de 34 kDa (Hindley et Phear, 1984 ; Simanis et Nurse, 1986). Des gènes homologues au gène *cdc2* ont été trouvés par la suite dans de nombreuses espèces. Tous les produits de ces gènes codent des protéines d'une masse de 33/34 kDa possédant une séquence conservée de 16 acides aminés renfermant un motif "PSTAIR". Il a été montré que le deuxième composant du MPF, une protéine de 45 kDa purifiée chez le Xénope était reconnue par des anticorps anti-cycline B (Gautier et coll., 1990), et s'associait avec la protéine kinase *cdc2* (Gautier et coll., 1990). Les cyclines ont été identifiées pour la première fois durant les clivages embryonnaires des œufs d'invertébrés marins. Synthétisées rapidement lors de l'interphase, elles sont dégradées de manière abrupte à la fin de chaque mitose (Evans et coll., 1983). La cycline B avait été identifiée comme un composant du MPF dans d'autres espèces dès 1989 (Minshull et coll., 1989).

Ainsi, le MPF est un complexe constitué de deux sous-unités : la première, catalytique, est la protéine-kinase homologue au produit du gène *cdc2* de levure, et la seconde, régulatrice, correspond à la cycline B. Le MPF est apparu comme un régulateur universel de la phase M, impliqué tant dans la mitose des cellules somatiques que dans la méiose des cellules germinales. Depuis la découverte de ce complexe, d'autres complexes analogues ont pu être mis en évidence. Aussi, les protéines-kinases dont l'activité est régulée par les cyclines sont appelées cyclin-dependent kinases (cdk). *cdc2* qui constitue le chef de file de ces cdks, a été baptisée *cdk1*. A ce jour, on dénombre 9 cdks et 11 types de cyclines (A-K). Ces molécules s'associent pour former divers complexes enzymatiques dont les partenaires peuvent parfois s'échanger afin d'intervenir à différents moments du cycle cellulaire.

1.4 Régulation de l'activité protéine-kinase du MPF.

1.4.1 Cycline B : sous-unité régulatrice.

Dans les extraits cytoplasmiques d'œufs de Xénope, les niveaux de cycline B évoluent de manière cyclique (Murray et Kirschner, 1989). Cette apparition cyclique est supprimée

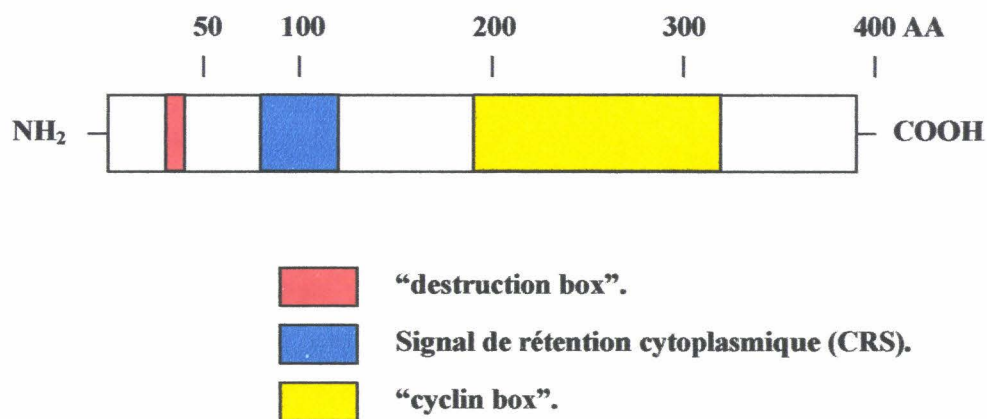
lorsque la synthèse protéique est inhibée. Si les ARN messagers (ARNm) sont éliminés des extraits par un traitement à la RNase et si de l'ARNm codant pour la cycline B d'oursin est ajouté, l'activité MPF réapparaît de manière cyclique.

Les cyclines sont nécessaires à l'activation de leurs kinases associées et sont aussi responsables non seulement de la spécificité envers le substrat mais aussi de la localisation intracellulaire du complexe cycline-cdk (Booher et coll., 1989).

Les cyclines possèdent trois domaines essentiels (Figure 3) :

- La "cyclin box" est une région consensus constituée d'environ 100 acides aminés localisés dans la moitié C-terminale de la protéine. Elle est impliquée dans la liaison entre la cycline B et cdk1.
- La "destruction box", dans la partie N-terminale, consiste en une séquence de 9 résidus requis pour la destruction de la protéine à la transition métaphase-anaphase.
- Un signal de rétention cytoplasmique d'environ 40 résidus, situé entre la "cyclin box" et la "destruction box", serait responsable du maintien de la cycline B dans le cytoplasme lors de la phase G2 (Hunt, 1991 ; Pines et Hunter, 1994).

Figure 3 : structure des cyclines B.



Cinq types de cyclines B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Minshull et coll., 1989 ; Brandeis et coll., 1998), et deux types (B1 et B2) dans les cellules de mammifères (Pines et Hunter, 1989 ; Jackman et coll., 1995). Deux sous-types de cyclines, les cyclines B1 (397 résidus) et B2 (392 résidus) sont majoritairement présents dans les ovocytes et les embryons de Xénope (Minshull et coll., 1990 ; Kobayashi et coll., 1991).

1.4.2 *cdk1(p34^{cdc2})* : sous-unité catalytique.

Les cdks possèdent également une séquence en acides aminés très conservée : le motif "PSTAIRE". L'étude cristallographique de la kinase *cdk2*, qui présente plus de 60% de similitudes avec *p34^{cdc2}*, a montré que cette séquence est exposée à la surface de la protéine (De Bondt et coll., 1993). Les mutations de cette région empêchent sa liaison avec la cycline. De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le motif PSTAIRE permet d'immunoprécipiter la cdk sous forme monomérique, témoignant de la nécessité de cette région dans la formation du complexe cdk/cycline (Pines et Hunter, 1990). La liaison de la cycline B à *cdk1* ne suffit pas à induire l'activité protéine-kinase du MPF. Un changement de l'état de phosphorylation de la sous-unité catalytique *cdk1* est également requis. Après formation du complexe *cdk1*-cycline B, *cdk1* est phosphorylée sur trois résidus : thréonine 14, tyrosine 15 et thréonine 161 (figure 4A). Les phosphorylations sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 affectent le site de fixation de l'ATP et permettent le maintien de la kinase sous sa forme inactive. La phosphorylation de la thréonine 161, indispensable à l'activité de *cdk1*, est aussi importante pour l'association à la cycline B. Cette forme triphosphorylée inactive s'accumule au cours de l'interphase des cellules somatiques. Elle est présente dans les ovocytes immatures de Xénope, qui possèdent par conséquent un stock important de pré-MPF. Au cours de la reprise de la méiose, les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 sont déphosphorylés, tandis que la thréonine 161 demeure phosphorylée. La déphosphorylation du site de fixation à l'ATP est en relation avec l'apparition de l'activité H1 kinase, représentative de l'activation du MPF.

1.4.2.1 Phosphorylation activatrice par la Cdk-Activating Kinase (CAK).

L'activité de *cdk1* requiert la phosphorylation d'un site spécifique, la thréonine 161. Ce résidu thréonine est conservé dans les différentes cdks. Cette phosphorylation est catalysée par une enzyme initialement appelée CAK (Cdk-Activating Kinase). CAK a été purifiée à partir d'extraits d'ovocytes de Xénope et d'étoile de mer (Solomon et coll., 1993 ; Poon et

coll., 1993 ; Fesquet et coll., 1993). Il s'agit d'un complexe cycline/cdk. cdk7 ou MO15 constitue la sous-unité catalytique de ce complexe (Solomon, 1994). En effet, l'immunodéplétion de cdk7 élimine l'activité CAK et bloque l'entrée en mitose d'extraits d'ovocytes de Xénope (Fesquet et coll., 1997). La sous-unité régulatrice est la cycline H (Fisher et Morgan, 1994 ; Makela et coll., 1994), dont l'expression ne change pas durant le cycle cellulaire, à la différence des autres cyclines. cdk7 possède deux sites de phosphorylation, la sérine 164 et la thréonine 170. La phosphorylation de T170 est nécessaire à la liaison entre cdk7 et la cycline H (Martinez et coll., 1997). La kinase responsable, CAKAK (Cdk-Activating Kinase Activating Kinase), n'est pas encore identifiée. Une troisième sous-unité, MAT1, permet l'association entre cdk7 et la cycline H. Elle pourrait réguler l'activité CAK en jouant le rôle d'un facteur d'assemblage (Tassan et coll., 1994 ; Nigg, 1995).

On peut également noter que le couple cdk7/cycline H fait partie du facteur de transcription TFIIH nécessaire à la ARN polymérase II pour la transcription des gènes (Roy et coll., 1994 ; Feaver, 1994). L'activité kinase de cdk7 est dirigée vers le domaine répété de la partie carboxy-terminale de l'ARN polymérase II ; cette phosphorylation est nécessaire à l'activité transcriptionnelle (Nigg, 1995).

1.4.2.2 Phosphorylations inhibitrices : *Wee1*, *Myt1*.

Deux autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur p34^{cdc2}, les résidus thréonine 14 et tyrosine 15. La phosphorylation de ces sites n'interfère pas avec la liaison de l'ATP mais empêche le substrat d'accéder au site catalytique de la kinase, rendant la cdk inactive (Atherton-Fessler et coll., 1993). La phosphorylation de ces résidus est importante dans la régulation du contrôle de l'entrée en mitose. Dès sa synthèse, la cycline B interagit avec p34^{cdc2} et la phosphorylation des résidus thr 14 et tyr 15 ne survient qu'après la liaison avec la cycline B (Solomon et coll., 1990 ; Meijer et coll., 1991 ; Solomon et coll., 1992). Le complexe p34^{cdc2}/cycline B s'accumule en phase G2 et est maintenu inactif sous la forme de pré-MPF jusqu'à la transition G2/M (Krek et Nigg, 1991a ; 1991b ; Norbury et coll., 1991 ; Solomon et coll., 1992).

L'une des protéines-kinases impliquées dans la phosphorylation de la tyr 15 est le produit du gène *wee1* (Parker et Piwnica-Worms, 1992). Ce gène, isolé chez les levures, est hautement conservé. Les mutations du gène *wee1* chez les levures provoquent le déclenche-

A.

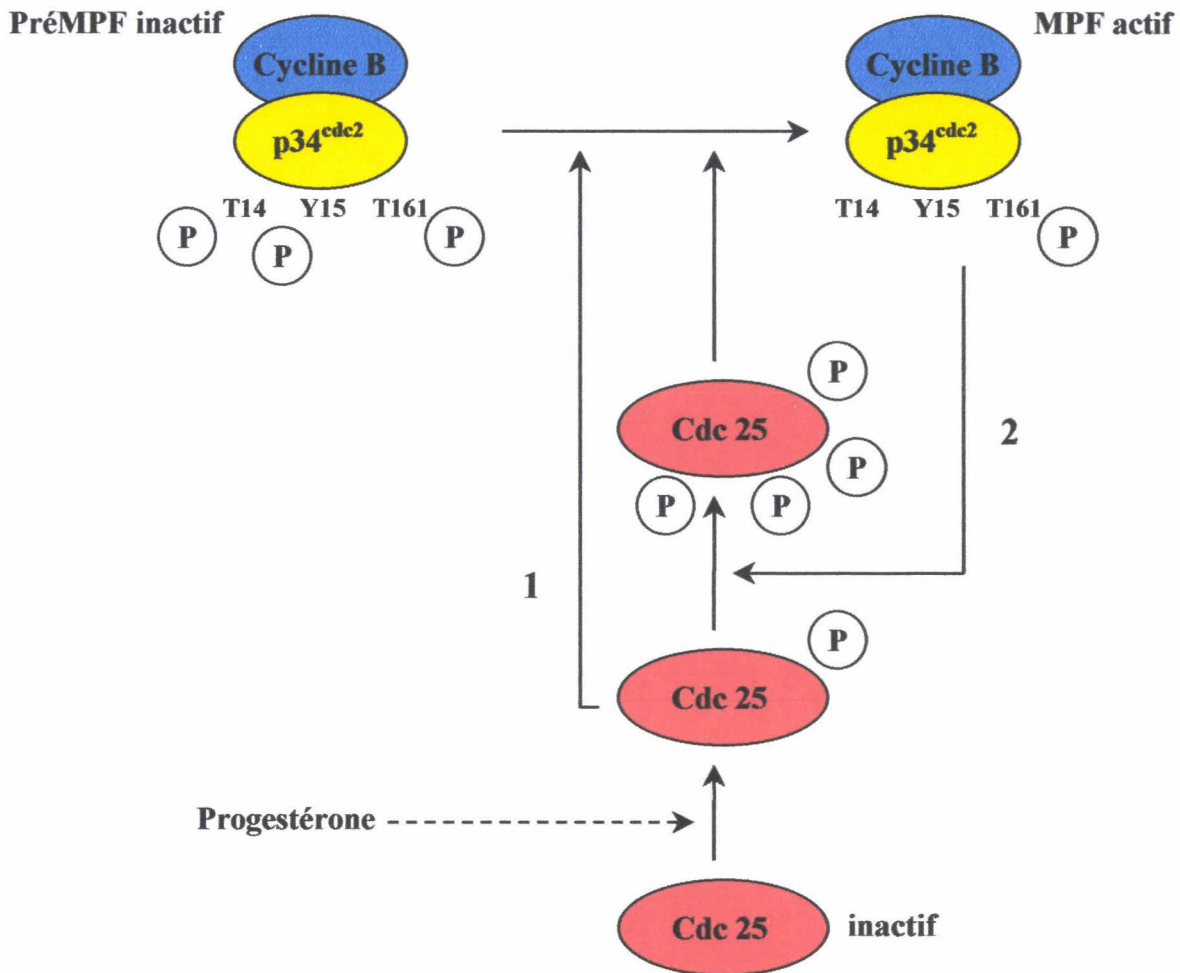
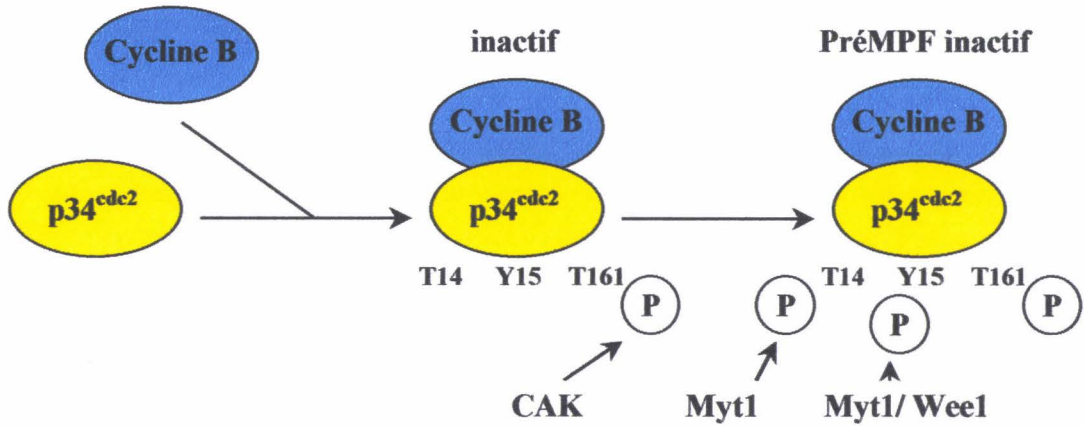


Figure 4 : Régulation du MPF.

A. Formation du préMPF, B. Conversion du préMPF en MPF, schéma simplifié de l'activation en deux étapes du MPF, 1 : activation linéaire, 2 : auto-amplification (Modifié d'après Karaiskou et coll., 1999).

ment prématuré de la phase M et entraînent une diminution de la taille des cellules. Une autre protéine-kinase, Myt1, a été identifiée sur la base de sa forte homologie avec wee1 (Atherton-Fessler et coll., 1994 ; Kornbluth et coll., 1994 ; Mueller et coll., 1995 ; Fattaey et Richter, 1997 ; Liu et coll., 1997). Wee1 n'est pas responsable de la phosphorylation de Thr 14 (Parker et Piwnica-Worms, 1992 ; McGowan et Russel, 1993), tandis que Myt1 est capable de phosphoryler ce résidu (Mueller et coll., 1995 ; Liu et coll., 1997). Cependant, wee1 est absente des ovocytes immatures et ne commence à s'accumuler que lors de la deuxième division de méiose (Murakami et Vande Woude, 1998). Wee1 ne jouerait un rôle dans le contrôle de p34^{cdc2} qu'après la fécondation. De plus, l'absence de wee1 entraîne l'absence d'interphase entre les deux divisions de méiose (Nakajo et coll., 2000). MAPK serait un régulateur potentiel de wee1 et interviendrait dans le contrôle de la durée du premier cycle de division (Walter et coll., 2000).

Dans l'ovocyte, Myt 1 serait donc responsable des phosphorylations inhibitrices de p34^{cdc2} (Kornbluth et coll., 1994 ; Watanabe et coll., 1995 ; Mueller et coll., 1995 ; Liu et coll., 1997). Les interactions entre p34^{cdc2}/cycline B et Myt1 se feraient par le biais du domaine carboxy-terminal de Myt1. Cette liaison pourrait permettre à Myt 1 de séquestrer p34^{cdc2}/cycline B dans le cytoplasme (Wells et coll., 1999).

1.4.2.3 Déphosphorylation activatrice par Cdc25.

Cdc25 est la phosphatase activatrice de cdk1. Cette phosphatase est responsable de la déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15, étape nécessaire à l'activation du complexe p34^{cdc2}/cycline B (Kumagai et Dunphy, 1991 ; Gautier et coll., 1991 ; Strausfeld et coll., 1991 ; Millar et Russel, 1992). Trois types de protéines-phosphatases cdc25 ont été mis en évidence : les phosphatases cdc25A et cdc25B interviennent durant la transition G1/S tandis que cdc25C intervient lors de la transition G2/M (Nilsson et Hoffmann, 2000).

La microinjection de protéines recombinantes Cdc25 (A, B, ou C) provoque la reprise de la méiose jusqu'en métaphase I (Gautier et coll., 1991 ; Lee et coll., 1992 ; Izumi et coll., 1992 ; Hoffmann et coll., 1993 ; Rime et coll., 1994). La microinjection de cdc25 activerait une petite quantité de pré-MPF endogène suffisante pour enclencher un processus d'autoamplification. En effet, des expériences de microinjection de cytoplasme ont démontré une amplification autocatalytique du MPF (Masui et Markert, 1971 ; Reynhout et Smith, 1974 ; Kishimoto et Kanatani, 1976). Chez *Xenopus*, cette amplification s'effectue de manière normale en l'absence de toute synthèse protéique (Wasserman et Masui, 1975 ; Miake-Lye et

coll., 1983 ; Gerhart et coll., 1984). Les expériences de microinjection de *cdc25* ont également montré l'existence d'un rétrocontrôle positif entre $p34^{cdc2}$ et *cdc25*. Le complexe $p34^{cdc2}$ /cycline B est capable de phosphoryler et d'activer *cdc25* *in vitro* (Hoffmann et coll., 1993 ; Izumi et Maller, 1993 ; Strausfeld et coll., 1994). En effet, *cdc25* est régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation, et seule la forme phosphorylée de Cdc25 est active (Izumi et coll., 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1992). Cependant, même si la phosphorylation de Cdc25 par $p34^{cdc2}$ est nécessaire pour la boucle d'autoamplification du MPF, elle n'est pas suffisante (Izumi et Maller, 1992 ; Karaïskou et coll., 1998). D'autres protéines-kinases sont donc impliquées dans l'activation de *cdc25*. La phosphorylation de *cdc25* catalysée par la polokinase Plx1 a été impliquée *in vivo* et *in vitro* dans l'activation de *cdc2* (Kumagai et Dynphy, 1996 ; Qian et coll., 1998a). Une kinase capable de phosphoryler Plx1, la Plk1, a été caractérisée chez le Xénope (Qian et coll., 1998a ; 1998b). L'amplification du MPF serait un mécanisme se déroulant en deux étapes (Karaïskou et coll., 1998 ; Karaïskou et coll., 1999) (Figure 4B).

L'intervention d'autres kinases dans la régulation positive ou négative de *cdc25* ou dans sa localisation cellulaire n'est pas exclue (Izumi et Maller, 1993 ; 1995 ; Qian et coll., 1998a). Cdc25 peut également interagir avec des protéines régulatrices telles que Pin-1 et les protéines à domaine 14-3-3 (Conklin et coll., 1995 ; Sanchez et coll., 1997 ; Kumagai et coll., 1998a ; Shen et coll., 1998). La liaison de 14-3-3 entraîne un retard d'activation de *cdc25* (Kumagai et coll., 1998a ; 1998b), mais les mécanismes par lesquels ces protéines régulent l'activité de la phosphatase *cdc25* restent mal connus. De même, l'identité des phosphatases qui catalysent la déphosphorylation de *cdc25* est incertaine. L'acide okadaïque, un inhibiteur de PP1 et PP2A, provoque l'autoamplification du MPF, à une concentration insuffisante pour inhiber PP1 (Félix et coll., 1990 ; Goris et coll., 1989 ; Izumi et coll., 1992 ; Karaïskou et coll., 1998). L'inhibition de PP2A est nécessaire pour la déphosphorylation de $p34^{cdc2}$ et intervient dans le mécanisme d'autoamplification du MPF (Karaïskou et coll., 1999).

1.4.3 Protéines associées.

Chez les levures, les effets des mutations qui affectent $p34^{cdc2}$ sont supprimées par la surexpression du gène *suc1* (Hayles et coll., 1986) ou de *cdc13* (Booher et Beach, 1987). *In vitro*, il a été montré que le produit de *suc1* se lie à $p34^{cdc2}$ et régule son activité (Brizuela et coll., 1987). La délétion de *suc1* entraîne un arrêt en mitose, avec une activité MPF élevée (Moreno et coll., 1989). La protéine codée par ce gène, $p13^{suc1}$, est présente durant la totalité

du cycle cellulaire. Sa surexpression dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope retarde l'entrée en mitose (Dunphy et Newport, 1989). La déplétion de Xe-p9, l'homologue de p13^{suc1} chez le Xénope, empêche l'activation du MPF lors de la transition G2/M (Patra et Dunphy, 1996).

La protéine p13^{suc1} s'associe physiquement au MPF, cette propriété a été largement mise à profit pour purifier le MPF. Le mécanisme d'action de p13^{suc1} n'a pas été élucidé. Des études cristallographiques ont montré que le site d'interaction entre p13^{suc1} et cdk1 se situe dans la partie C-terminale de cdk1, loin des sites de phosphorylation Thr14 et Tyr15.

Une nouvelle protéine qui s'associe au MPF a récemment été clonée. Cette protéine, p33^{ringo} (Ferby et coll. 1999) ou speedy (Lenormand et coll., 1999), se lie à cdk1 et l'active. La fonction exacte de cette protéine n'est pas encore connue mais l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre p33^{ringo} inhibe la maturation induite par la progestérone et suggère un rôle essentiel de cette protéine dans la reprise de la méiose.

1.5 Cibles du MPF.

Comment le MPF peut-il être responsable des événements cytologiques caractéristiques de la maturation des ovocytes de Xénope, et plus généralement, de l'entrée en phase M? La phosphorylation d'un certain nombre de substrats par le MPF suffirait à provoquer la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et la formation du fuseau (Kishimoto et coll., 1994). La phosphorylation des lamines, constituants de l'enveloppe nucléaire, entraînerait la GVBD. Au cours de la mitose, les lamines sont hyperphosphorylées et sont déphosphorylées en sortie de phase M (Burke et Gerace, 1986 ; Heald et Mc Keon, 1990). La lamine B2 recombinante d'oiseau est phosphorylée *in vitro* par cdc2 sur des sites identiques à ceux phosphorylés *in vivo* (Peter et coll., 1990). Cependant, si des noyaux interphasiques sont ajoutés au MPF purifié, la phosphorylation des lamines se produit, la lamina est désorganisée mais l'enveloppe nucléaire reste intacte (Peter et coll., 1990). La phosphorylation des lamines par p34^{cdc2} est nécessaire mais n'est pas suffisante. D'autres protéines interviennent sans doute : MAPK est par exemple capable de phosphoryler les lamines sur les mêmes sites que p34^{cdc2} (Peter et coll., 1992).

L'activité Histone H1 kinase, associée à l'activité MPF, augmente fortement avant l'entrée en phase M. Le complexe p34^{cdc2}/cycline B phosphoryle H1 *in vitro* et *in vivo* sur les mêmes sites (Guo et coll., 1995). La phosphorylation de l'histone H1 pourrait être requise pour le

recrutement de facteurs de compaction comme la topoisomérase II (Adachi et coll., 1991), responsable de la condensation des chromosomes.

Par ailleurs, les sous-unités δ et γ du facteur d'élongation EF1 (elongation factor 1) sont phosphorylées *in vivo* par le MPF au cours de la maturation (Mulner-Lorillon et coll., 1989 ; Bellé et coll., 1995). Bien que le rôle de ces phosphorylations demeure mal connu, elles constituent un lien direct entre le MPF et l'augmentation de la synthèse protéique.

Plusieurs travaux ont montré que le MPF était associé aux microtubules (Fellous et coll., 1994 ; Ookata et coll., 1995). La localisation de $p34^{cdc2}$ au niveau des microtubules suggère que $p34^{cdc2}$ phosphoryle les protéines associées aux microtubules (MAP). Le MPF phosphoryle MAP2 au niveau de la région qui régule la liaison avec la tubuline. La phosphorylation de ce domaine de liaison diminue la fixation de MAP2 sur la tubuline et la polymérisation des microtubules (Burns et coll., 1984). En outre, *in vitro*, la vitesse d'élongation des microtubules est régulée par $p34^{cdc2}$ (Verde et coll., 1990 ; 1992). Dans d'autres systèmes, il a été montré que $p34^{cdc2}$ est localisée au niveau des centrosomes (Riabowol et coll., 1989 ; Ookata et coll., 1992 ; Kubiak et coll., 1993). Cette immunolocalisation au niveau des centrosomes existe dans les cellules en métaphase mais disparaît dès l'anaphase, au moment où chute l'activité MPF (Bailly et coll., 1989). Ces résultats semblent indiquer que le MPF intervient dans la formation du fuseau mais l'analyse du phénotype des souris *c-mos*/- suggère que *c-mos* et MAPK sont impliquées dans la formation du fuseau méiotique (Verlhac et coll., 1996 ; Duesbery et coll., 1997).

1.6 De la progestérone au MPF.

1.6.1 AMP_c et Protéine Kinase A.

Dans les minutes qui suivent l'application de la progestérone sur les ovocytes de Xénope, l'activité de l'adénylate cyclase est modestement inhibée (50 %) (Finidori-Lepicard et coll., 1981 ; Sadler et Maller, 1981) et le taux d'AMP_c diminue (de 20 à 80%) (Speaker et Butcher, 1977 ; Bravo et coll., 1978 ; Schorderet-Slatkine et coll., 1978 ; Maller et coll., 1979 ; Cicirelli et Smith, 1985). Des agents qui activent l'adénylate cyclase, telles que les méthylxanthines (O'connor et Smith, 1976), inhibent l'action maturante de la progestérone. De même, deux inhibiteurs de phosphodiesterases, la théophylline et la papavérine, inhibent la maturation induite par la progestérone (Bravo et coll., 1978). L'injection d'un anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminale de la sous-unité α de la protéine Gs, une des deux protéines

régulatrices avec Gi de l'activité de l'adénylate cyclase, entraîne la maturation en l'absence de progestérone (Gallo et coll., 1995).

La diminution du taux d'AMPc inhibe la protéine kinase A (PKA). Cette enzyme est dépendante de l'AMPc et toute diminution de l'AMPc entraîne son inhibition. Ainsi, la microinjection d'inhibiteurs de la PKA entraîne la maturation en l'absence de progestérone (Maller et Krebs, 1977). La microinjection d'une sous-unité catalytique active de la PKA empêche la maturation induite soit par la progestérone (Maller et Krebs, 1977), soit par l'injection de la protéine c-mos (Daar et coll., 1993). La PKA exercerait une activité régulatrice négative sur plusieurs niveaux de la maturation induite par la progestérone, en inhibant l'activation du MPF et la traduction de certains ARNm (Matten et coll., 1994 ; Rime et coll., 1994). En effet, l'inhibition de la PKA est suffisante pour entraîner l'accumulation de cycline B1 lorsque p34^{cdc2} est inhibée par p21^{cip1} (Frank-Vaillant et coll., 1999). Cependant, la PKA n'exercerait aucun effet négatif sur la traduction des ARNm de c-mos (Faure et coll., 1998).

1.6.2 pH intracellulaire.

Au cours de la maturation, la valeur du pH intracellulaire (pHi) augmente de manière transitoire. Cette alcalinisation survient dans l'ovocyte de Xénope à 0,2 GVBD₅₀ (20% du temps requis pour que 50% des ovocytes subissent la GVBD) : la valeur de pHi passe de 7,4 à 7,6 puis revient à sa valeur initiale juste avant la GVBD (Lee et Steinhardt, 1981). Cette augmentation se produit également après une injection de MPF (Lee et Steinhardt, 1981). Elle a été rapportée chez d'autres amphibiens tels que *Rana* (Morill et coll., 1984) et *Ambystoma* (Baud et Barish, 1984 ; Rodeau et Vilain, 1987). La variation de pH est due à un efflux de protons (Cicirelli et coll., 1983) qui dépendrait de l'antiport Na⁺/H⁺. Celui-ci peut être activé par phosphorylation : il a d'abord été proposé que c-mos phosphoryle l'antiport Na⁺/H⁺ (Rezai et coll., 1994) mais des études plus récentes montrent que Raf1 (MAPKKK) intervient dans ce processus (Kang et coll., 1998).

Le rôle de cette alcalinisation transitoire reste mal connu. Elle intervient dans la migration de la vésicule germinative (Flament et coll., 1996). Elle pourrait stimuler la synthèse protéique (Wasserman et Houle, 1984) mais ce point reste controversé (Cicirelli et coll., 1983 ; Stith et Maller, 1985).

1.6.3 Synthèse protéique.

La synthèse protéique augmente significativement au cours de la maturation (Smith et coll., 1966 ; Baltus et coll., 1973), même dans les ovocytes énucléés incubés en présence de progestérone (Smith et Ecker, 1969). L'activité du MPF chez le Xénope apparaît en l'absence de toute transcription (Schorderet-Slatkine et Drury, 1973, Reynhout et Smith, 1974). Par contre, les inhibiteurs de la traduction comme la cycloheximide empêchent l'activation du MPF, qui nécessiterait la production d'une protéine initiatrice (Wasserman et Masui, 1975). Cette dépendance vis-à-vis de la synthèse protéique n'existe plus après 0,65 GVBD₅₀ (65% du temps requis pour que 50% des ovocytes subissent la GVBD).

1.6.3.1 Cyclines

On a longtemps pensé que la maturation des ovocytes d'amphibien nécessitait la synthèse de cycline. En effet, les observations faites sur les modèles acellulaires ont révélé que la synthèse de cycline est primordiale (Murray et coll., 1989). En outre, la maturation peut être obtenue par simple injection de cycline ou de son ARNm (Swenson et coll., 1986 ; Westendorf et coll., 1989). Toutefois, des expériences fondées sur une analyse cytologique systématique des ovocytes ont démontré que de tels ovocytes n'évoluaient pas au delà de la métaphase I (Huchon et coll., 1993). Il semble cependant que la synthèse de cycline ne soit pas nécessaire, puisque des ovocytes de Xénope qui reçoivent des oligonucléotides antisens des cyclines A, B1 ou B2 évoluent normalement jusqu'en métaphase II lorsqu'ils sont traités par la progestérone (Minshull et coll., 1991). La maturation complète requiert donc la synthèse d'une ou plusieurs protéines autres que la cycline et la seule activation du MPF est insuffisante pour obtenir une maturation complète.

1.6.3.2 *c-mos*.

Une autre protéine s'avère prépondérante dans le déclenchement de la reprise de la méiose induite par la progestérone : le produit du proto-oncogène *c-mos* (Figure 5). Ce proto-oncogène a été découvert comme le gène transformant du virus murin de Moloney, responsable de la formation de sarcomes (Van Beveren et coll., 1981). Il s'agit d'une sérine/thréonine kinase de 39 kDa exprimée en quantité importante dans les cellules germinales. L'implication de cette protéine dans la reprise de la méiose a été démontrée de

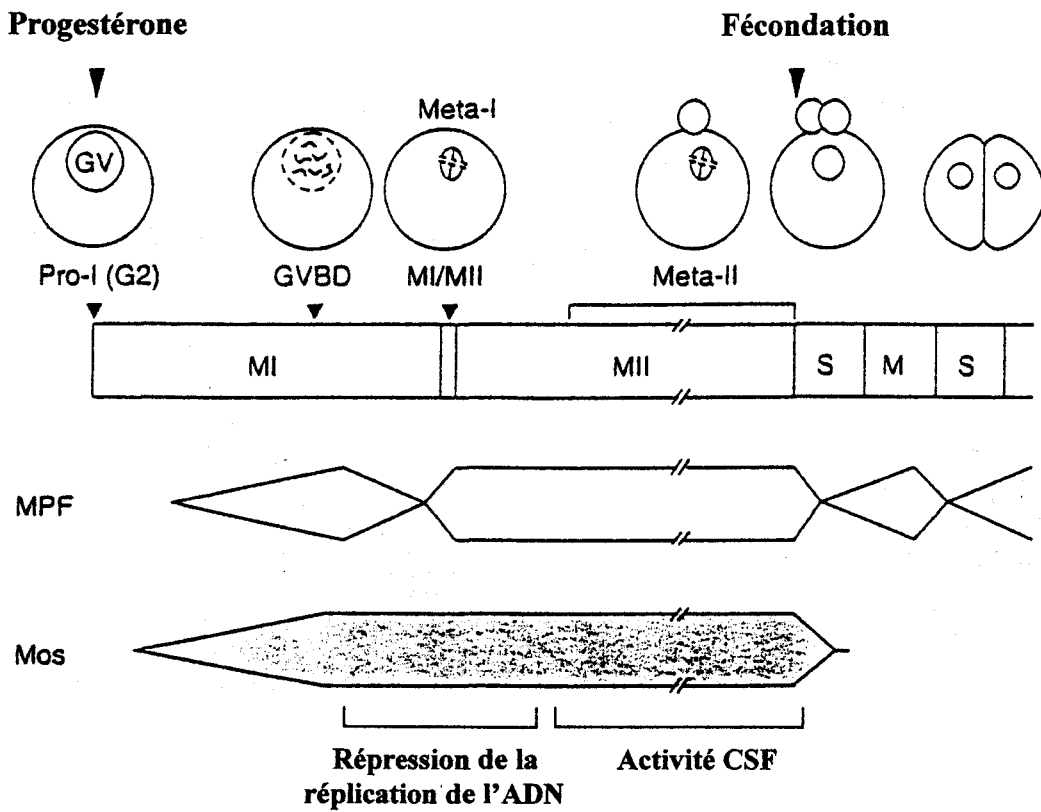


Figure 5 : expression et fonction de c-mos au cours de la division méiotique de l'ovocyte de *Xenopus* (modifié d'après Sagata, 1996).

plusieurs manières. L'injection d'oligonucléotides antisens de c-mos bloque la maturation induite par la progestérone (Sagata et coll., 1988). L'injection d'ARN^m messagers de c-mos induit la maturation en l'absence de progestérone (Sagata et coll., 1989 ; Freeman et coll., 1989). De plus, l'injection d'une protéine de fusion Maltose Binding Protein (MBP)-mos induit la maturation (Sagata et coll., 1989) même si les ovocytes sont incubés dans un milieu contenant de la cycloheximide (Yew et coll., 1992). Dans ces conditions, la méiose s'arrête après la première division avec un niveau d'activité MPF très faible et une kinase c-mos active (Yew et coll., 1992). Une autre protéine que c-mos doit être alors synthétisée pour permettre l'entrée en deuxième division de méiose.

Lors de la maturation ovocytaire, la cellule effectue deux divisions qui ne sont pas séparées par une interphase classique : l'enveloppe nucléaire ne se reforme pas, les chromosomes restent condensés et il n'y a pas de synthèse d'ADN. Dans les ovocytes de Xénope, si la synthèse protéique est inhibée au stade de la GVBD par addition de cycloheximide, un noyau se reforme et la synthèse d'ADN reprend (Furuno et coll., 1994). De même, lorsque les ovocytes de Xénope sont injectés avec des oligonucléotides antisens c-mos ou des anticorps anti-c-mos, au stade de la GVBD, on observe la formation d'un noyau et une nouvelle synthèse d'ADN (Daar et coll., 1991 ; Furuno et coll., 1994). Ces événements sont associés à l'inactivation du MPF due à la rephosphorylation de cdc2 sur tyrosine 15 alors que cela n'a jamais lieu entre les deux divisions de méiose. Lorsque des ovocytes de Xénope sont stimulés par la progestérone puis injectés d'une forme mutée de cdc2 (K33R), il n'y a pas d'entrée en deuxième division de méiose et la réplication de l'ADN débute en dépit d'une expression normale de c-mos (Nebreda et coll., 1995). Ainsi, la protéine codée par le proto-oncogène c-mos serait également importante pour l'entrée en deuxième division de méiose : elle empêcherait la synthèse d'ADN en induisant une réactivation rapide du MPF. Par contre, dans les ovocytes de souris, c-mos n'intervient pas dans la reprise de la méiose et dans la suppression de la synthèse d'ADN entre les deux divisions de méiose (Hashimoto, 1996).

1.6.3.3 *Cdk 2*.

Parmi les autres protéines synthétisées lors de la maturation, il faut citer cdk2, protéine qui a d'abord été isolée chez le Xénope (Paris et coll., 1991). Elle est l'homologue de Egl1, protéine dont l'ARN^m est localisé spécifiquement au pôle végétatif de l'ovocyte. Dans les ovocytes immatures, la forme déadénylée non traduite est présente. La

polyadénylation survient au cours de la maturation et les ARN messagers ainsi modifiés sont traduits au niveau des polysomes.

1.6.4 Activation et régulation de la voie MAPK lors de la reprise de la méiose.

1.6.4.1 S6 Kinase/MAPK

La protéine ribosomale S6 est phosphorylée de manière très importante au cours de la maturation (Nielsen et coll., 1982). Cette phosphorylation est en relation avec une augmentation de la synthèse protéique. La kinase qui phosphoryle la protéine S6 a été purifiée chez le Xénope (Erikson et Maller, 1985). C'est la S6 Kinase II, l'homologue de la p90^{rsk} humaine. Des anticorps réalisés contre cette kinase rsk (ribosomal S6 kinase) ont permis de montrer que cette enzyme était ubiquiste et qu'elle était souvent activée par des mitogènes se fixant sur des récepteurs à activité tyrosine-kinase ou par des oncogènes. Incubée *in vitro* avec la protéine-phosphatase 1 (PP1), la S6 kinase est inactivée (Maller, 1987). On a donc cherché à identifier la kinase capable de rephosphoryler et de réactiver p90^{rsk}. On a ainsi démontré que la MAP kinase, enzyme isolée de cellules 3T3 L1 stimulées par l'insuline, ainsi nommée en raison de sa capacité à phosphoryler MAP2 *in vitro*, était capable de réactiver la protéine S6 kinase (Ray et Sturgill, 1987 ; Sturgill et coll., 1988). La même démarche a été ensuite appliquée à la MAP kinase. Dans ce cas, PP1 s'est avérée inefficace mais en revanche, la protéine-phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle les résidus sérine et thréonine pouvait inactiver la MAP kinase. Par ailleurs, une tyrosine-phosphatase isolée du placenta humain est capable d'inactiver la MAP kinase sans pour autant affecter les résidus sérine et thréonine (Anderson et coll., 1990). Cette double phosphorylation de MAPK sur thréonine et tyrosine est en réalité le fait d'une seule kinase, la MAP kinase kinase (MAPKK), qui fait partie au même titre que weel, d'une famille de kinases à double spécificité. Cette MAPKK peut être à son tour inactivée par PP2A sur thréonine et réactivée par des MAPKK kinases dont l'activation se ferait sur les résidus sérine ou thréonine.

1.6.4.2 Activation de la voie MAPK durant la maturation.

La MAPK est activée au cours de la maturation des ovocytes de Xénope induite par la progestérone (Posada et coll., 1991 ; Gotoh et coll., 1991 ; Ferrell et coll., 1991). L'addition de c-mos à des extraits d'ovocytes de Xénope entraîne l'activation de MAPK (Nebreda et

Hunt, 1993). La même observation peut être réalisée lorsque c-mos est injectée dans les ovocytes de Xénope (Posada et coll., 1993). La protéine c-mos immunoprécipitée à partir d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope active directement MAPKK *in vitro* (Nebreda et coll., 1993); c-mos est donc une MAPKKK, en amont de l'activation des MAPK.

L'activation de MAPK précède-t-elle ou entraîne-t-elle celle du MPF? Certains auteurs ont suggéré que l'activation du MPF est dépendante de MAPK (Kosako et coll., 1994; Gotoh et coll., 1995). En effet, l'injection de MAPKK (Gotoh et coll., 1995 ; Huang et coll., 1995) ou de MAPK thiophosphorylée (Haccard et coll., 1993) entraîne l'activation du MPF et la GVBD en l'absence de progestérone. Dans ce cas, l'activation du MPF pourrait être due à l'inhibition de la kinase Myt1, responsable des phosphorylations inhibitrices de p34^{cdc2} dans l'ovocyte de Xénope. Myt1 est régulée négativement par p90^{rsk}, kinase en aval de MAPK (Palmer et coll., 1998). Cependant, la cycloheximide empêche l'activation du MPF après injection de MAPK thiophosphorylée (Haccard et coll., 1993). Par conséquent, la synthèse de nouvelles protéines est nécessaire pour une efficacité maximale de cette injection. En fait, il semble que la synthèse de c-mos soit requise puisque l'injection d'oligonucléotides antisens de c-mos inhibe la maturation induite par injection de MAPK. Cela suppose l'existence d'un rétrocontrôle positif entre MAPK et c-mos.

A l'inverse, d'autres travaux ont montré que la progestérone pouvait induire la GVBD en l'absence d'activité MAPK détectable (Fabian et coll., 1993). Bien que l'injection d'oligonucléotides antisens de c-mos inhibe totalement l'effet maturant de la progestérone (Sagata et coll., 1989), l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre MAPKK (Kosako et coll., 1994 ; Kosako et coll., 1996) ou l'injection de la MAPK phosphatase CL100 (Gotoh et coll., 1995) ne font que retarder la maturation. La geldanamycine, un inhibiteur compétitif de la protéine chaperonne Hsp90, provoque le même effet : la maturation est retardée, et se produit en l'absence d'activité MAPK (Fisher et coll., 2000). En présence d'un inhibiteur de MAPKK (U0126) la progestérone induit l'activation du MPF et la GVBD mais dans cette situation, la deuxième division de méiose ne s'engage pas (Gross et coll., 2000). En effet, le MPF n'est pas réactivé et les ovocytes entrent dans un état interphasique. Ces résultats suggèrent que MAPK n'est pas essentielle pour l'activation du MPF lors de la première division de méiose. Elle serait par contre indispensable à la réactivation du MPF et à l'inhibition de l'entrée en interphase entre les deux divisions de méiose.

Nous avons mentionné ci dessus que l'activation de MAPK pouvait activer le MPF. Il a été démontré que l'activation de MAPK diminue le niveau d'inactivation de cdc2 dans les ovocytes de Xénope et d'étoile de mer (Abrieu et coll., 1997). Dans la mesure où Myt1

semble le principal responsable de l'inactivation de cdc2 dans les ovocytes (Murakami et Vande Woude, 1998), MAPK doit induire l'inactivation de Myt1. p90^{Rsk} serait l'intermédiaire entre MAPK et Myt1. Elle s'associe avec la partie carboxy-terminale de Myt1, la phosphoryle et l'inactive (Palmer et coll., 1998 ; Gavin et Nebreda, 1999).

1.6.4.3 Régulation de c-mos durant la maturation.

1.6.4.3.1 Polyadénylation des ARN messagers.

La reprise de la méiose et le développement précoce dépendent de la traduction d'ARNm de protéines régulatrices du cycle cellulaire (Richter, 1996 ; Wickens et coll., 1997). Les ARNm polyadénylés sont traduits tandis que les ARNm déadénylés se dissocient des ribosomes et ne sont pas traduits (Paris et Philippe, 1990). En utilisant une queue poly(A) "prosthétique", il a été démontré que la seule présence d'une queue poly(A) dans l'ARNm est suffisante pour stimuler l'accumulation de la protéine c-mos et déclencher la reprise de la méiose (Barkoff et coll., 1998). Outre les ARNm de c-mos, la maturation des ovocytes de Xénope nécessite la polyadénylation d'autres ARNm. Ainsi, les ARNm de la cycline B1, de la cycline A1 et de l'histone H4 sont polyadénylés durant la reprise de la méiose (Seydoux, 1996; Ballantyne et coll., 1997 ; De Moor et Richter, 1997). Par ailleurs, des oligonucléotides antisens dirigés contre les séquences de polyadénylation inhibent la maturation des ovocytes de Xénope induite par la progestérone (Sheets et coll., 1995). L'injection d'ARNm complet de c-mos annule les effets de ces oligonucléotides antisens mais pas l'injection d'ARNm de c-mos dépourvus de séquence de polyadénylation. Des expériences réalisées chez la souris ont donné des résultats similaires. L'injection d'oligonucléotides antisens de c-mos empêche la progression de la méiose jusqu'à la métaphase II. L'injection d'ARNm dépourvus de séquence de polyadénylation n'annule pas ce phénotype alors que l'injection d'ARNm complet de c-mos permet la progression de la méiose (Gebauer et coll., 1994).

Les constituants du système de polyadénylation et leurs mécanismes de régulation sont encore peu connus. Cependant, la traduction des ARNm est soumise à un double contrôle, dépendant de la présence d'éléments de régulation dans la région 3' non traduite des ARNm (3'UTR). Cette région contient une séquence riche en uracile, appelée le CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element), qui serait responsable de la polyadénylation des ARNm (Richter, 1999).

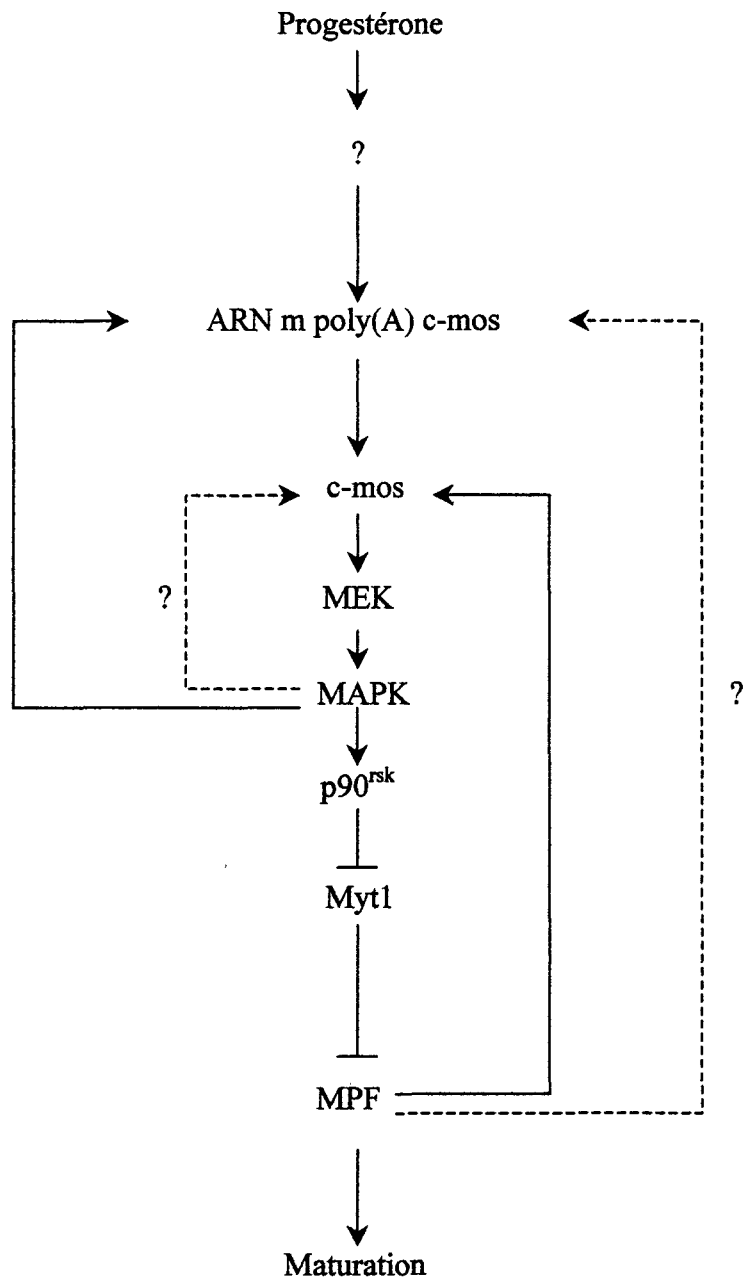


Figure 6. Modèle de régulation de c-mos lors de la maturation.
(modifié d'après Howard et coll., 1999)

Une protéine se liant à cette séquence de polyadénylation a été clonée : la CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein). Celle-ci se lie à la séquence de polyadénylation de plusieurs ARNm (Paris et coll., 1991 ; Hake et Richter, 1994). Elle est requise pour la polyadénylation des ARNm de cyclines, de cdk2 et de c-mos. L'injection d'anticorps neutralisant la CPEB inhibe la traduction de c-mos et la GVBD (Stebbins-Boaz et coll., 1996). La CPEB est phosphorylée lors de la maturation des ovocytes de Xénope, par une voie qui serait dépendante du MPF (Paris et coll., 1991). Il a été récemment déterminé que la phosphorylation du CPEB est catalysée par l'Eg2 kinase (Mendez et coll., 2000). La région 3'UTR pourrait contenir en outre un ou plusieurs éléments répresseurs de la polyadénylation, comme dans le cas des ARNm de la cycline B1, l'inhibition de cette répression permet la polyadénylation (Barkoff et coll., 2000).

D'autre part, la polyadénylation des ARNm de c-mos semble dépendre principalement de la voie MAPK (Figure 6). Dans les ovocytes de Xénope, l'expression d'une MAPK phosphatase, rVH6, ou l'inhibition de MAPKK, empêche l'accumulation de c-mos induite par la progestérone (Howard et coll., 1999). Par ailleurs, le MPF participerait à la régulation positive de la polyadénylation des ARNm de c-mos (Ballantyne et coll., 1997 ; Frank-Vaillant et coll., 1999). L'activation du MPF induite par l'injection d'ARNm de la cycline B1 induit la polyadénylation des ARNm de c-mos et l'accumulation de c-mos, mais ces événements ne peuvent pas se produire en l'absence d'activité MAPK (Howard et coll., 1999). En dernier lieu, c-mos serait directement ou indirectement responsable de la polyadénylation des ARNm des cyclines A1 et B1 qui contiendraient une séquence de type MRE (Mos Response Element) (Ballantyne et coll., 1997 ; De Moor et Richter, 1997).

1.6.4.3.2 Régulation de mos par phosphorylation

La phosphorylation de c-mos joue un rôle essentiel dans son activation et sa stabilité, tant chez le Xénope que chez les mammifères. La sérine 3 (Ser 3) est un résidu conservé dans la protéine c-mos (Figure 7). Celui-ci constitue le site majeur de phosphorylation de cette protéine lors de la reprise de la méiose (Freeman et coll., 1992 ; Nishizawa et coll., 1992). La mutation de la sérine 3 en alanine entraîne la synthèse d'une protéine moins stable. En effet, la charge apportée par la phosphorylation de ce site empêche la reconnaissance de la Proline en position 2 par le système d'ubiquitination. Cela empêche la dégradation de c-mos (Nishizawa et coll., 1993). L'identité des protéines-kinases responsables de la

phosphorylation de ce site n'est pas connue. La Ser 3 serait un site d'autophosphorylation de la protéine (Nishizawa et coll., 1992). En outre, la phosphorylation de Ser 3 facilite l'association de c-mos et de MAPKK (Chen et Cooper, 1995). *In vitro*, MAPK est capable de phosphoryler la Ser 3 de la protéine de fusion MBP-mos (Matten et coll., 1996), ce qui suggère l'existence d'un rétrocontrôle positif entre MAPK et c-mos durant la maturation ovocytaire.

La sérine 25 est le site majeur de phosphorylation de v-mos qui s'exprime dans les cellules somatiques transformées. La phosphorylation de Ser 25 provoque une légère activation de la kinase (Yang et coll., 1996). Cependant, la phosphorylation de ce site pourrait servir à inhiber l'activation de c-mos induite par la phosphorylation de la sérine 3 (Singh et Arlinghaus, 1997). La Ser 25 est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par la PKA qui pourrait ainsi intervenir dans la régulation de l'activité de c-mos (Yang et coll., 1996).

Un autre site de phosphorylation, la sérine 16, a été identifié sur une protéine de fusion gag-mos durant la phase M de cellules transformées (Bai et coll., 1991). Des peptides synthétiques contenant la Ser 16 sont phosphorylés par le MPF *in vitro*. Des mutations de ce site ont révélé son importance pour l'activité biologique de c-mos (Singh et Arlinghaus, 1997). Des études récentes ont montré que la mutation de la sérine 16 en alanine rend la protéine hautement instable. La phosphorylation de Ser 16 pourrait intervenir dans l'inhibition de la protéolyse de c-mos (Pham et coll., 1999). La sérine 16 est également phosphorylée *in vitro* par MAPK (Matten et coll., 1996).

D'autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence. La sérine 263 de v-mos est un site mineur de phosphorylation dans les cellules somatiques transformées. Il peut être phosphorylé par la PKA *in vitro* (Singh et Arlinghaus, 1997). La sérine 105 est importante pour la reprise de la méiose induite par l'injection de c-mos, bien que ce site ne semble pas phosphorylé lors de la maturation (Freeman et coll., 1992).

Hormis la PKA, le MPF et MAPK, la PKC serait aussi capable de réguler l'activité de mos. En effet, la PKC est requise pour l'activation de v-mos dans les cellules transformées (Al Bagdadi et coll., 1990). Il reste à déterminer si cette activation implique la phosphorylation directe de c-mos par la PKC et si cette phosphorylation joue un rôle lors de la reprise de la méiose.

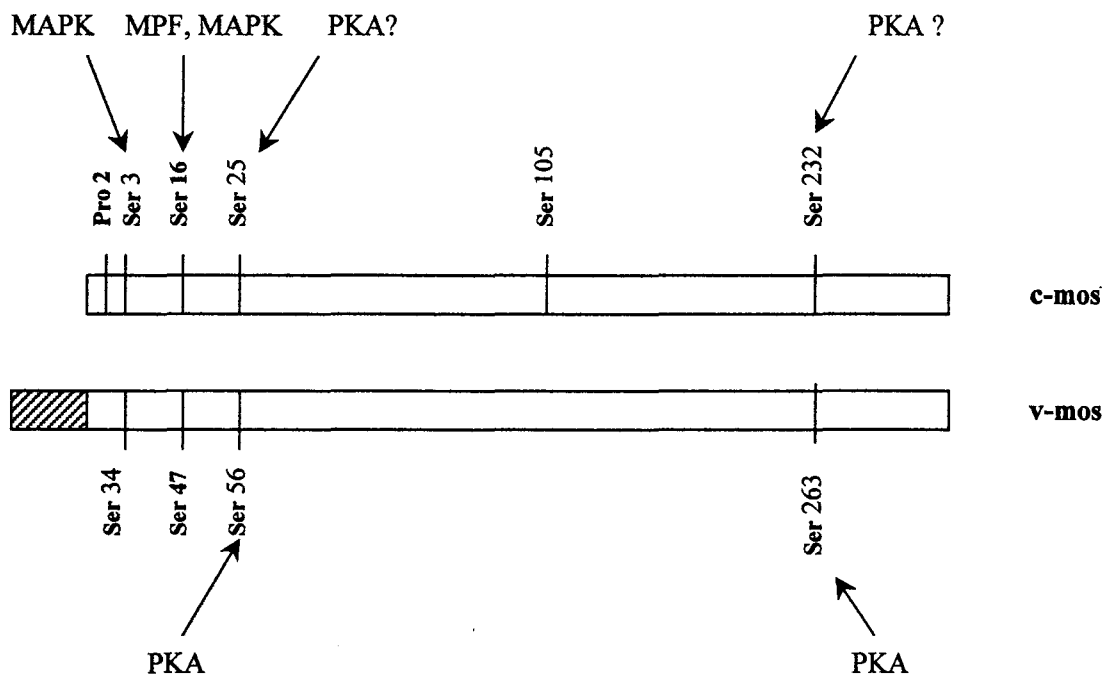


Figure 7 : sites de phosphorylations de c-mos et v-mos.

Lors de la reprise de la méiose, la Ser 3 constitue le site majeur de phosphorylation de c-mos. La Ser 105 jouerait également un rôle essentiel dans la maturation des ovocytes de Xénope.

2 Blocage en Métaphase II.

2.1 Deuxième arrêt de la méiose.

Dans toutes les espèces se produit un arrêt en prophase de première division de méiose. Cet arrêt peut durer plusieurs années durant lesquelles s'effectuent la croissance de l'ovocyte et la préparation du développement embryonnaire ultérieur. La levée de ce blocage se produit soit lors de la fécondation soit lors d'une stimulation hormonale préalable (Figure 8).

Dans le cas de la stimulation hormonale, selon les espèces, les ovocytes subissent un deuxième arrêt, en métaphase I ou en métaphase II, ou encore au stade pronucleus après émission du second globule polaire. Ces différents arrêts en métaphase sont caractérisés par une activité MPF élevée. Elle a été retrouvée lors de l'arrêt en métaphase I des ovocytes de mollusques telles que *Patella* (Néant et Guerrier, 1988a) et *Mytilus* (Abdelmajid et coll., 1993 ; Néant et coll., 1994), mais aussi lors de l'arrêt en métaphase II des ovocytes de souris (Hashimoto et Kishimoto, 1988 ; Kubiak et coll., 1992) et de Xénope (Gerhardt et coll., 1984 ; Murray et coll., 1989). La levée de ce deuxième blocage s'effectue lors de la fécondation.

2.2 Découverte du CSF dans les ovocytes d'amphibiens.

Les ovocytes matures de la plupart des espèces de vertébrés sont donc arrêtés en métaphase II, à un stade où les chromatides sœurs sont encore attachées au niveau des centromères. En 1971, Masui et Markert constatent que le cytoplasme d'un ovocyte bloqué en métaphase II de *Rana pipiens* contient un facteur qui, lorsqu'il est injecté dans un embryon d'amphibien au stade deux cellules, provoque un arrêt des clivages dans le blastomère injecté (Figure 9A). Les divisions se poursuivent à un rythme normal dans le blastomère non injecté. Les fuseaux métaphasiques de ces blastomères bloqués sont dépourvus d'asters alors qu'ils possèdent des centrosomes (Meyerhof et Masui, 1979). Cette activité disparaît si le cytoplasme est prélevé 45 minutes après la fécondation. Elle permet donc l'inactivation de ce facteur, qui a été baptisé facteur cytotatique (CSF). Celui-ci est responsable de l'arrêt en métaphase des œufs de vertébrés (Masui et Markert, 1971).

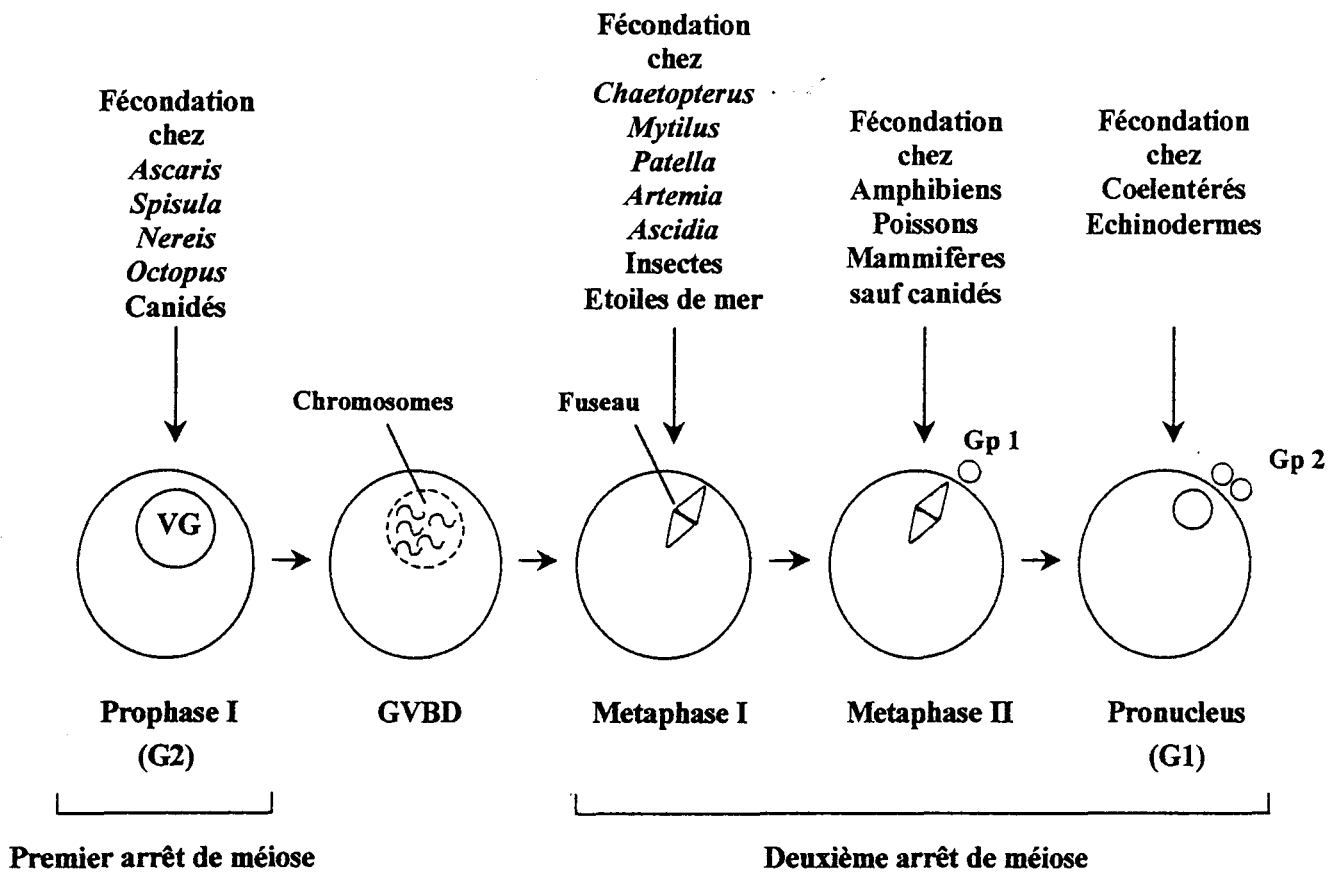


Figure 8 Différents types de méiose.

(Modifié d'après Sagata, 1996).

Deux types d'activités CSF, CSF I et CSF II, sont trouvés dans les ovocytes bloqués en métaphase II d'amphibiens (Meyerhof et Masui, 1977 ; 1979). L'injection de l'une ou de l'autre de ces activités cytotostatiques dans des blastomères d'embryons d'amphibiens au stade deux cellules provoque la formation d'un fuseau de métaphase stable et l'arrêt des clivages. Cependant, même si les effets du CSF I et du CSF II sur les blastomères sont comparables, des différences majeures existent entre ces deux activités. Le CSF I, présent dans le cytosol des ovocytes bloqués en métaphase II d'amphibiens, est sensible au calcium : l'injection conjointe de calcium et de cytosol d'ovocytes bloqués en métaphase II ne provoque pas l'arrêt des clivages dans les blastomères injectés (Meyerhof et Masui, 1977). La présence de calcium (100 μM à 1 mM) dans des extraits réalisés à partir d'ovocytes bloqués en métaphase II d'amphibiens entraîne la perte de l'activité cytotatique de ces extraits. L'EGTA, chélateur des ions calcium, stabilise le CSF I (Meyerhof et Masui, 1977 ; 1979). Ce facteur cytotatique est instable : son activité disparaît après 48 heures de stockage à 2°C. Son activité, dépendante des ions Mg^{2+} , est stabilisée par la présence d'inhibiteurs de phosphatases comme le β -glycérophosphate ou le NaF (Fluorure de Sodium), et par la présence d'ATP (Shibuya et Masui, 1988 ; Moses et Masui, 1990). Si l'inhibition de protéines-phosphatases est importante pour le maintien de cette activité cytotatique, le CSF I dépend donc d'une ou plusieurs phosphoprotéines, actives lorsqu'elles sont phosphorylées (Shibuya et Masui, 1989).

Une autre activité cytotatique apparaît dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope après plusieurs jours de stockage à 2°C et l'addition de calcium. Au contraire du CSF I, le CSF II est insensible au calcium puisqu'il reste stable en présence de fortes concentrations de calcium (Masui, 1974 ; Meyerhof et Masui, 1977). Cette deuxième activité cytotatique concernerait des protéines plus petites que celles impliquées dans le CSF I, mais leur identité n'est pas connue (Shibuya et Masui, 1989).

2.3 Activité CSF dans les autres modèles animaux.

2.3.1 Arrêt en métaphase II des ovocytes de souris.

Une activité similaire a ensuite été démontrée dans les ovocytes matures de souris, suggérant l'universalité du mécanisme chez les vertébrés (Balakier et Czolowska, 1977). Dans les ovocytes de souris bloqués en métaphase, l'existence du CSF a notamment été prouvée par des expériences de fusion entre un blastomère d'embryon au stade deux cellules et des

fragments d'ovocytes préparés après la GVBD et mis en culture jusque l'arrêt en métaphase II (Balakier et Masui, 1986 ; Kubiak et coll., 1993).

Une différence majeure existe entre l'arrêt en métaphase II des ovocytes de souris et l'arrêt en métaphase II des ovocytes d'amphibien. En effet, chez la souris, la synthèse protéique doit être continue et sa brève inhibition suffit à lever le blocage métaphasique (Siracusa et coll., 1978 ; Clarke et Masui, 1983 ; Clarke et Masui, 1985 ; Clarke et coll., 1988 ; Verlhac et coll., 1993). Ce n'est pas le cas des ovocytes d'amphibien où la cycline B est stable durant l'arrêt en métaphase II (Van der Welden et Lohka, 1993). Le maintien d'un taux élevé de MPF actif dans les ovocytes de souris serait sous la dépendance d'un équilibre entre la synthèse de la cycline B et sa dégradation (Kubiak et coll., 1993 ; Verlhac et coll., 1993).

2.3.2 Arrêt en métaphase I des ovocytes d'invertébrés.

Bien qu'aucune expérience n'ait été faite afin d'affirmer l'existence d'une activité CSF dans les ovocytes d'invertébrés, il faut remarquer que ceux-ci subissent un deuxième arrêt lors de la méiose. Cet arrêt en métaphase I est clairement dépendant de la synthèse protéique. Cette caractéristique est retrouvée dans les ovocytes du crustacé *Artemia* (Fautrez et Fautrez-Firlefyn, 1961), de l'annélide *Chaetopterus* (Zampetti-Bosseler et coll., 1973), des mollusques *Patella* (Néant et Guerrier, 1988a ; Colas et coll., 1993a), *Mytilus* et *Ruditapes* (Dubé et Dufresne, 1990 ; Abdelmajid et coll., 1993 ; Néant et coll., 1994), et de l'ascidie *Phallusia* (Abdelmajid et coll., 1993).

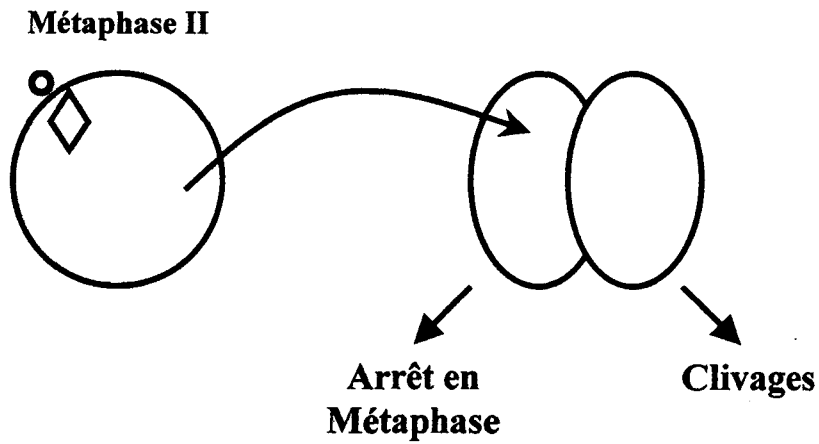
2.4 Protéines-kinases impliquées dans l'activité cytotatique.

La purification du facteur responsable de l'activité CSF est rendue difficile par son instabilité (Shibuya et Masui, 1988) et son identité n'a toujours pas été précisée. Cependant, plusieurs protéines-kinases ont pu être impliquées dans l'activité cytotatique chez le Xénope et chez la souris.

2.4.1 *c-mos*

La protéine codée par le proto-oncogène *c-mos* semble la principale protéine-kinase impliquée dans l'activité cytotatique. Injectée dans des embryons d'amphibien au stade deux

A.



B.

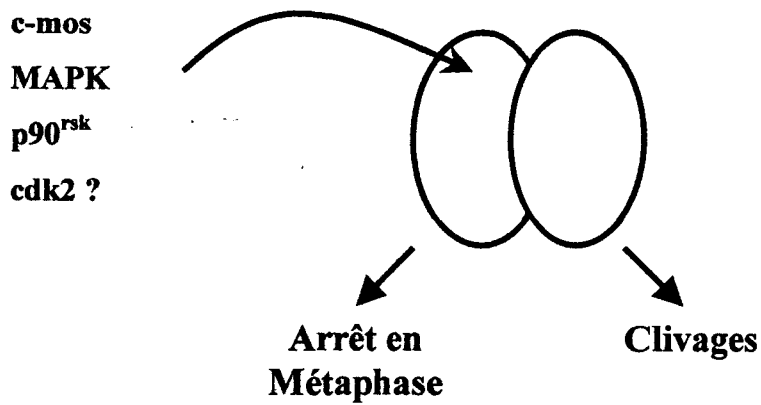


Figure 9. L'activité cytotatique (CSF).

A. Microinjection de cytoplasme d'un ovocyte bloqué en métaphase II dans un des deux blastomères d'un embryon d'amphibien au stade 2 cellules. B. Expérience similaire réalisée avec des protéines purifiées suggérant leur implication dans l'activité cytotatique.

cellules, elle provoque l'arrêt en métaphase du blastomère injecté (figure 9B). De plus, des extraits cytoplasmiques d'ovocytes matures dépourvus de c-mos perdent leur capacité à arrêter la mitose (Sagata et al., 1989).

Les ovocytes matures de mammifères expriment également la protéine c-mos (Paules et coll. 1989), qui est dégradée après la fécondation (Watanabe et coll., 1989 ; Wu et coll., 1997). Ils possèdent une activité cytotatique (Balakier et Czolowska, 1977 ; Kubiak et coll., 1993). L'injection d'oligonucléotides antisens de c-mos empêche l'arrêt en métaphase et provoque la décondensation des chromosomes ainsi que la reformation d'une enveloppe nucléaire (O'Keefe et coll., 1989). L'injection d'anticorps dirigés contre c-mos dans des zygotes de souris empêche le premier clivage et maintient les zygotes arrêtés au stade pronucleus (Zhao et coll., 1991). En outre, les ovocytes de souris, présentant des délétions homozygotes pour c-mos, ne s'arrêtent pas en métaphase et subissent une activation parthénogénétique (Colledge et al., 1994 ; Hashimoto et al., 1994 ; Araki et coll., 1996).

La stabilisation de l'activité MPF par le CSF/c-mos est probablement le premier mécanisme décrit de l'arrêt en métaphase II chez les vertébrés. Dans les ovocytes matures, la dégradation de la cycline B est fortement inhibée (Murray et coll., 1989). Dans les embryons injectés avec des ARNm de c-mos, l'absence de dégradation des cyclines est également observée et l'activité MPF est maintenue à un taux élevé (Sagata et coll., 1989). c-mos pourrait provoquer l'arrêt métaphasique en maintenant l'activité MPF par inhibition de la dégradation des cyclines. Il phosphoryle *in vitro* la cycline B2 (Roy et coll., 1990). Cependant, l'expression ectopique de c-mos dans les ovocytes immatures n'induit pas la phosphorylation de la cycline B2 (Xu et coll., 1992). Par conséquent, la stabilisation des cyclines B par c-mos n'est pas directe.

Des travaux récents montrent que c-mos joue un rôle dans la régulation de l'activité des kinétochores en méiose II. Les mouvements des chromosomes sont contrôlés par les mécanismes de polymérisation-dépolymérisation des microtubules et par les protéines motrices associées aux microtubules. Les kinétochores sont des structures spécialisées, localisées au niveau des centromères des chromosomes. Ils constituent les sites d'attachement des chromosomes aux microtubules et seraient associés à une ou plusieurs protéines motrices. Une protéine apparentée aux kinésines, la CENP-E (Centrosomal associated protein E) qui est associée aux kinétochores, pourrait jouer un rôle dans l'arrêt en métaphase. Certains épitopes de cette protéine sont modifiés de manière dépendante de c-mos lors de l'arrêt en métaphase II (Duesbery et coll., 1997). Les modifications de la CENP-E inhiberaient la transition métaphase-anaphase. Toutefois, l'activité de c-mos n'est pas suffisante pour masquer des sites

de la CENP-E, puisque la surexpression de c-mos dans les cellules transformées n'arrête pas les cellules en métaphase (Fukasawa et Vande Woude, 1995). Cela n'affecte pas non plus la détection de la CENP-E (Duesbery et coll., 1997). L'arrêt en métaphase serait donc dû à l'expression spécifique d'une autre protéine, parallèlement à l'activité de c-mos.

La protéine c-mos pourrait donc agir selon deux voies complémentaires pour maintenir l'arrêt en métaphase : un contrôle négatif de la dégradation des cyclines B et une régulation des kinétochores.

2.4.2 MAPK

L'arrêt en métaphase provoqué par l'injection de c-mos résulterait de l'activation de la voie MAPK. L'injection de MAPK thiophosphorylée dans des blastomères provoque un arrêt des clivages (Haccard et al., 1993). Un résultat similaire a été obtenu en injectant l'ARNm codant une forme constitutivement active de MEK1 (MAPKK) (Sagata, 1995). Inversement, lorsque c-Mos est co-injecté avec un anticorps neutralisant anti-MEK1 (Kosako et coll., 1994), ou l'ARNm codant la phosphatase CL100 (Sagata, 1997), les blastomères injectés ne subissent aucun arrêt en métaphase mais se divisent normalement. La CL100 est une protéine-phosphatase qui a été identifiée dans les fibroblastes et qui est capable de déphosphoryler les MAPK Erk1 et Erk2. Cette protéine-phosphatase est capable de bloquer l'activation des MAPK, dépendante de la voie Ras, dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope (Alessi et coll., 1993). L'expression ectopique de CL100, tronquée dans sa partie carboxy-terminale, provoque l'inactivation prématurée de MAPK, la dégradation de la cycline B et la sortie de phase M (Minshull et al., 1994). Ces résultats indiquent que MAPK est impliquée dans l'activité cytotatique de c-mos. MAPK a été impliquée dans l'inhibition de l'activation de la voie de dégradation des cyclines B lors de la transition métaphase-anaphase (Abrieu et coll., 1996).

MAPK serait aussi responsable de l'arrêt au stade pronucleus dans les ovocytes d'étoile de mer, ce qui suggère un rôle prépondérant de MAPK dans le second arrêt méiotique chez de nombreuses espèces. Les ovocytes de certaines espèces d'étoile de mer sont arrêtées en phase G1 (*Asterina pectenifera*, *Asterina miniata*), et d'autres en phase G2 (*Marthasterias glacialis*, *Astropecten aranciis*). Ces deux arrêts se caractérisent par une activité élevée de MAPK, dépendante d'une synthèse protéique continue. La diminution de l'activité MAPK entraîne, en l'absence de fécondation, l'entrée en phase S ou en phase M (condensation des

chromosomes et rupture de l'enveloppe nucléaire) selon les espèces. Par contre, le maintien de l'activité MAPK empêche la progression en phase S ou en phase M induite par la fécondation (Picard et coll., 1996 ; Abrieu et coll., 1997 ; Tachibana et coll., 1997).

L'implication de MAPK dans le second arrêt méiotique des ovocytes montre la grande flexibilité de la voie MAPK et sa capacité à intégrer des signaux en amont et à créer des réponses différentes en fonction de ces signaux. Quatre rôles peuvent être envisagés dans les ovocytes : MAPK est essentielle pour l'activité de cdc2. Elle joue un rôle dans la répression de la phase S entre les deux divisions de méiose. MAPK participe à l'activité cytotatique du CSF en maintenant actif le MPF. Enfin, l'activation de MAPK cause un arrêt en phase G2, par phosphorylation de cdc2 (Abrieu et coll., 1997 ; Walter et coll., 1997 ; Bitangcol et coll., 1998). MAPK activerait Wee1, induisant la rephosphorylation de p34^{cdc2} (Walters et coll., 2000). MAPK joue donc un rôle en opposition avec cdc2 dans les premiers cycles mitotiques.

L'implication de p90^{rsk} dans l'arrêt en métaphase des ovocytes bloqués en métaphase II d'amphibien a été récemment rapportée. En effet, l'injection de p90^{rsk} constitutivement active dans des embryons d'amphibiens au stade deux cellules stoppe la division du blastomère injecté (Gross et coll., 1999). De même, l'immunodéplétion de p90^{rsk} dans les extraits CSF d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope empêche l'arrêt en mitose (Bhatt et Ferrell, 1999).

2.4.3 *cdk 2*.

L'injection d'oligonucléotides antisens de *cdk2* inhibe la synthèse de *cdk2* lors de la maturation et empêche l'arrêt en métaphase II des ovocytes de Xénope (Gabrielli et coll., 1993). Ces résultats suggéraient que le couple *cdk2*/cycline E était requis en plus de *c-mos* dans l'arrêt en métaphase (Gabrielli et coll., 1993 ; Rempel et coll., 1995). L'implication de *cdk2* dans l'arrêt en métaphase est controversée : en effet, l'utilisation de p21^{cip1}, un inhibiteur de *cdk2*, n'empêche pas l'arrêt en métaphase II (Furuno et coll., 1997).

3 Sortie de phase M : transition métaphase-anaphase.

3.1 Evénements de la transition métaphase-anaphase.

Si les événements du début de la phase M comme la condensation des chromosomes et la formation du fuseau dépendent de l'activation du MPF et de la voie MAPK, les événements de la sortie de phase M comme la séparation des chromatides sœurs requièrent l'activation de mécanismes de protéolyse dépendant de l'ubiquitine. En effet, la protéolyse de certaines protéines, catalysée par leur ubiquitination, joue un rôle critique dans la régulation du cycle cellulaire, engageant sa progression de manière irréversible (Murray et coll., 1989 ; Peters, 1998 ; Koepp, 1999). L'ubiquitination de ces protéines nécessite l'activation séquentielle de trois enzymes : l'ubiquitine est initialement activée par une E1 (Ubiquitin activating Enzyme E1) puis elle est transférée sur un membre de la famille des enzymes se conjuguant à l'ubiquitine (Ubiquitin-conjugating enzyme E2). Finalement, une ubiquitine-ligase (E3) permet la reconnaissance du substrat et l'ubiquitination de la protéine cible (Townsend et Ruderman, 1998). Les protéines ainsi ubiquitinées sont reconnues et dégradées par le complexe 26S protéasome (Peters, 1994 ; Cux et coll., 1996) (Figure 10).

3.2 Anaphase Promoting Complex.

3.2.1 Identité.

Dans les ovocytes bloqués en métaphase de Xénope et de la palourde *Spisula*, un complexe 20S de plusieurs sous-unités est responsable de l'activité ubiquitine-ligase lors de la transition métaphase-anaphase. Ce complexe a été baptisé Anaphase Promoting Complex (APC) ou cyclosome. Il tire son nom du fait que son activité est nécessaire à la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase (Irniger et coll., 1995 ; King et coll., 1995 ; Tugendreich et coll., 1995). Plusieurs gènes codant des sous-unités de l'APC (APC1, APC2/cdc16, APC8/cdc23, APC10/DOC1 et cdc26) ont été originellement découverts chez *Saccharomyces cerevisiae* grâce à l'isolement de mutants chez lesquels la dégradation de la cycline Clb2 est inhibée (Irniger et coll., 1995 ; Zachariae et Nasmyth, 1996 ; Hwang et coll., 1997). Les produits des gènes cdc16 et cdc23 s'associent en complexe avec le produit du gène cdc27 (Lamb et coll., 1994) et les trois gènes sont requis pour la transition métaphase-anaphase

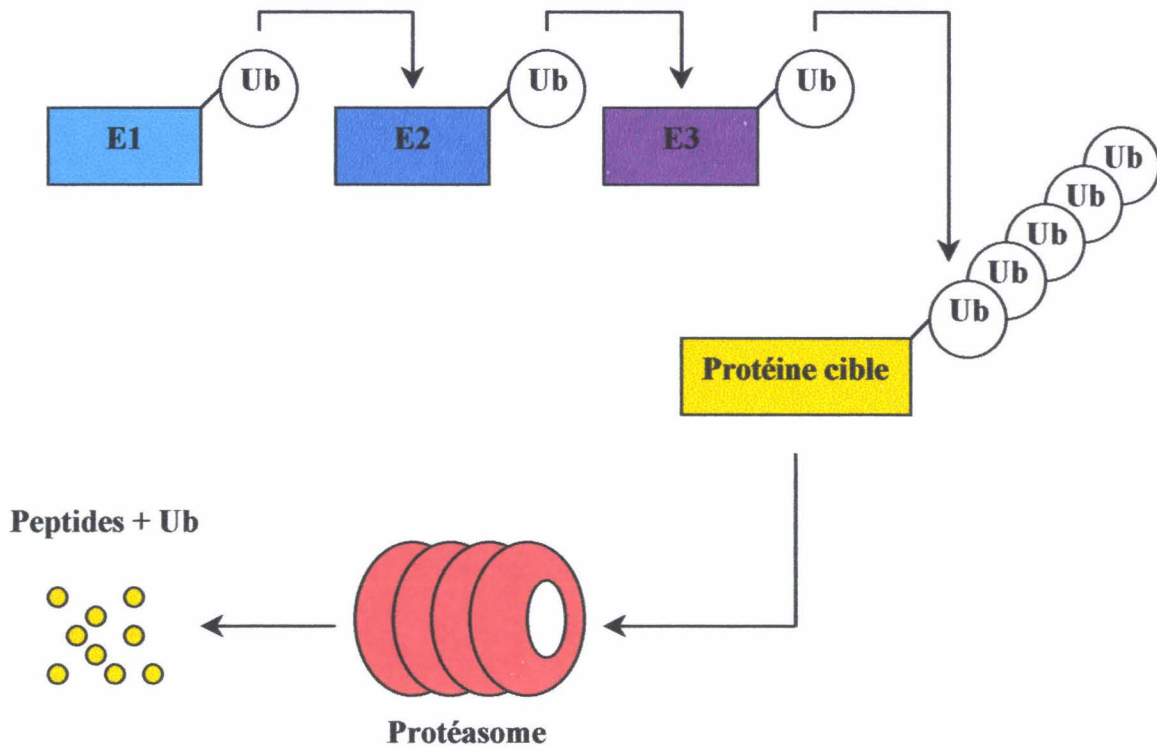


Figure 10. Protéolyse dépendante de la voie ubiquitine.

E1 : ubiquitin-activating enzyme, E2 : ubiquitin-conjugating enzyme, E3 : ubiquitin ligase,
 Ub : ubiquitine (modifié d'après Townsley et Ruderman, 1998).

(Pringle et Hartwell, 1981). Des protéines homologues de cdc16 et de cdc27 ont été identifiées comme des constituants de l'APC chez le Xénope (King et coll., 1995). Huit sous-unités ont été identifiées chez le Xénope (King et coll., 1995 ; Peters et coll., 1996), douze chez *Saccharomyces cerevisiae* et huit chez les mammifères (Townsend et Ruderman, 1998 ; Peters, 1999).

3.2.2 Régulation.

Les activités des enzymes E1 et E2 ne varient pas au cours du cycle cellulaire (Peters et coll., 1998). Par contre, l'activité de l'APC est faible dans les extraits interphasiques et élevée dans les extraits mitotiques (King et coll., 1995 ; Sudakin et coll., 1995). L'APC est donc l'objet d'une régulation au cours du cycle cellulaire.

Son activité serait régulée par phosphorylation/déphosphorylation. En effet, le MPF est capable d'activer l'APC en le phosphorylant de manière réversible (Hershko et coll., 1994 ; Lahav-Baratz et coll., 1995 ; Sudakin et coll., 1995). Cette phosphorylation est en outre dépendante de Xe-p9 (Shteinberg et Hershko, 1999 ; Shteinberg et coll., 1999). Une polokinase, homologue de la protéine cdc5 de *Saccharomyces cerevisiae* est capable de phosphoryler trois des sous-unités de l'APC : APC1, APC3 et APC6 (Charles et coll., 1998 ; Descombes et Nigg, 1998 ; Kotani et coll., 1998 ; Shirayama et coll., 1998). Il a été également démontré que les sous-unités APC1 et APC3 peuvent être phosphorylées par la PKA, mais dans ce cas, la PKA supprime l'activité de l'APC (Ishii et coll., 1996 ; Kotani et coll., 1998). L'activité de protéines-phosphatases est en outre requise pour l'activation de l'APC à la transition métaphase-anaphase (Ishii et coll., 1996 ; Vorlaufer et Peters, 1998 ; Brassac et coll., 2000).

Par ailleurs, des études récentes ont révélé que l'APC est activé de manière spécifique par deux familles de protéines : Cdc20/p55^{cdc}/fizzy et Cdh1/Hct1/fizzy-related (Visintin et coll., 1997 ; Schwab et coll., 1997 ; Sigrist et Lehner, 1997 ; Fang et coll., 1998a ; 1998b ; Kramer et coll., 1998 ; Lorca et coll., 1998 ; Zachariae et coll., 1998). Ces protéines sont régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. En effet, Cdc20 ne pourrait activer l'APC que lorsqu'il est phosphorylé par le MPF (Kotani et coll., 1999) et Cdh1 est inactivé lorsqu'il est déphosphorylé par la phosphatase cdc14 (Visintin et coll., 1998).

3.3 Cibles de l'APC.

L'APC permet la sortie de phase M en inactivant le MPF à travers la dégradation de la cycline B. Celle-ci est dégradée au moment de la séparation des chromatides sœurs (Murray et coll., 1989). Cette dégradation est permise par la présence d'une séquence particulière, la "destruction-box". En effet, la délétion de cette séquence empêche la dégradation de la cycline. La présence de formes non dégradables de cycline B empêche la sortie de phase M dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, suggérant que l'inactivation du MPF déclenche la séparation des chromosomes (Murray et coll., 1989). En fait, de tels extraits subissent un blocage en télophase et non pas en métaphase (Holloway et coll., 1993 ; Surana et coll., 1993). Cependant de fortes concentrations de la séquence "destruction-box" de la cycline B inhibe la ségrégation des chromosomes. Ces fragments étant capables d'agir comme des inhibiteurs compétitifs des mécanismes de protéolyse dépendants de l'APC, il a été supposé que d'autres protéines, impliquées dans la ségrégation des chromosomes, sont dégradées par l'APC lors de la sortie de phase M (Holloway et coll., 1993).

Chez les levures bourgeonnantes, la protéolyse de Pds1 induite par l'APC semble déclencher la transition métaphase-anaphase (Cohen-Fix et coll., 1996 ; Yamamoto et coll., 1996). Cette protéine Pds1 contient une séquence proche de la "destruction-box" des cyclines mitotiques. La mutation de cette séquence empêche la dégradation de Pds1 et l'expression de cette forme non dégradable entraîne un arrêt en métaphase dans les cellules traitées. En outre, la délétion du gène Pds1 permet la transition métaphase-anaphase dans les mutants APC. Ces résultats montrent que Pds1 inhibe la transition métaphase-anaphase. La protéine Cut2 possède une fonction similaire chez les levures fissipares (Funabiki et coll., 1996a). Cut2 est dégradée lors de la sortie de phase M. Cette dégradation dépend de l'APC et de la présence d'une séquence "destruction-box" (Funabiki et coll., 1996a). La manière dont Pds1 et Cut2 inhibent la transition métaphase-anaphase n'est pas clairement élucidée. Cependant, Pds1 et Cut2 sont capables d'interagir avec Esp1 et Cut1 respectivement (Funabiki et coll., 1996b ; Ciosk et coll., 1998 ; Kumada et coll., 1998). Des études génétiques menées chez *Schizosaccharomyces pombe* ont suggéré que Pds1 est un inhibiteur de Esp1 (Ciosk et coll., 1998). Esp1 ne pourrait déclencher la séparation des chromatides qu'après la dégradation de Pds1 par l'APC. Des protéines homologues de Pds1 ont été identifiées chez le Xénope et chez l'homme (Peters, 1999).

La protéine Cdc20 est aussi un substrat de l'APC (Prinz et coll., 1998 ; Shirayama et coll., 1998), et les protéines Cdc5/Pik1, ARK2 et NIMA sont également dégradées lors de la

transition métaphase-anaphase (Charles et coll., 1998 ; Shirayama et coll., 1998 ; Ye et coll., 1998). Deux autres protéines, qui jouent un rôle dans la régulation du fuseau mitotique, ont été identifiées comme des substrats de l'APC : Ase1p, protéine associée aux microtubules et Kip1 (kinesin motor protein 1) (Gordon et Roof, 1997 ; Juang et coll., 1997). Enfin, chez le Xénope, la dégradation de la géminine semble requise pour que la réplication de l'ADN ait lieu au cycle cellulaire suivant (McGarry et Kirschner, 1998).

3.4 Le point de contrôle d'assemblage du fuseau ("spindle checkpoint").

Le point de contrôle d'assemblage du fuseau est le mécanisme qui inhibe la sortie de phase M jusqu'à la formation d'un fuseau bipolaire et jusqu'à ce que les chromosomes soient attachés au fuseau (Wells, 1996). En effet, des agents capables de détruire le fuseau en dépolymérisant les microtubules, tels que le nocodazole ou le bénomyl, bloquent la progression du cycle cellulaire. Plusieurs gènes impliqués dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau ont été identifiés chez les levures : Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, Bub2, Bub3, Pds1 et Hps1 (Li et Murray, 1991 ; Weiss et Winey, 1996 ; Yamamoto et coll., 1996). Des protéines homologues ont été découvertes chez les vertébrés, et il a été déterminé que les protéines Mad2, Bub1 et Bub3 s'associent aux kinétochores avant l'alignement des chromosomes à la métaphase (Chen et coll., 1996 ; Li et Benezra, 1996 ; Taylor et MsKeon, 1997 ; Taylor et coll., 1998). En outre, ces protéines ne sont plus détectées au niveau des kinétochores après l'attachement complet des chromosomes au fuseau de métaphase.

Par ailleurs, le point de contrôle d'assemblage du fuseau régule l'activité de l'APC en inactivant Cdc20 et Hct1 (figure 11). Les protéines Mad2 et Mad3 se lient à Cdc20 et la délétion de Mad2 permet la sortie de phase M des mutants Cdc20 (Hwang et coll., 1998). Mad2 inhiberait l'activité de Cdc20 en s'associant avec elle (Li et coll., 1997 ; Fang et coll., 1998b ; Gorbsky et coll., 1998 ; Kallio et coll., 1998 ; Kim et coll., 1998). Ainsi, les protéines Mad1, Mad2, Mad3 et Bub 1, Bub3 suppriment l'activation de l'APC induite par cdc20 mais Bub2 régulerait négativement celle induite par Cdh1 (Alexandru et coll., 1999 ; Fesquet et coll., 1999 ; Fraschini et coll., 1999). Bub2 inhibe l'activation de la protéine phosphatase cdc14 (Alexandru et coll., 1999 ; Shou et coll., 1999 ; Visintin et coll., 1999) dont l'activité est nécessaire pour permettre l'activation de

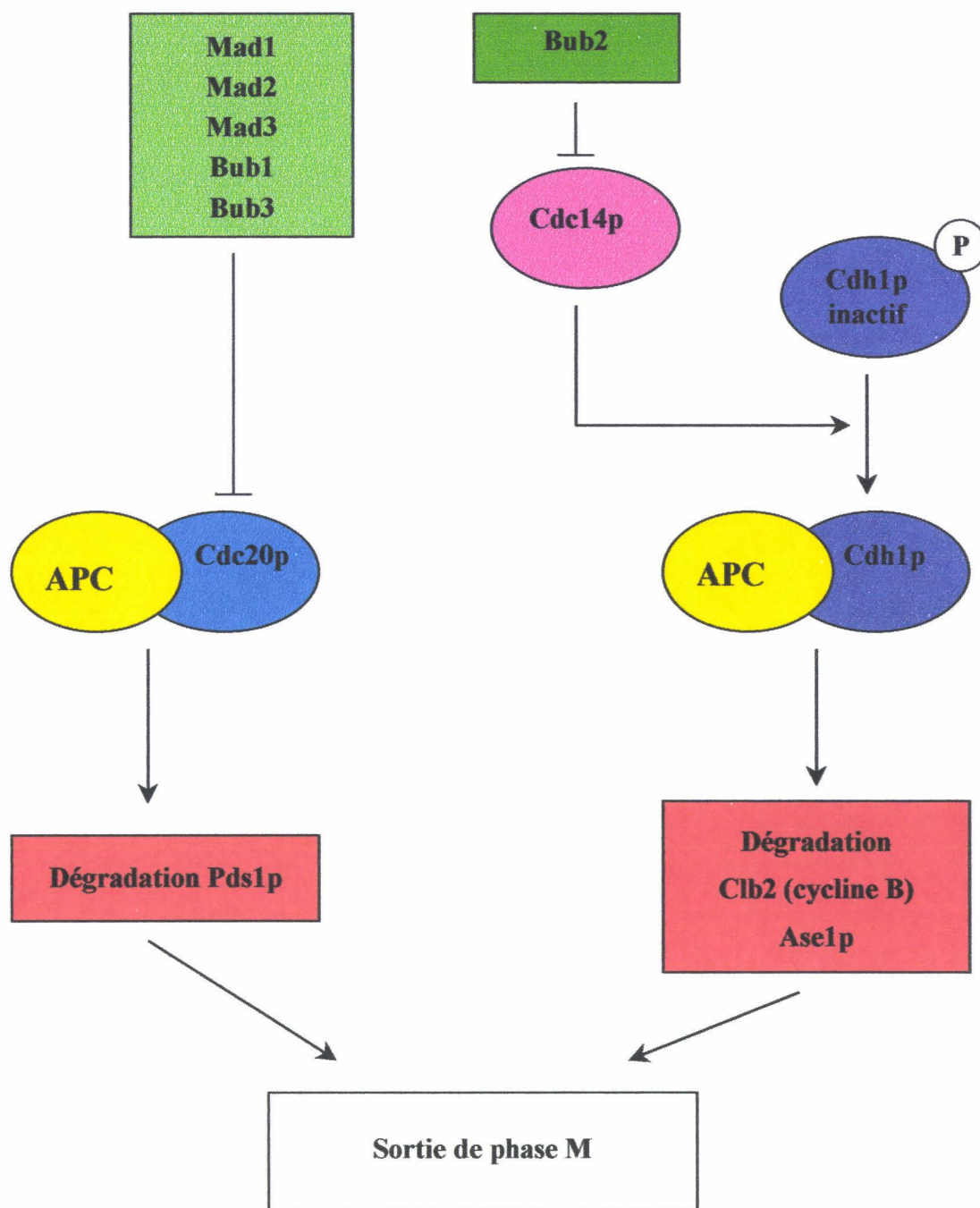


Figure 11 : Régulation de l'APC par le "spindle assembly checkpoint".
 (Chez *Saccharomyces cerevisiae*, modifié d'après Alexandru et coll., 1999)

Cdh1, qui doit être déphosphorylée pour être active (Visintin et coll., 1998).

On peut se demander si l'arrêt en métaphase impliquant le CSF est un mécanisme proche de celui du point de contrôle du fuseau. Cependant, même si les deux mécanismes semblent agir en inhibant l'APC, ils sont distincts dans la mesure où Mad2 ne semble pas impliquée dans l'arrêt en métaphase II des ovocytes de Xénope (Chen et coll., 1996).

4 Levée du blocage métaphasique.

4.1 Ovocyte d'amphibien

4.1.1 Modifications morphologiques.

L'union d'un ovocyte bloqué en métaphase II et du spermatozoïde déclenche l'activation de l'ovocyte, qui comprend une série de mécanismes complexes tels que le blocage membranaire à la polyspermie (chez les anoures mais pas chez les urodèles), la stimulation du métabolisme et la fin de la méiose.

Chez les anoures, cette activation se manifeste par deux changements morphologiques importants : l'exocytose des granules corticaux (GC) et la contraction corticale (figure 12). L'exocytose des granules corticaux débute au point d'impact du spermatozoïde et se propage autour de l'œuf (Grey et coll., 1974). La libération du contenu des granules corticaux dans l'espace périvitellin modifie les propriétés physico-chimiques de la membrane. Elle aboutit à la formation d'une membrane de fécondation, barrière imperméable aux spermatozoïdes, qui entoure l'œuf et constitue un blocage physique à la polyspermie (Wolf, 1974 ; Grey et coll., 1976). La contraction corticale suit l'exocytose des granules corticaux et se traduit par la migration des pigments vers le pôle animal de l'œuf. Cette contraction corticale pourrait faciliter l'amphimixie en rapprochant le pronucleus mâle du pronucleus femelle (Elinson, 1977). En effet, l'activation de l'ovocyte provoque la décondensation des chromosomes, la disparition du fuseau, la formation du pronucleus femelle et l'extrusion du second globule polaire (Figure 12). D'autres modifications existent comme l'augmentation des microvillosités (Charbonneau et Picheral, 1983).

4.1.2 Modifications ioniques.

Les modifications morphologiques sont précédées de modifications ioniques. L'événement majeur de la fécondation est sans conteste l'augmentation de la concentration intraovocytaire de calcium. Chez le Xénope, elle débute au point d'impact du spermatozoïde et se propage sous la forme d'une vague calcique qui est immédiatement suivie par l'exocytose des granules corticaux (Grey et coll., 1974 ; 1976). L'augmentation de calcium induite par la fécondation se produit dans de nombreuses espèces et serait le signal activateur des ovocytes bloqués en métaphase II (Whitacker et Swann, 1993 ; Shen, 1995 ; Kline, 1996).

En outre, la fécondation déclenche une dépolarisation transitoire de la membrane plasmique appelée potentiel de fécondation, qui se produit au même moment que l'augmentation de calcium (Kline et Nuccitelli, 1985). Cette dépolarisation est due à un efflux d'ions chlorures et provoque un blocage immédiat à la polyspermie (Cross et Elinson, 1980). L'alcalinisation du cytoplasme constitue également un événement majeur de la fécondation (Webb et Nuccitelli, 1980) qui serait une conséquence de la vague calcique (Grandin et Charbonneau, 1992).

L'importance du signal calcique dans la levée de blocage métaphasique a été démontrée par plusieurs types d'expériences réalisées sur les ovocytes de plusieurs espèces (Kline 1992). Il est établi qu'une activation de l'ovocyte bloqué en métaphase II peut être déclenchée par une augmentation artificielle du calcium intracellulaire. Celle-ci peut être obtenue par l'ionophore calcique A23187, qui est capable de provoquer la levée de blocage métaphasique, le soulèvement de la membrane de fécondation et la contraction corticale (Steinhardt et coll., 1974 ; Bellé et coll., 1975). Dans ces conditions, aucun clivage ne peut être observé. L'ovocyte mature de Xénope, qui ne possède pas de centrosome fonctionnel, ne peut subir un développement parthénogénétique que dans le cas où un centrosome est injecté après activation (Tournier et Bornens, 1994). L'injection de calcium dans les ovocytes matures provoque leur activation (Hollinger et Schuetz, 1976).

Par ailleurs, l'injection d'un agent chélateur des ions calcium comme le BAPTA inhibe les événements caractéristiques de la fécondation. L'augmentation de la concentration de calcium et le potentiel de fécondation ne sont plus observés. En outre, ni l'exocytose des granules corticaux, ni la formation de la membrane de fécondation ne se produisent dans ces conditions (Zucker et Steinhardt, 1978 ; Hamaguchi et Hiramoto, 1981 ; Swann et Whitacker, 1986 ; Kline, 1988 ; Mohri et Hamaguchi, 1991). Le BAPTA inhibe également l'exocytose des granules corticaux et la réaction corticale habituellement induites par l'ionophore calcique (Bément et Capco, 1990). Il empêche aussi l'activation des ovocytes et l'augmentation de pH induites par piqûre (Grandin et Charbonneau, 1992).

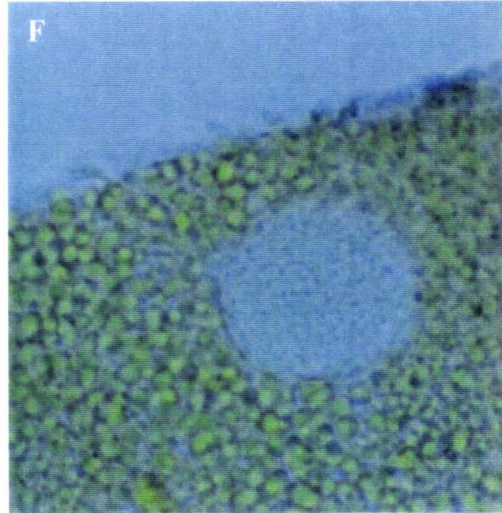
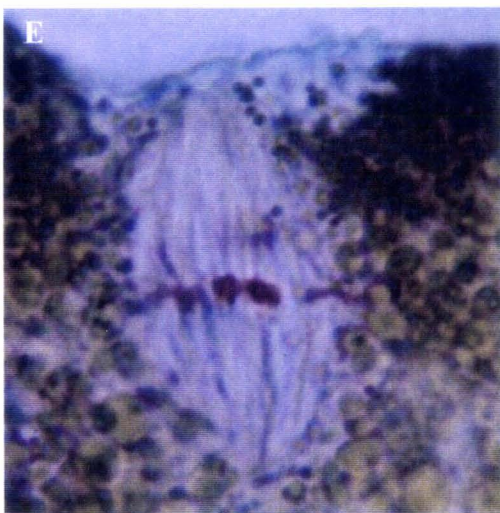
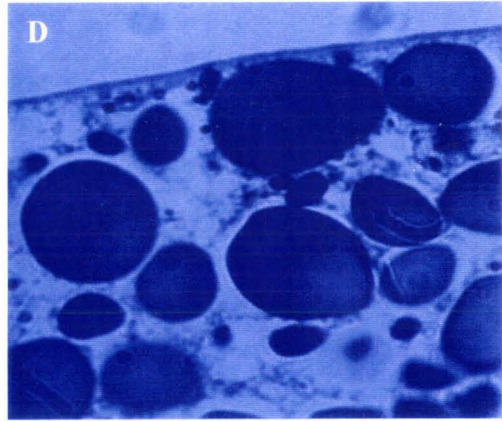
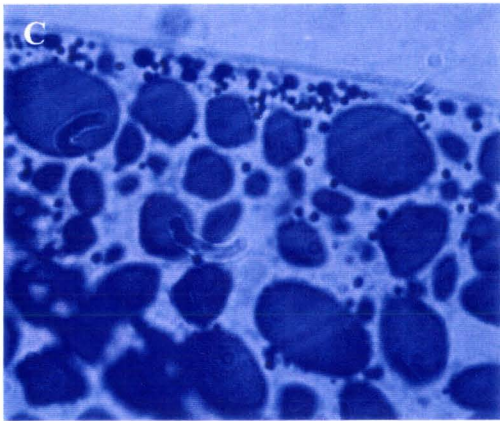
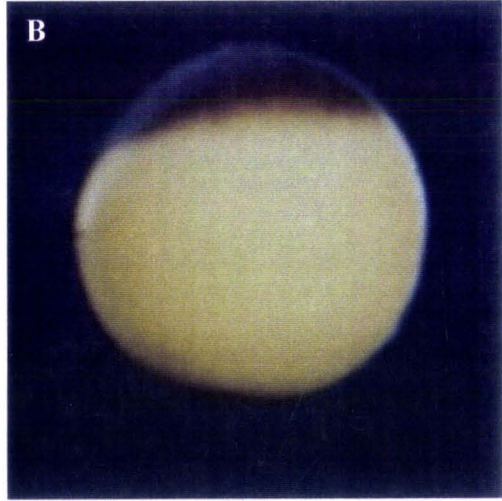
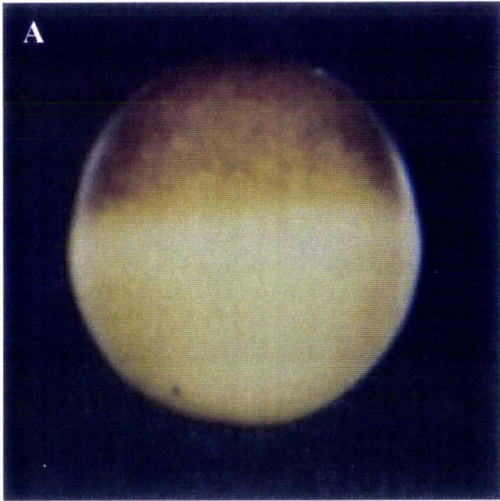


Figure 12. Activation des ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope.

- A. Ovocyte bloqué en métaphase II de Xénope (x 40).
- B. Activation d'un ovocyte bloqué en métaphase II (activation par l'ionophore calcique A23187 ; x 40). L'activation se caractérise par la réaction corticale, qui est aisément observable sous loupe binoculaire : les pigments migrent vers le pôle animal.
- C. Coupe semi-fine d'un ovocyte bloqué en métaphase II (x 1000) : les granules corticaux sont présents sous la membrane plasmique.
- D. Coupe semi-fine d'un ovocyte bloqué en métaphase II activé par l'ionophore calcique A23187 (x 1000). L'activation déclenche l'exocytose des granules corticaux. Ceux-ci ne sont plus détectés.
- E. Coupe histologique d'un ovocyte bloqué en métaphase II (x 800). Le fuseau de métaphase II est ancré dans la membrane plasmique. Il est accompagné du premier globule polaire.
- F. Coupe histologique d'un ovocyte bloqué en métaphase II activé (x 500). Le fuseau de métaphase disparaît et un pronucleus se forme.

L'augmentation de calcium observée lors de la fécondation provient des stocks intraovocytaires de calcium (Steinhardt et coll., 1974 ; Fontanilla et Nuccitelli, 1998). Il a été proposé que la vague calcique résulte d'une vague d'hydrolyse des phosphoinositides membranaires (PIP₂) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) d'une part et en diacylglycérol (DAG) d'autre part (Berridge et Irvine, 1989) (Figure 13). La microinjection de PIP₂ déclenche une augmentation de calcium dans les ovocytes de mollusques (Bloom et coll., 1988), d'échinodermes (Whitacker et Irvine, 1984 ; Picard et coll., 1985 ; Swann et Whitacker, 1986 ; Chiba et coll., 1990), d'amphibiens (Busa et coll., 1985 ; Nuccitelli et coll., 1988) et de mammifères (Cran et coll., 1988 ; Miyazaki et coll., 1989). L'injection d'anticorps anti-PIP₂ réduit fortement la vague calcique lors de la fécondation des ovocytes de Xénope (Larabell et Nuccitelli, 1992). La cible intracellulaire de l'IP₃ est un récepteur du réticulum endoplasmique. Le taux d'IP₃ augmente lors de la fécondation des ovocytes de Xénope (Stith et Maller, 1993 ; Snow et coll., 1996) et l'injection d'héparine, un inhibiteur des récepteurs de type IP₃, inhibe partiellement l'augmentation de calcium (Nuccitelli et coll., 1993 ; Fontanilla et Nuccitelli, 1998).

L'hypothèse d'une libération de calcium induite par le calcium (Calcium-Induced Calcium Release, CICR) a été également proposée (Jaffe, 1991). Cependant, aucun mécanisme indépendant de l'IP₃ n'a pu être impliqué dans la vague calcique consécutive à la fécondation chez le Xénope. Les récepteurs sensibles à la ryanodine n'ont pas été détectés dans les ovocytes d'amphibien (Parys et coll., 1992 ; Kume et coll., 1997). De plus, ni la caféine, ni la ryanodine, stimulateurs du CICR, ne provoquent l'activation des ovocytes de Xénope (Parker et Ivorra, 1991 ; Nuccitelli et coll., 1993 ; Galione et coll., 1993 ; Leichter et Clapham, 1992 ; Kobrinisky et coll., 1995).

Le mécanisme par lequel le spermatozoïde déclenche la réponse calcique est controversé et deux hypothèses majeures ont été proposées. La première hypothèse repose sur une interaction de type ligand-récepteur entre le spermatozoïde et l'ovocyte. Un tel récepteur pourrait activer des protéines G et/ou une activité tyrosine kinase associée à la membrane de l'ovocyte (Jaffe, 1990 ; Foltz et Shilling, 1993 ; Gallo et coll., 1995). L'expression des récepteurs de l'Epidermal Growth Factor (EGF) provoque une augmentation du taux de calcium dans les ovocytes de Xénope (Yim et coll., 1994). Par ailleurs, des inhibiteurs de tyrosine-kinase inhibent la fécondation des ovocytes de Xénope (Glahn et coll., 1999 ; Sato et coll., 1998 ; 1999). Les mécanismes d'activation de la phospholipase C, qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires, demeurent mal compris. La libération du

calcium n'implique cependant ni l'activation de la PLC γ par son domaine SH2, ni l'activation de la PLC β par les protéines G hétérotrimériques (Runft et coll., 1999). Plusieurs travaux réalisés sur d'autres modèles suggèrent qu'une activité tyrosine-kinase pourrait être impliquée dans la fécondation. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine-kinases inhibe fortement la libération de calcium qui se produit lors de la fécondation des ovocytes de souris (Dupont et coll., 1996). Par ailleurs, la stimulation de l'activité tyrosine-kinase dans les ovocytes bloqués en métaphase II d'oursin provoque l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Shen et coll., 1999). La protéine c-src pourrait être impliquée dans la libération de calcium induite par la fécondation dans ces ovocytes (Giusti et coll., 1999).

La deuxième hypothèse propose que le spermatozoïde contient un facteur soluble qui pénètre dans le cytoplasme de l'ovocyte et provoque l'augmentation de calcium. (Stricker, 1997). Chez les mammifères, ce facteur soluble a été identifié comme étant une phospholipase C (Parrington et coll., 1999).

La calcium-calmoduline kinase (CaMKII) est un des relais du calcium lors de la fécondation. En effet, l'addition d'une forme constitutivement active de la CaMKII à des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope induit l'inactivation du MPF et la fin de la méiose, même en l'absence de calcium, alors que l'ajout d'un inhibiteur spécifique empêche l'apparition des modifications caractéristiques de l'activation (Lorca et coll., 1993). En outre, la CaMKII participerait au soutien et à la régulation de la vague calcique (Hague et coll., 1999).

La protéine kinase C est une sérine-thréonine kinase qui est activée par le calcium, le DAG ou les esters de phorbol dans les ovocytes de Xénope (Laurent et coll., 1988 ; Sahara et coll., 1992). L'activation de la PKC par les esters de phorbol provoque la réaction corticale, l'exocytose des granules corticaux et la formation de pronucleus mais sans la diminution de l'activité MPF qui accompagne habituellement l'activation des ovocytes (Bement et Capco, 1990 ; 1991). La PKC agit donc en aval du signal calcique et son activation peut induire la majorité des événements qui accompagnent la fécondation (Bement, 1992).

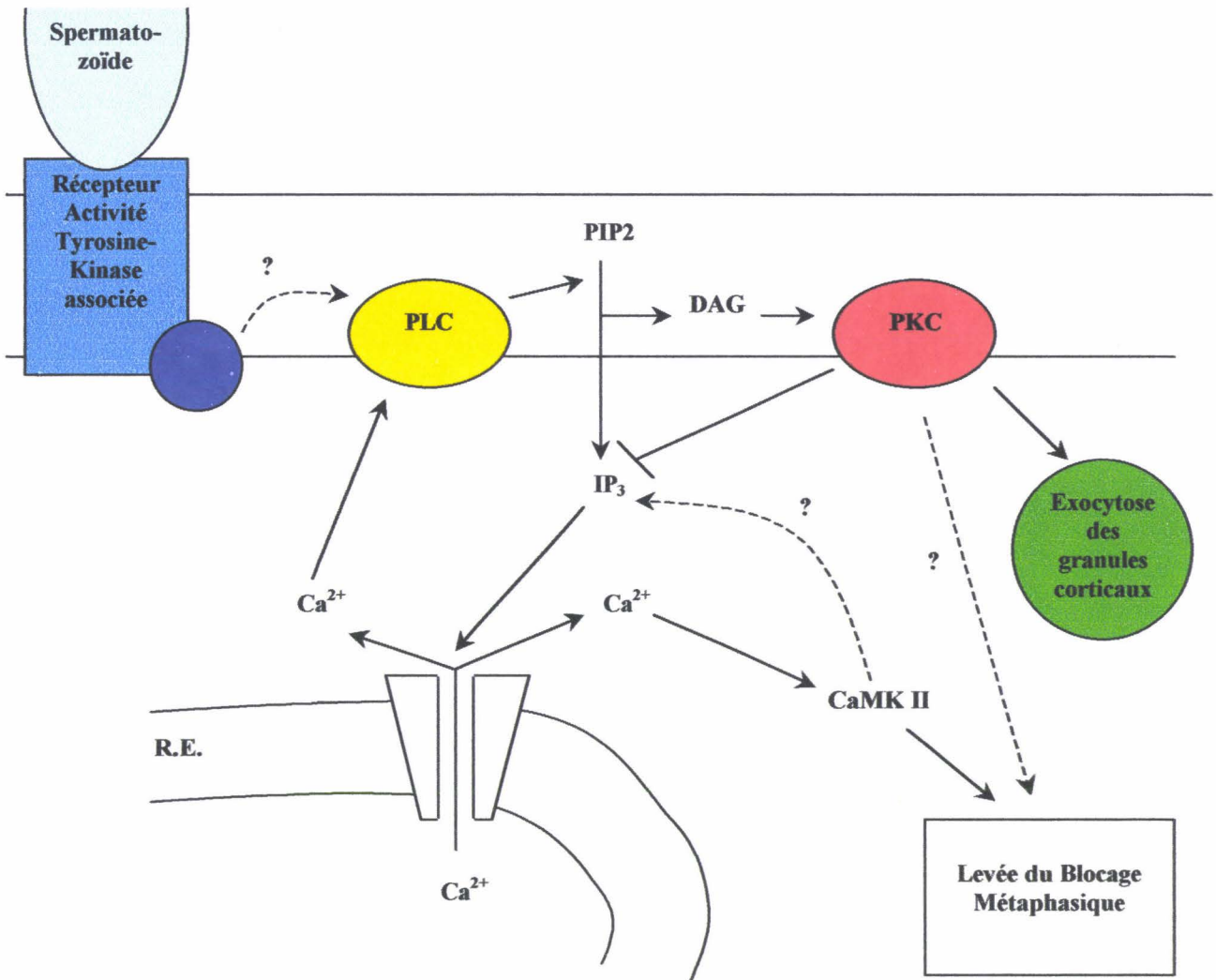


Figure 13 : Hypothèse concernant la libération du calcium lors de la fécondation
(modifié d'après Nuccitelli et coll., 1992).

4.1.3 Modifications biochimiques.

4.1.3.1 Inactivation du MPF.

La fécondation déclenche l'inactivation du MPF et du CSF (figure 14). L'inactivation du MPF précède celle du CSF (Watanabe et coll., 1991). A chaque sortie de phase M, la dégradation de la cycline est dépendante de son ubiquitination. Celle-ci est permise par l'interaction d'une ubiquitine-ligase avec une séquence consensus, la "destruction box". Ce signal de dégradation est localisé dans la partie N-terminale des cyclines A et B (Glotzer et coll., 1991 ; Hershko et coll., 1991). La délétion des 90 acides aminés N-terminaux ou les mutations de la "destruction box" d'une cycline B d'oursin empêche sa dégradation. L'introduction de la forme tronquée Δ -90 cycline B dans des extraits acellulaires d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, inhibe l'inactivation du MPF, la décondensation des chromosomes et la disparition du fuseau. Ces événements semblent donc dépendre de la protéolyse de la cycline B et de l'inactivation du MPF (Murray et coll., 1989). Des résultats similaires ont été obtenus dans des extraits acellulaires de *Spisula* (Luca et Ruderman, 1989) et dans les cultures de cellules humaines (Gallant et Nigg, 1992). En outre, l'injection de cette forme indestructible de cycline B (Δ -90) dans des ovocytes immatures de Xénope déclenche la reprise de la méiose, mais elle n'évolue pas au delà de l'anaphase I (Huchon et coll., 1993).

L'ubiquitination de la cycline B est effectuée par l'APC. Le MPF participe à l'activation de la protéolyse des cyclines (Townsend et Ruderman, 1998). Le mécanisme n'est pas clairement défini mais il implique notamment les phosphorylations de plusieurs protéines nécessaires à l'activation de l'APC par p34^{cdc2} : celle de la sous-unité cdc27 de l'APC, dépendante de Xe-p9 (Patra et Dunphy, 1998), et celle de Fizzy, requise pour l'activité APC (Lorca et coll., 1998).

La dégradation de la cycline B n'est pas le seul événement requis pour l'inactivation du MPF. En effet, après la dégradation de sa sous-unité régulatrice, la forme libre de p34^{cdc2} posséderait encore une faible activité kinasique, suggérant que la déphosphorylation de la thréonine 161 soit nécessaire à l'inactivation complète du MPF. Cette déphosphorylation serait catalysée par la protéine phosphatase 1 (PP1) (Lorca et coll., 1992).

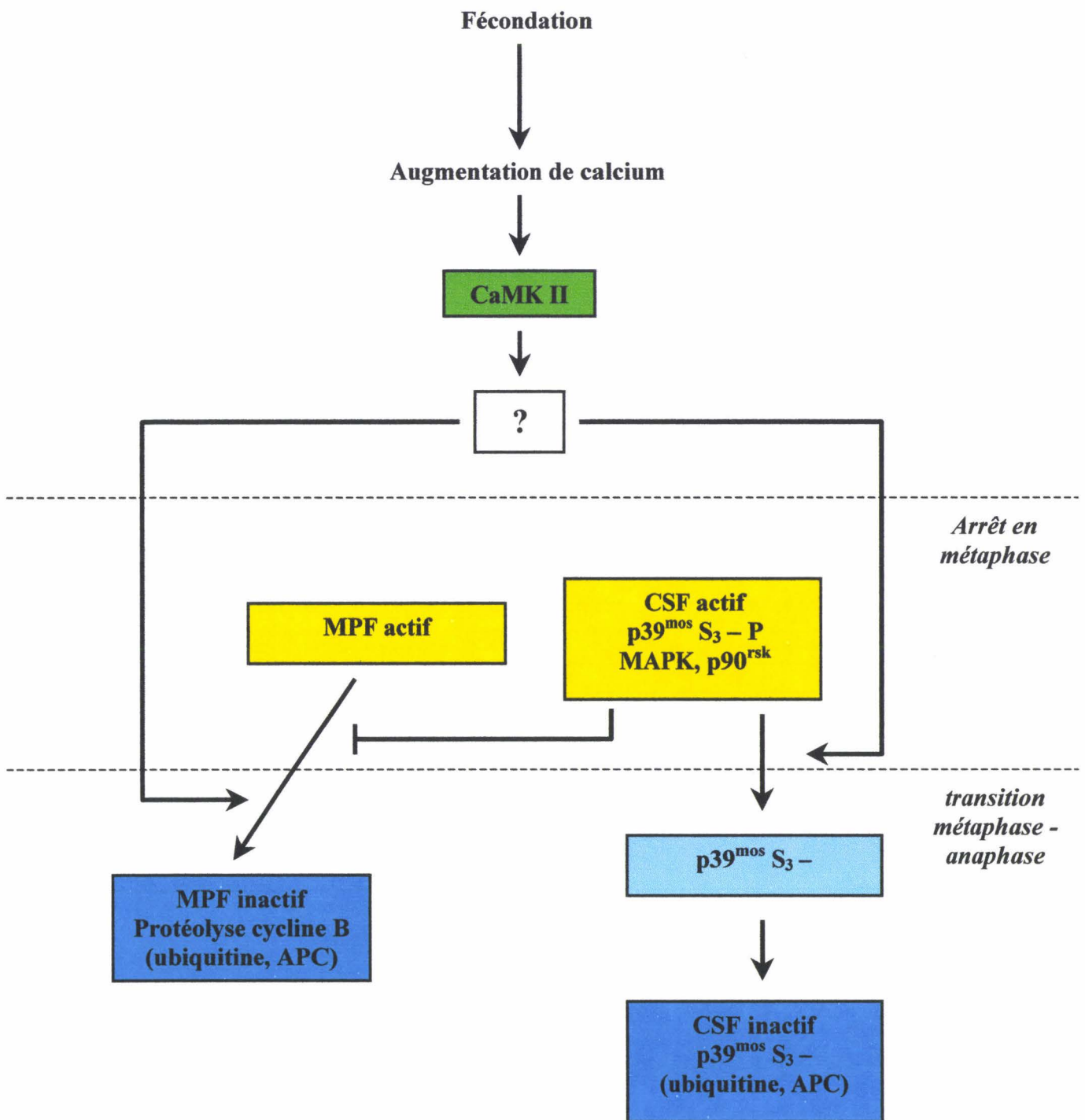


Fig. 14 Evénements biochimiques de la fécondation.

4.1.3.2 Inactivation du CSF.

4.1.3.2.1 Inactivation des MAPK.

La déphosphorylation de MAPK est l'étape clef de son inactivation (Ferrell et coll., 1991). L'activité MAPK est régulée par l'équilibre entre les MAPKK (MEK1) activatrices et les phosphatases inactivatrices. Plusieurs MAPK phosphatases ont été mises en évidence dans les ovocytes de Xénope. Une phosphatase de 47 kDa a pu être purifiée à partir de fractions cytosoliques d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope mais elle n'a pas encore été caractérisée (Sarcevic et coll., 1993). Dans les ovocytes de Xénope, la déphosphorylation de MAPK semble principalement due à la XCL100. Cette phosphatase, qui présente une forte homologie avec la CL100 de souris, est présente durant le développement précoce des embryons de Xénope. Elle est capable de déphosphoryler et d'inactiver MAPK *in vitro* (Lewis et coll., 1995). De plus, la surexpression d'une forme tronquée de la CL100 dans sa partie carboxy-terminale dans des extraits CSF de Xénope provoque la levée du blocage métaphasique (Minshull et coll., 1994).

L'inactivation des MAPK ne se produit que 30 à 40 minutes après la fécondation (Ferrell et coll., 1991 ; Hartley et coll., 1994 ; Roy et coll., 1996). La levée du blocage métaphasique se produit donc en dépit d'une activité MAPK élevée. Même si MAPK agit en inhibant l'activation de la voie de dégradation des cyclines B lors de l'arrêt en métaphase II, la CaMKII est capable de provoquer la levée du blocage métaphasique et la dégradation de la cycline B dans des extraits CSF, sans que MAPK soit inactivée (Abrieu et coll., 1996). L'inactivation de MAPK n'est donc pas requise pour la dégradation de la cycline B lors de la levée du blocage métaphasique. L'activité puis l'inactivation de MAPK interviendraient dans la régulation de la durée du premier cycle cellulaire (Walters et coll., 2000).

4.1.3.2.2. Dégradation de c-mos.

Il a été suggéré que la disparition de l'activité CSF dans les ovocytes de Xénope est due à la dégradation de c-mos par des cystéine-protéases dépendantes du calcium, les calpaïnes (Watanabe et coll., 1989). Cependant, l'implication de ce mécanisme *in vivo* est controversé. En effet, les concentrations calciques susceptibles d'activer les calpaïnes sont supérieures aux concentrations physiologiques mesurées lors de la fécondation (Lorca et coll., 1992). Il a ensuite été démontré que c-mos est dégradé dans les ovocytes de Xénope par le

protéasome 26S d'une manière dépendante du système d'ubiquitination (Ishida et coll., 1993). L'ubiquitination de c-mos est dépendante de l'état de phosphorylation de la sérine 3. En effet, la phosphorylation de la sérine 3 empêche la reconnaissance de la proline en position 2, qui est nécessaire à l'ubiquitination de la protéine et donc à sa protéolyse (Nishizawa et coll., 1993). La sérine 16 jouerait également un rôle dans la stabilité de c-mos (Pham et coll., 1999).

Il faut noter que si l'activité CSF chute avec la dégradation de c-mos, celle-ci ne serait pas nécessaire à la protéolyse de la cycline B et à la sortie de phase M. Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'activité CSF chute après la disparition de l'activité MPF consécutive à la dégradation de la cycline B dans les ovocytes de Xénope (Watanabe et coll., 1991). Des résultats similaires ont été observés lors de la fécondation des ovocytes de souris (Weber et coll., 1991).

4.2 Autres modèles d'étude de la levée de blocage métaphasique.

4.2.1 Ovocytes d'invertébrés : levée du blocage en métaphase I.

L'augmentation de calcium lève le blocage en métaphase I des ovocytes de *Patella* et de *Mytilus*. Cette augmentation implique un influx d'ions calcium et la participation des stocks intracellulaires par la voie IP₃ (Deguchi et coll., 1996 ; Colas et Dubé, 1998). Par ailleurs, de fortes concentrations de KCl sont capables de provoquer la levée du blocage en métaphase I des ovocytes de *Mytilus*. Dans ces conditions, l'activation de ces ovocytes est due à une augmentation de calcium permise par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Dufresne-Dubé et coll., 1983 ; Tomkowiak et coll., 1997).

Dans les ovocytes de *Patella* et de *Mytilus*, l'inhibition partielle de la synthèse protéique par l'émétine entraîne l'extrusion du premier globule polaire et la formation du noyau (Dubé et Dufresne, 1990 ; Colas et coll., 1993). Des protéines à durée de vie courte, comme la cycline B, sont donc nécessaires au maintien de l'arrêt en métaphase. La 6-diméthylamino purine (6-DMAP) est aussi capable d'activer les ovocytes de *Mytilus* : le noyau se forme, mais sans extrusion du globule polaire (Néant et Guerrier, 1988). L'émétine, comme la fécondation, provoque la disparition des cyclines B tandis que la 6-DMAP provoque la phosphorylation de p34^{cdc2}, inhibant l'activité H1 kinase. La dégradation des cyclines ou d'autres substrats serait nécessaire à l'extrusion du premier globule polaire tandis que la décondensation des chromosomes serait due à la disparition de l'activité kinasique du MPF (Néant et coll., 1994 ; Néant et Dubé, 1996).

La fécondation induirait une inhibition transitoire de la synthèse protéique, permettant la transition métaphase-anaphase. Comment l'augmentation de calcium provoque-t-elle la diminution de la synthèse protéique? L'implication des Calmoduline-Kinases (CaMK) est connue dans la levée du blocage métaphasique, tant dans les ovocytes de mollusques que dans les ovocytes d'amphibiens. La CaMK est capable de phosphoryler le facteur d'élongation 2 (EF-2) dans les cellules somatiques de mammifères, provoquant ainsi la diminution de la synthèse protéique (Ryazanov et Spirin, 1990). Une activité similaire a été mise en évidence dans les ovocytes de *Patella* et pourrait intervenir dans la fécondation de ces ovocytes (Abdelmajid et coll., 1993 ; Colas et Dubé, 1998).

4.2.2 Ovocyte de mammifère : levée du blocage en métaphase II.

L'augmentation de la concentration de calcium intraovocytaire est également l'étape clef de l'activation des ovocytes de mammifères. Lors de la fécondation, des oscillations calciques persistent pendant plusieurs heures (Swann et Parrington, 1999). La chélation des ions calciques par le BAPTA empêche l'exocytose des granules corticaux et la formation de pronucleus (Kline et Kline, 1992). Par ailleurs, l'application d'un ionophore calcique et l'injection intraovocytaire de calcium sont capables de provoquer la formation de pronuclei (Swann et Ozil, 1994 ; Schultz et Kopf, 1995). L'activation parthénogénétique des ovocytes de mammifères est dépendante de l'âge et des conditions de culture de ces ovocytes (Whittingham, 1980 ; Collas et coll., 1993 ; Swann et Ozil, 1994). L'activation des ovocytes de mammifères est presque impossible lorsqu'ils ont été fraîchement ovulés (Ozil et Swann, 1995). Le pourcentage d'activation croît avec l'augmentation de la durée de la culture (Nagai, 1987 ; Ware et coll., 1989 ; Yang et coll., 1991). Dans ces conditions, des clivages peuvent être observés mais les stades ultérieurs sont rarement obtenus (Aoyagi et coll., 1992). Seuls des pulses répétés de calcium peuvent activer les ovocytes de souris fraîchement ovulés, réfractaires à d'autres traitements parthénogénétiques. Ce type de traitement permet l'obtention de blastocystes (Collas et Robl, 1990 ; 1991 ; Ozil, 1990) voire de stades ultérieurs (Ozil, 1990 ; Vitullo et Ozil, 1992).

L'arrêt en métaphase des ovocytes de mammifères est également dépendant de la synthèse protéique. En effet, l'inhibition de la synthèse protéique est capable de provoquer l'activation parthénogénétique des ovocytes de souris (Siracusa et coll., 1978 ; Clarke et Masui, 1983 ; 1985 ; Clarke et coll., 1988 ; Verlhac et coll., 1993), des ovocytes de bovidés (Presicce et Yang, 1994 ; Liu et coll., 1998) et des ovocytes humains (Balakier et Casper,

1993). En effet, l'arrêt en métaphase II des ovocytes de souris dépend d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la cycline B (Kubiak et coll., 1993). D'autre part, l'arrêt en métaphase dépend de l'organisation tridimensionnelle du fuseau puisque des agents comme le nocodazole empêchent la levée du blocage métaphasique induite par le spermatozoïde (Maro et coll., 1986 ; Schatten et coll., 1985 ; 1989) ou par un ionophore calcique ou par des inhibiteurs de la synthèse protéique (Kubiak et coll., 1993 ; Moses et Kline, 1995 ; Moses et coll., 1995 ; Moses et Masui, 1994 ; 1995).

L'implication de la protéine-kinase C (PKC) dans la levée du blocage métaphasique a été aussi rapportée dans les ovocytes de mammifères, mais son rôle reste mal compris. En premier lieu, il a été démontré que les esters de phorbol, comme le PMA, induisent l'activation de la protéine-kinase C et provoquent l'exocytose des granules corticaux dans les ovocytes de souris (Ducibella et coll., 1993). Des travaux réalisés chez le hamster (Gallicano et coll., 1993) et chez la souris (Colonna et coll., 1989) ont rapporté la formation de pronuclei après activation de la PKC. Cependant, les structures formées ne seraient pas de véritables pronuclei, et l'apparition de ces structures est dépendante de la lignée de souris utilisée (Moore et coll., 1995). Le PMA provoque la formation d'une structure proche du second globule polaire, mais qui n'en possède pas toutes les caractéristiques. En outre, l'activation de la PKC ne provoque pas de diminution de l'activité H1 kinase dans les ovocytes de souris ou de hamster (Moore et coll., 1995).

Afin d'obtenir l'activation parthénogénétique des ovocytes de mammifères, l'emploi d'inhibiteurs de protéines-kinases a été également envisagé. La staurosporine, un inhibiteur peu spécifique, est capable de provoquer la formation de pronucleus dans les ovocytes de souris et de porc sans provoquer de modifications de la concentration de calcium intraovocytaire ou d'exocytose des granules corticaux (Mayes et coll., 1995 ; Prather et coll., 1997). Utilisés seuls, un ionophore calcique ou la 6-DMAP, un inhibiteur de protéines-kinases à large spectre, sont incapables de provoquer les activations parthénogénétiques de jeunes ovocytes de bovidés mais la combinaison des deux agents provoque un fort pourcentage d'activations parthénogénétiques (Liu et coll., 1998). Dans les ovocytes de souris et de bovidés, la 6-DMAP accélère l'activation, la formation du pronucleus et augmente le nombre de développements parthénogénétiques (Szöllozi et coll., 1993 ; Moses et Masui, 1994 ; Susko-Parrish et coll., 1994 ; Moses et Masui, 1995). Par ailleurs, l'application d'éthanol et de 6-DMAP sur des ovocytes de porc provoque la formation de pronucleus sans extrusion du deuxième globule polaire et la diminution de l'activité histone H1 kinase, caractéristique de l'activité MPF (Leal et Liu, 1998). D'autres études ont montré que lors de l'activation

parthénogénétique des ovocytes de bovidés, l'inactivation du MPF se produit rapidement, en corrélation avec la fin de la méiose tandis que l'inactivation de MAPK se produit plus tardivement, et semble en relation avec la formation du pronucleus (Liu et Yang, 1999).

Récemment, il a été montré que des ovocytes de bovidés insensibles à l'ionophore calcique, peuvent être activés par un dérivé de la cytokinine, la bohémine (Albeiro et coll., 2000). La bohémine, qui fait partie de la famille de l'olomoucine, est un inhibiteur de cyclin-dependent kinases (Vesely et coll., 1994 ; Abraham et coll., 1995 ; Havlicek et coll., 1997). Elle provoque l'activation des ovocytes de bovidés dans 50 % des cas lorsqu'elle est appliquée seule mais l'application conjointe de bohémine et d'ionophore calcique provoque l'activation de la quasi-totalité des ovocytes traités (Albeiro et coll., 2000).

Résultats

Publication 1

Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on *Xenopus* oocytes and eggs.

Zygote **8** : 3-14 (2000).

Introduction au travail.

Reprise de la méiose et blocage en métaphase II de l'ovocyte de Xénope.

Les ovocytes immatures de stade VI sont bloqués en prophase de première division de méiose. La progestérone déclenche la reprise de la méiose *in vivo* et *in vitro*. Celle-ci est permise par l'activation du MPF, facteur universel d'entrée en phase M. C'est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique, la Ser/Thr kinase p34^{cdc2}, et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B. Une fois activé, le MPF est responsable des événements cytologiques qui accompagnent la reprise de la méiose : la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD), la condensation des chromosomes et la formation du fuseau.

A l'issue de la première division, la deuxième division est engagée mais s'arrête aussitôt en métaphase. Cet arrêt est dû au facteur cytotatique, le CSF. Bien qu'il n'ait pas encore été purifié, il impliquerait l'activité de c-mos, MAPK et peut-être celle de cdk2. Cette activité cytotatique entretiendrait l'arrêt en métaphase en maintenant une activité MPF élevée dans la cellule, par l'inhibition de l'activation du système de dégradation des cyclines. La levée du blocage métaphasique se caractérise par la disparition des activités CSF et MPF, la formation du pronucleus femelle et l'émission du second globule polaire.

La 6-DMAP, un inhibiteur de protéines-kinases à large spectre.

Beaucoup d'auteurs ont utilisé la 6-diméthylaminopurine (6-DMAP), inhibiteur de protéines-kinases à large spectre, pour étudier la maturation ou le maintien en métaphase d'ovocytes de nombreuses espèces. La 6-DMAP inhibe les phosphorylations sans inhiber la synthèse protéique (Néant et Guerrier, 1988a). Cette substance inhibe la maturation dans toutes les espèces où elle a été étudiée. Lorsqu'elle est appliquée sur des ovocytes de mollusque (*Patella vulgata*) arrêtés en métaphase I, la 6-DMAP induit la formation de pronucleus. Un effet similaire peut être observé chez l'étoile de mer (Néant et Guerrier, 1988b). Chez le Xénope, appliquée juste après la rupture de la vésicule germinative lorsque les ovocytes sont encore en première division de méiose, la 6-DMAP induit la décondensation des chromosomes et la formation de structures de type nucléaire (Jesus et coll., 1991). Chez le Xénope, utilisée à forte concentration, cette substance semble aussi capable d'activer les ovocytes arrêtés en métaphase II (Zhang et Masui, 1992). Chez la souris, la 6-DMAP induit la décondensation des chromosomes et la reformation de l'enveloppe nucléaire lorsqu'elle est ajoutée juste après la GVBD, avant l'émission du premier globule polaire ; aucun effet n'est observé quand la substance est appliquée sur des ovocytes arrêtés en métaphase II (Rime et

coll., 1989 ; Moses et coll., 1995). Toutefois, la 6-DMAP semble accélérer l'entrée en interphase d'œufs fécondés de souris (Szöllösi et coll., 1993 ; Moses et Masui, 1994).

Inhibiteurs spécifiques des cdk.

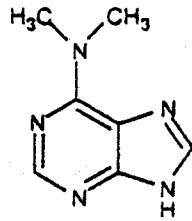
En utilisant comme précurseur la 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) et l'isopentényl adénine (IPA), l'équipe du Dr L. Meijer a synthétisé de nouveaux inhibiteurs ayant une spécificité accrue envers les cyclin-dépendent kinases (Figure 15). Par exemple, l'olomoucine inhibe cdk1(cdc2), cdk2, cdk5 et dans une moindre mesure les MAPK (Vesely et coll., 1994 ; Abraham et coll., 1995). *In vitro*, il a été déterminé que l'olomoucine possède une IC_{50} de 7 μ M vis-à-vis de p34^{cdc2/cdk1}/cycline B. La roscovitine est un composé 15 à 16 fois plus efficace pour inhiber ce même complexe (IC_{50} = 0,45 μ M : Meijer et coll., 1997).

Dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, de faibles concentrations d'olomoucine ou de roscovitine (10 μ M) sont capables d'induire la formation de noyaux interphasiques. Ces deux inhibiteurs de cdk sont aussi capables d'inhiber la synthèse d'ADN (Vesely et coll., 1994 ; Meijer et coll., 1997). En outre, ces deux substances se sont révélées des inhibiteurs très efficaces de la maturation des ovocytes de Xénope et de la phosphorylation du facteur d'élongation EF1 induite par p34^{cdc2} (Vesely et coll., 1994 ; Abraham et coll., 1995 ; Flament et coll., 1997).

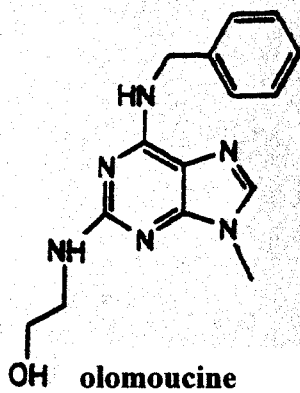
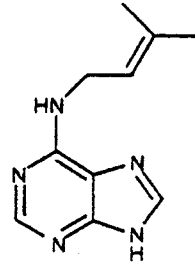
Puisque des protéines-kinases semblent impliquées dans l'arrêt en métaphase, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases permet d'appréhender les mécanismes moléculaires responsables de ce phénomène. Cependant, les produits utilisés jusqu'à présent ne sont pas spécifiques. La découverte d'inhibiteurs plus spécifiques de cdk proposent une nouvelle alternative.

L'olomoucine et la roscovitine possédant une plus grande spécificité envers le MPF que la 6-DMAP, nous avons étudié et comparé les effets de ces trois substances sur le maintien du fuseau et des chromosomes dans les ovocytes de Xénope arrêtés en métaphase II.

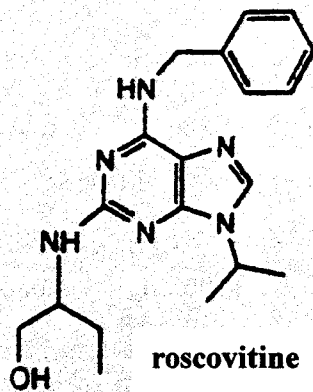
6-diméthyl-aminopurine



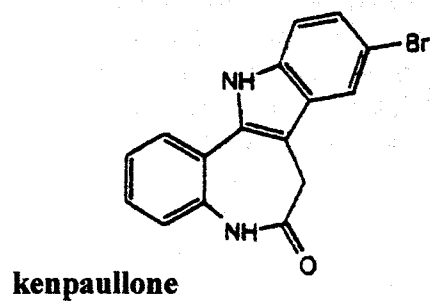
isopentényl-adénine



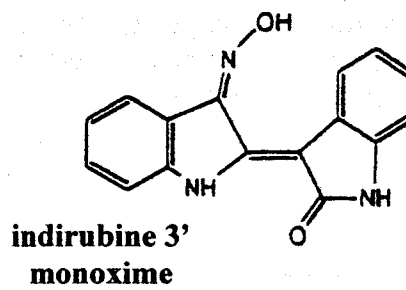
OH olomoucine



roscovitine



kenpaullone



**indirubine 3'
monoxime**

Figure 15. Structure de différents inhibiteurs de cdk.

Résultats et Discussion.

Dans un premier temps nous avons étudié *in vitro* le pouvoir inhibiteur de la 6-DMAP, de l'olomoucine et de la roscovitine sur le MPF (p34^{cdc2}/cycline B), purifié à partir d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope. Les IC₅₀ que nous avons déterminées (300, 40 et 10 µM pour la 6-DMAP, l'olomoucine et la roscovitine) sont supérieures à celles qui ont été rapportées précédemment. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ces études ont été réalisées à partir de MPF d'étoile de mer. On ne peut exclure la possibilité que d'autres kinases soient copurifiées avec le MPF sur billes de p9^{CKShs1}-sépharose, où que ces billes modifient l'affinité de l'inhibiteur pour son substrat. Utilisés *in vivo*, les trois inhibiteurs sont capables d'inhiber la maturation des ovocytes de Xénope induite par la progestérone, avec des IC₅₀ de 200, 100 et 20 µM pour respectivement la 6-DMAP, l'olomoucine et la roscovitine.

Cependant, tant au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD) que lors du blocage en métaphase II, l'application de fortes concentrations d'olomoucine ou de roscovitine (10 x IC₅₀ maturation et 2,5 x IC₅₀ maturation respectivement) ne provoque jamais la disparition du fuseau ni la formation de structures de type nucléaire. Au niveau moléculaire, l'application de ces deux inhibiteurs ne déclenche aucun changement de la mobilité électrophorétique de p34^{cdc2} ou de Erk2 (MAPK). Malheureusement, le caractère réversible de ces inhibiteurs n'a pas permis la réalisation de mesures de l'activité H1 kinase ou de l'activité MBP kinase dans les ovocytes traités. En revanche, appliquée à une concentration de 1 mM au stade de la GVBD ou à la métaphase II, la 6-diméthylaminopurine induit la disparition du fuseau et des chromosomes. La disparition de ces structures semble être un phénomène dose-dépendant. Une concentration supérieure de 6-DMAP (3 mM) permet quant à elle la formation de structures de type nucléaire au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire, et la formation d'un pronucleus lorsqu'elle est appliquée sur des ovocytes bloqués en métaphase II. Néanmoins, une concentration de 1 mM est suffisante pour provoquer la déphosphorylation de Erk2 et la rephosphorylation de p34^{cdc2}. Cette rephosphorylation de p34^{cdc2} est certainement due à l'inhibition de rétrocontrôle existant soit entre p34^{cdc2} et sa phosphatase activatrice Cdc25, soit entre p34^{cdc2} et sa kinase inhibitrice Myt1.

Nous avons utilisé d'autres inhibiteurs spécifiques des cdks, de classes chimiques différentes : l'indirubine 3'Monoxime (Hoessel et coll., 1999) et l'alsterpaullone (Schultz et coll., 1999 ; Zaharevitz et coll., 1999). En application externe sur des ovocytes bloqués en métaphase II, aucun n'a provoqué la disparition du fuseau ni la décondensation des

chromosomes (observations personnelles). Deux hypothèses peuvent expliquer les différences obtenues entre la 6-DMAP et les autres inhibiteurs. D'une part, la haute sélectivité de l'olomoucine et de la roscovitine est peut-être la raison de l'absence d'effet sur des ovocytes bloqués en métaphase. La disparition des structures, observée avec la 6-DMAP, pourrait être due à une kinase insensible à l'olomoucine et la roscovitine. D'autre part, la perméabilité membranaire globale de l'ovocyte de Xénope évolue au cours de la maturation : la perméabilité envers l'olomoucine et la roscovitine pourrait ainsi décroître.

La microinjection de ces inhibiteurs chimiques dans les ovocytes matures a révélé que l'absence d'effet était due à une trop faible perméabilité de la membrane envers ces composés. Les microinjections (100 μ M) d'olomoucine ou de roscovitine se sont avérées plus efficaces que l'injection de 6-DMAP pour lever le blocage métaphasique. Malheureusement, l'olomoucine et la roscovitine étant dilués dans le DMSO, les microinjections dans les ovocytes en métaphase II restent délicates et les concentrations injectées ne peuvent pas être augmentées au-delà d'une concentration finale de DMSO de 0,1 %. En outre, à une telle concentration les MAPK sont susceptibles d'être également inhibées. Les IC_{50} déterminées *in vitro* sont les suivantes : IC_{50} Erk1 = 50 μ M et IC_{50} Erk 2 = 40 μ M pour l'olomoucine et IC_{50} Erk1 = 34 μ M et IC_{50} Erk 2 = 14 μ M pour la roscovitine (Vesely et coll., 1994 ; Abraham et coll., 1995).

Même si ces inhibiteurs montrent une très grande sélectivité *in vitro*, de nombreux effets cellulaires peuvent affecter leur sélectivité *in vivo*. Des travaux récents ont montré qu'un inhibiteur de cdk de la famille de l'olomoucine, la bohémine, est capable d'activer les ovocytes matures de bovidés en application externe (Albeiro et coll., 2000). Mais dans le cas du Xénope, il semble que les ovocytes matures deviennent imperméables à l'olomoucine et à la roscovitine. En effet, lors de la reprise de la méiose, la membrane plasmique des ovocytes subit de nombreuses modifications qui provoquent notamment la diminution de la perméabilité membranaire (Maller et Krebs, 1980). La répartition des cibles dans les différents compartiments cellulaires, la compétition avec les fortes concentrations intracellulaires d'ATP ou la fixation sur des cibles enzymatiques non encore identifiées peuvent également affecter les effets inhibiteurs de la roscovitine et de l'olomoucine sur les cdk. En dépit de son manque de spécificité, la 6-DMAP apparaît en comparaison de la roscovitine et de l'olomoucine comme un outil mieux adapté à l'étude de l'arrêt en métaphase II des ovocytes de Xénope.

Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on *Xenopus* oocytes and eggs

Stéphane Flament, Jean-François Bodart, Marc Bertout, Edith Browaeys, Arlette Rousseau and Jean-Pierre Vilain

Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Date submitted: 27.9.99. Date accepted: 5.11.99

Summary

The effects of the new cyclin-dependent kinase inhibitors, roscovitine and olomoucine, on oocytes and eggs of *Xenopus laevis* were investigated and compared with those of 6-dimethylamino purine (6-DMAP). The inhibitory properties of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine towards p34^{cdc2}-cyclin B isolated from *Xenopus* eggs revealed K-IC₅₀ values of 300, 40 and 10 µM respectively. The three compounds inhibited progesterone-induced maturation with M-IC₅₀ values of 200, 100 and 20 µM. These values were consistent with the K-IC₅₀ values but the ratio M-IC₅₀/K-IC₅₀ was higher for roscovitine and olomoucine than for 6-DMAP. The disappearance of spindle and condensed chromosomes without pronucleus formation was observed when 1 mM 6-DMAP was applied for 4 h at germinal vesicle breakdown or at metaphase II, whereas no effect was observed using 1 mM olomoucine or 50 µM roscovitine. Changes in the electrophoretic mobility of p34^{cdc2} and erk2 were observed only in homogenates of matured oocytes or eggs exposed for 4 h to 1 mM 6-DMAP. When the drugs were microinjected into matured oocytes, olomoucine (100 µM) and roscovitine (50 µM) induced pronucleus formation more efficiently than did 6-DMAP (100 µM). Taken together, these results demonstrate that *Xenopus* oocytes possess a lower permeability to olomoucine and roscovitine and that these new compounds are suitable for *in vivo* studies after germinal vesicle breakdown provided they are microinjected.

Keywords: cdk inhibitors, Maturation, MPF, Oocytes, *Xenopus*

Introduction

Full-grown *Xenopus* oocytes are arrested at prophase of the first division of meiosis. They are released from this block by progesterone stimulation which induces them to mature. Maturation is allowed by the activation of a cytoplasmic factor called maturation promoting factor (MPF) (Masui & Markert, 1971). MPF is a complex between a Ser/Thr kinase (p34^{cdc2}) and cyclin B (King *et al.*, 1994). The activation of MPF is subjected to complex regulation; for instance, a positive feedback loop exists between cdc2 and its activating phosphatase cdc25 (Hoffmann *et al.*, 1993; Strausfeld *et al.*, 1994). Once activated, MPF phosphorylates several sub-

strates including its own cyclin B subunit (Borgne *et al.*, 1999) and induces morphological changes accompanying maturation such as nuclear envelope breakdown, chromosome condensation and spindle formation (Kishimoto, 1994).

However, meiosis is arrested again at metaphase II (Sagata, 1996). Metaphase arrest is due to the cytostatic factor (CSF). Indeed, when egg cytoplasm is injected into one blastomere of a 2-cell embryo, the injected cell arrests at metaphase (Masui & Markert, 1971). Although CSF has not been purified, *c-mos* (Sagata *et al.*, 1989) and MAP kinase (Haccard *et al.*, 1993) are thought to be involved in CSF activity. The involvement of cyclin-dependent kinase (cdk) 2 has been reported (Gabrielli *et al.*, 1993), but this result has been recently discussed (Furuno *et al.*, 1997).

It appears that metaphase arrest depends on the maintenance of MPF activity, which could be stabilised by CSF. This idea is suggested by the fact that MPF activity is maintained at a high level in

All correspondence to: Stéphane Flament, Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Tel: +33 03 20 33 61 16. Fax: +33 03 20 43 40 38.

metaphase-arrested oocytes while it decreases quickly following fertilisation or treatments with Ca^{2+} increasing agents that mimic the fertilisation-associated calcium rise (Dorée *et al.*, 1983; Gerhart *et al.*, 1984; Hashimoto & Kishimoto, 1988). Cyclin degradation by the ubiquitin pathway as well as p34^{cdc2} dephosphorylation on Thr 161 both inactivate MPF at the metaphase/anaphase transition (Murray *et al.*, 1989; Glotzer *et al.*, 1991; Lorca *et al.*, 1992). If *Xenopus* egg extracts are depleted of their mRNA and then supplemented with mRNA encoding an undestructible form of cyclin B, metaphasic spindles are formed that do not disappear even if Ca^{2+} is increased in the extract (Murray *et al.*, 1989). Following fertilisation, both CSF and MPF activities disappear but MPF is inactivated before CSF and cyclin B is degraded before *c-mos* (Watanabe *et al.*, 1991; Sagata, 1996).

Many authors have used 6-dimethylamino purine (6-DMAP) to address the question of MPF involvement not only in M-phase entry but also in metaphase arrest and in the maintenance of spindle and condensed chromosomes. 6-DMAP inhibits phosphorylation without affecting protein synthesis (Neant & Guerrier, 1988). This substance inhibits maturation in all animal species that have been studied. When applied to metaphase I-arrested oocytes of the mollusc *Patella vulgata*, 6-DMAP induced resting nuclei (Neant & Guerrier, 1988). In the amphibian *Xenopus laevis*, 6-DMAP induced chromosome decondensation and formation of nuclear-like structures when applied just after germinal vesicle breakdown (GVBD), when oocytes are still in the first division of meiosis (Jesus *et al.*, 1991). In this species, this drug was also able to activate metaphase II-arrested eggs (Zhang & Masui, 1992) even if the underlying molecular mechanisms were particular as shown by the degradation of p39^{mos} but not cyclin B (Bodart *et al.*, 1999). Egg activation by 6-DMAP was also reported in the newt *Cynops pyrrhogaster* (Iwao & Masui, 1995). In mouse oocytes, 6-DMAP induced chromosome decondensation and nuclear envelope reformation when it was added just after GVBD before the first polar body extrusion, but no effect was observed when the substance was applied to metaphase II-arrested eggs (Rime *et al.*, 1989; Moses *et al.*, 1995). Nevertheless, 6-DMAP was shown to accelerate the entry into interphase of fertilised mouse eggs (Szöllösi *et al.*, 1993; Moses & Masui, 1994).

Olomoucine, a more specific inhibitor of MPF, has recently been discovered. This purine derivative is a competitive inhibitor (ATP binding site) of MPF and cyclin-dependent kinases (Vesely *et al.*, 1994; Abraham *et al.*, 1995). Roscovitine is a new compound of this family (Meijer *et al.*, 1997). It is a very efficient inhibitor of progesterone- or procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes (Flament *et al.*, 1997).

As several kinases are involved in metaphase II

arrest, the use of kinase inhibitors might be helpful for understanding the underlying molecular events. Since we observed that new drugs such as olomoucine and roscovitine, which possess a higher specificity than 6-DMAP towards cdk, failed to activate *Xenopus* eggs, we investigated the effects of these three inhibitors on *Xenopus laevis* oocytes at different stages of the maturation process. Our results demonstrate that maturing oocytes possess a lower permeability to olomoucine and roscovitine than their immature counterparts, which explains the differences of effects.

Materials and methods

Handling of oocytes and gametes

Adult *Xenopus laevis* females were purchased from CRBM (CNRS, Montpellier, France). Immature oocytes were obtained from animals that were not primed with any gonadotropins. After anaesthesia with 1 g/l MS222 (Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.5). Full-grown stage VI oocytes (Dumont, 1972) were obtained by defolliculation using a 1 h incubation in 1 mg/ml collagenase A (Boehringer Mannheim). Oocytes were stored at 12 °C in ND96 medium. All the experiments were then performed at 20 °C.

To obtain eggs, females were primed with 500 IU of human chorionic gonadotropin (hCG). Mature oviposited eggs were dejellied in 2% cysteine in F1 medium (31.2 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgCl_2 , 1.9 mM NaOH and 2 mM NaHCO_3 ; buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES) during 15 min under agitation (Grandin & Charbonneau, 1991). They were washed three times in F1 medium and used within a day of laying.

Protein kinase assay

In this part of the study, the three inhibitors were prepared at 10 mM in dimethyl sulphoxide (DMSO) and used in concentrations ranging from 0 to 500 μM .

The kinase activity of p34^{cdc2}-cyclin B (MPF) was measured after its purification on p9^{CKShs1}-Sepharose beads as previously described (Azzi *et al.*, 1994; Flament *et al.*, 1997). Briefly, 10 *Xenopus* eggs were homogenised in 100 μl of homogenisation buffer and centrifuged at 13000 rpm for 15 min at 4 °C to eliminate yolk platelets. The supernatant was incubated with 10 μl of packed-p9^{CKShs1}-Sepharose beads for 30 min at 4 °C. After three washes with 1 ml of bead buffer, 10 μl of packed beads were incubated for 10 min at 30 °C with 1 mg/ml histone H1 and 15 μM [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (4500 mCi/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), in a final volume of 30 μl .

Assays were terminated by transferring the tubes into ice. After a brief centrifugation 15 μ l of supernatant was spotted on 2.5 \times 3 cm pieces of Whatman P81 phosphocellulose paper. Filters were washed 5 times in 1% phosphoric acid, dried and transferred to plastic scintillation vials with 1 ml scintillation fluid (Aquasafe 300 plus, Zinsser analytic). [32 P]phosphate incorporation was measured in a LKB counter. The kinase activities were measured in triplicate and the results in cpm were expressed as percentages of the control (without inhibitor). K-IC₅₀ values were given for the kinase inhibition.

Treatment of oocytes and eggs

Olomoucine was diluted in test solutions from a 1 M stock solution in DMSO. Roscovitine was also prepared in DMSO at 50 mM. The final concentration of the inhibitor was always chosen so as not to exceed 0.1% DMSO. Consequently, roscovitine concentration was limited to 50 μ M and olomoucine to 1 mM. 6-DMAP (Sigma) was prepared in ND96 or in F1 medium at 0.1 M. DMSO 0.1% was added to each batch of oocytes treated with 6-DMAP. Control oocytes and eggs incubated without inhibitors were always treated with 0.1% DMSO.

Several concentrations of each inhibitor were applied for 1 h to batches of 20 prophase I-arrested oocytes, and then progesterone (Sigma) was added to the medium (10 μ M). The inhibitory effect on oocyte maturation was analysed by examination after dissection of boiled oocytes (100 $^{\circ}$ C, 3 min). M-IC₅₀ values were given for the maturation inhibition. Experiments were also performed at GVBD. After a 5 h incubation in progesterone-containing medium, oocytes showing a white spot were estimated to be at the GVBD stage and were separated in different batches of 20 oocytes. The inhibitors were added at this time for 4 h. At the end of the experiment, oocytes were analysed at both cytological and biochemical levels as described hereafter.

The inhibitors were also used on metaphase II-arrested oocytes. After an overnight incubation in progesterone-containing medium (10 μ M), *in vitro* matured oocytes were washed three times in ND96 and then incubated for 4 h in ND96 with or without 6-DMAP, olomoucine or roscovitine, each batch containing 20 oocytes. They were then fixed and subjected to cytological analysis or homogenised for western blot studies.

The three inhibitors were used identically on eggs but the experiments were performed in F1 medium.

Microinjection

In this part of the study, 6-DMAP and olomoucine were prepared at 100 mM in DMSO whereas the con-

centration of roscovitine was 50 mM. The final concentration of DMSO in the cell was 0.1% and DMSO alone was used as a control.

After an overnight incubation in progesterone-containing medium, matured oocytes were washed five times in calcium-limited medium (CaLM: 120 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 22.5 mM Hepes, 400 μ M EDTA, 500 μ M MgSO₄, 150 μ M CaCl₂, pH 7) in order to prevent activation due to pricking (Zhang & Masui, 1992). The injections were performed in CaLM (50 nl/oocyte; 10 oocytes per batch) by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). After 15 min, the oocytes were incubated for 45 min in ND96 medium.

Cytological analysis

Ten oocytes or eggs in each batch were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (7 μ m thick) were stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes, and with picroindigo carmine which reveals cytoplasmic structures. This method is fine enough to detect spindles and condensed chromosomes, even if they are not located near the plasma membrane (Flament *et al.*, 1996).

Electrophoresis and western blotting

Oocytes (10 per batch) were homogenised in 100 μ l of Laemmli sample buffer. After heating (100 $^{\circ}$ C, 5 min), these samples were loaded on special 15% polyacrylamide gels (29.82% acrylamide/0.18% bis-acrylamide) and subjected to SDS-PAGE. Such gels allowed good discrimination between active and inactive MAP kinase (Chesnel *et al.*, 1997). Separated proteins were transferred onto nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell) using a semi-dry apparatus. Nitrocellulose sheets were incubated for 1 h in 10% lowfat milk in TNT (Tris 15 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.05%, pH 8). The sheets were then washed with TNT and incubated for 2 h with a mixture of anti-p34^{cdc2} monoclonal antibody A17 (Goodger *et al.*, 1996) and anti-Erk2 monoclonal antibody (Euromedex) (used respectively at 1/1000 and 1/2500 in TNT). After three washes in TNT, horseradish peroxidase-coupled rabbit anti-mouse IgG antiserum was added for 1 h (1/4000 in TNT). Horseradish peroxidase was detected with ECL (Amersham) after three washes in TNT and TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5).

Statistical analysis

Our experiments were always performed in triplicate. The results are expressed as the mean \pm SD. The significance of the difference between means of groups

was tested according to Student's *t*-test. Observed counts were compared using chi-square analysis of contingency tables or Fisher's exact test.

Results

H1 kinase activity

First, we measured the K - IC_{50} values of the different drugs on the activity of p34^{cdc2}-cyclin B (MPF) isolated from *Xenopus* eggs. These values were 10 μ M, 40 μ M and 300 μ M for roscovitine, olomoucine and 6-DMAP respectively (Fig. 1).

Prophase I-arrested oocytes

Then, we determined whether the three drugs inhibited oocyte maturation as could be expected from the K - IC_{50} values. Control oocytes incubated in ND96 alone did not show spontaneous maturation; oocytes exposed overnight to 10 μ M progesterone without inhibitor always underwent GVBD (not shown). The three drugs inhibited oocyte maturation with different efficiencies: for roscovitine, olomoucine and 6-DMAP, M - IC_{50} values were 20 μ M, 100 μ M and 200 μ M respectively (Fig. 2).

Oocytes at GVBD

The effects of the drugs were also analysed at GVBD (Fig. 3). Four hours after progesterone addition, oocytes showing a white spot at the animal pole were considered at the GVBD stage. GVBD was confirmed on the histological sections since the germinal vesicle had disappeared and condensed chromosomes and microtubules could be observed in the cytoplasm (Fig. 3A).

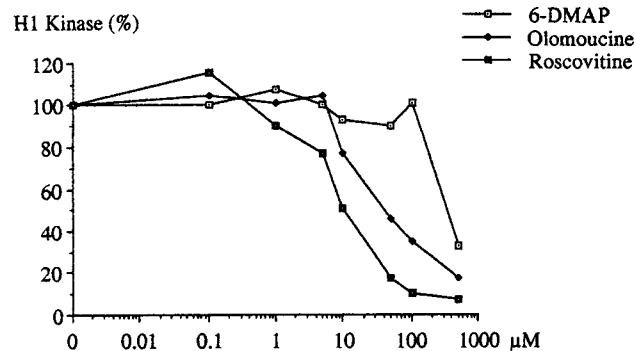


Figure 1 Inhibition of H1 kinase by 6-DMAP, olomoucine or roscovitine. The activity of p34^{cdc2}-cyclin B (MPF) isolated from *Xenopus* eggs was measured in the presence of increasing amounts of each inhibitor. The concentrations of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine that inhibited 50% of the activity of the kinase (K - IC_{50}) were 300, 40 and 10 μ M respectively.

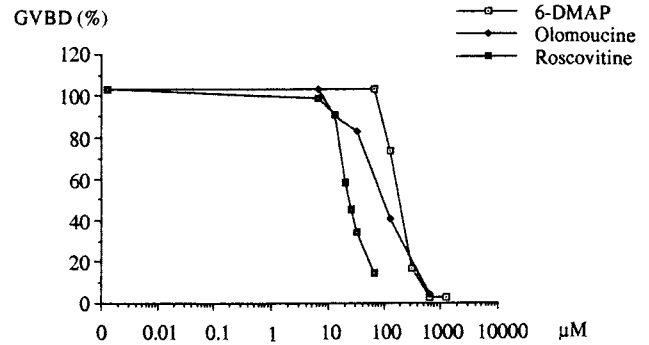


Figure 2 Inhibition of progesterone-induced maturation by 6-DMAP, olomoucine or roscovitine. In ND96 medium, the three drugs inhibited oocyte maturation as previously reported for other media: roscovitine was much more efficient than olomoucine, which in turn was more efficient than 6-DMAP. Data are the means of experiments performed in triplicate. The concentrations of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine that inhibited the maturation of 50% of the oocytes (M - IC_{50}) were 200, 100 and 20 μ M respectively. GVBD, germinal vesicle breakdown.

Four hours after their incubation in ND96 containing 1 mM 6-DMAP, we failed to detect spindle or condensed chromosomes in the white spot area (Fig. 3B). No nuclear structure was found in these oocytes. Oocytes exposed for the same time to 1 mM olomoucine showed condensed chromosomes and microtubules but the spindle was not organised (Fig. 3C). In oocytes exposed to 50 μ M roscovitine, we observed after 4 h a metaphasic spindle anchored in the plasma membrane (Fig. 3D).

Metaphase II-arrested oocytes

We failed to observe a cortical reaction or vitelline membrane elevation in oocytes exposed to 1 mM 6-DMAP. Examination of whole oocytes revealed only a few changes in pigment location in the animal hemisphere. However, when cytological sections of these oocytes were examined, the first polar body was easily found in the maturation spot area but spindle and chromosomes had disappeared in $89.2 \pm 1.44\%$ of them (Figs. 4A, 5A). Surprisingly, a pronucleus was present in only $6.7 \pm 5.8\%$ of these oocytes. This result was significantly different from those of control oocytes which were exposed for the same time to 0.1% DMSO ($p = 0.0004$). The disappearance of the spindle was dose-dependent: the increase in the percentage of oocytes lacking a normal spindle was in agreement with the increase in the 6-DMAP concentration (Fig. 4A). Also, from 0.25 to 0.5 mM 6-DMAP, although spindle and chromosomes were present, most were abnormal or ectopic (Fig. 4A). When matured oocytes were exposed for 4 h to 2 mM 6-DMAP, a pronucleus was observed in 88.9% of them (Fig. 5D).

When metaphase II-arrested oocytes were exposed

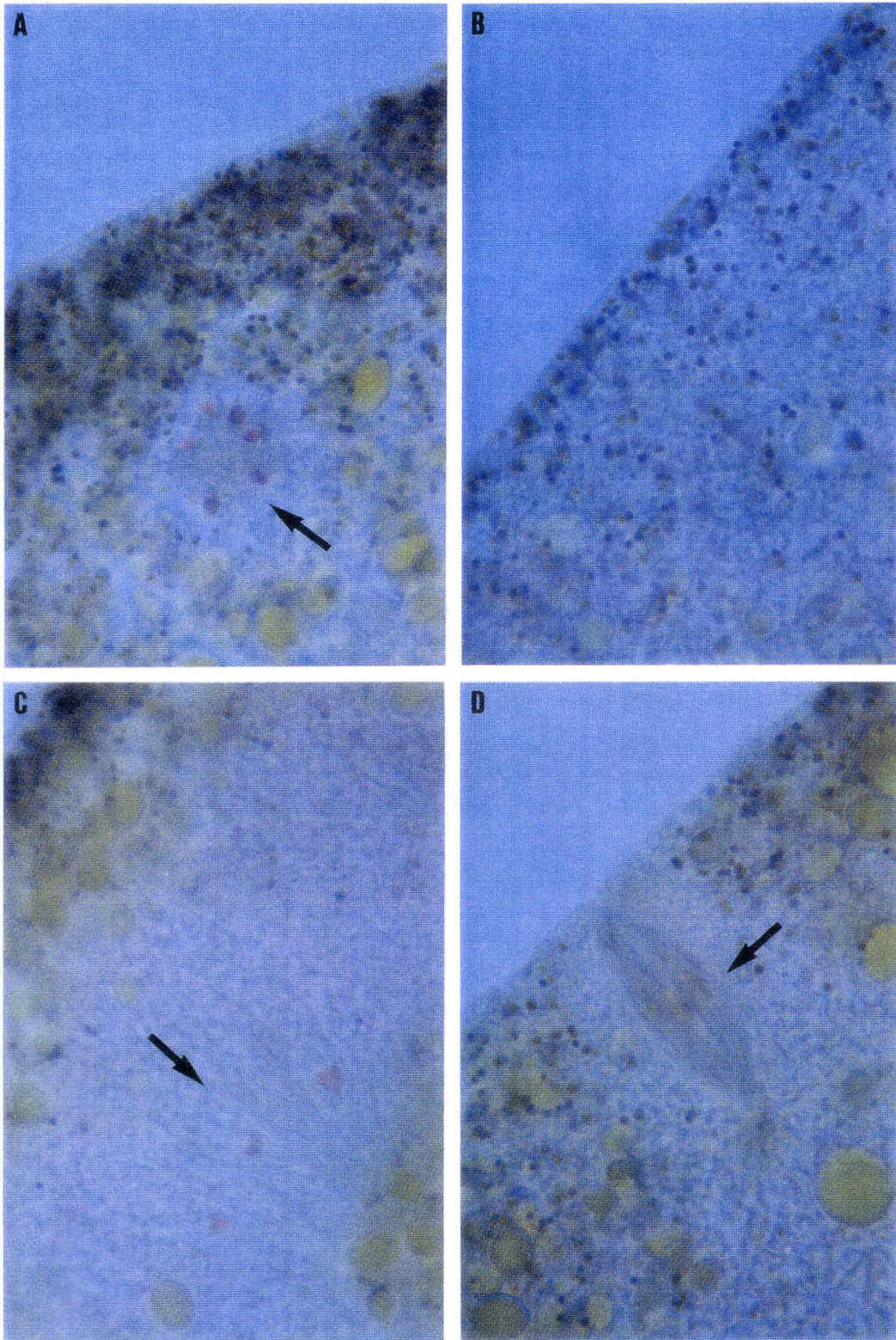


Figure 3 Sections of oocytes exposed to 6-DMAP, olomoucine or roscovitine at germinal vesicle breakdown (GVBD) stage ($\times 1400$). (A) Oocyte at GVBD stage. Five hours after progesterone addition, oocytes with a white spot showed condensed chromosomes and microtubules (arrow) but the spindle was not organised. (B) Oocyte treated at GVBD time by 1 mM 6-DMAP for 4 h. In the white spot area, we observed neither spindle and condensed chromosomes nor nuclear structures. (C) Oocyte exposed for the same time to 1 mM olomoucine. Condensed chromosomes and microtubules were still present (arrow) but the spindle was not organised. (D) Oocyte exposed for the same time to 50 μ M roscovitine. A metaphasic spindle anchored in the plasma membrane was present (arrow).

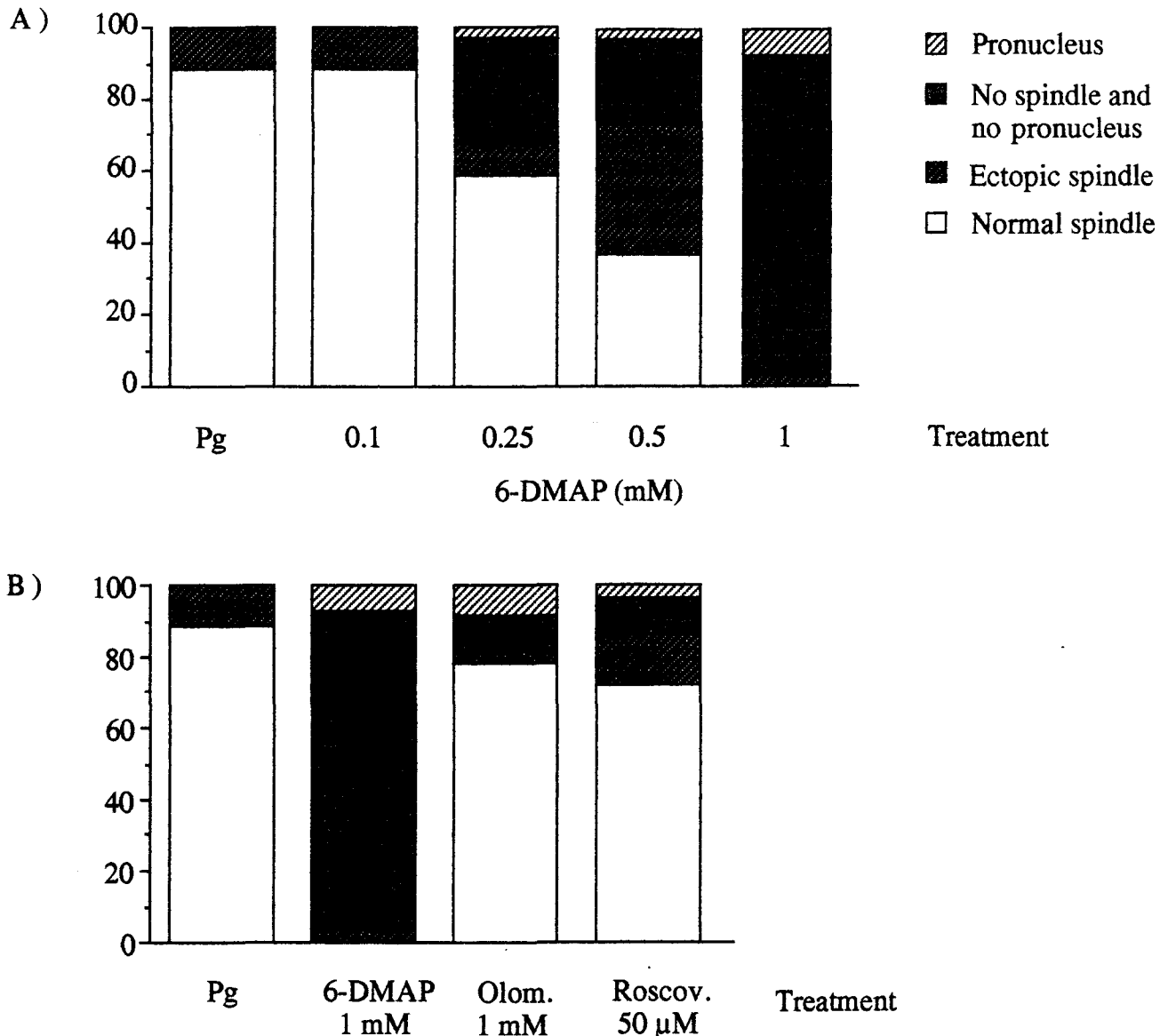


Figure 4 Effects of various concentrations of 6-DMAP, olomoucine or roscovitine on metaphase II-arrested oocytes. (A) When matured oocytes were exposed for 4 h to graded concentrations of 6-DMAP between 0.01 and 1 mM, we observed firstly spindle disturbances (at 0.5 mM) and then spindle and chromosomes disappearance (at 1 mM). Only a few pronuclei could be observed at this concentration. (B) Incubation of matured oocytes in 1 mM olomoucine or 50 μ M roscovitine did not significantly affect metaphase arrest (compare with control oocytes which were exposed only to DMSO for the same time).

for 4 h to 1 mM olomoucine, no changes were observed either outside or inside the oocyte (Fig. 4B). Indeed, the percentage of normal spindles and chromosomes that were found on the cytological sections was not significantly different from control oocytes; the spindle was anchored in the plasma membrane near the first polar body (Fig. 5B). The use of 50 μ M roscovitine was also without effect (Figs. 4B, 5C).

We have performed similar experiments on eggs rather than *in vitro* matured oocytes. We observed that these eggs were more unstable than their *in vitro* matured counterparts. This could not be expected from the observation of the eggs, which just showed slight

pigmentation changes. However, on sections of control eggs that had been incubated in F1 medium alone without any inhibitor, we detected changes in spindle localisation. These changes did not occur during the first 30 min, but as early as 1 h after the beginning of the experiment spindles were parallel to the plasma membrane and were often sectioned transversely. Thus we did not analyse the normal or abnormal state of spindle and chromosomes but just recorded whether they were present or not and, in the latter case, whether a pronucleus had been formed.

Eggs incubated for 4 h in F1 medium containing 1 mM 6-DMAP did not show any sign of activation:

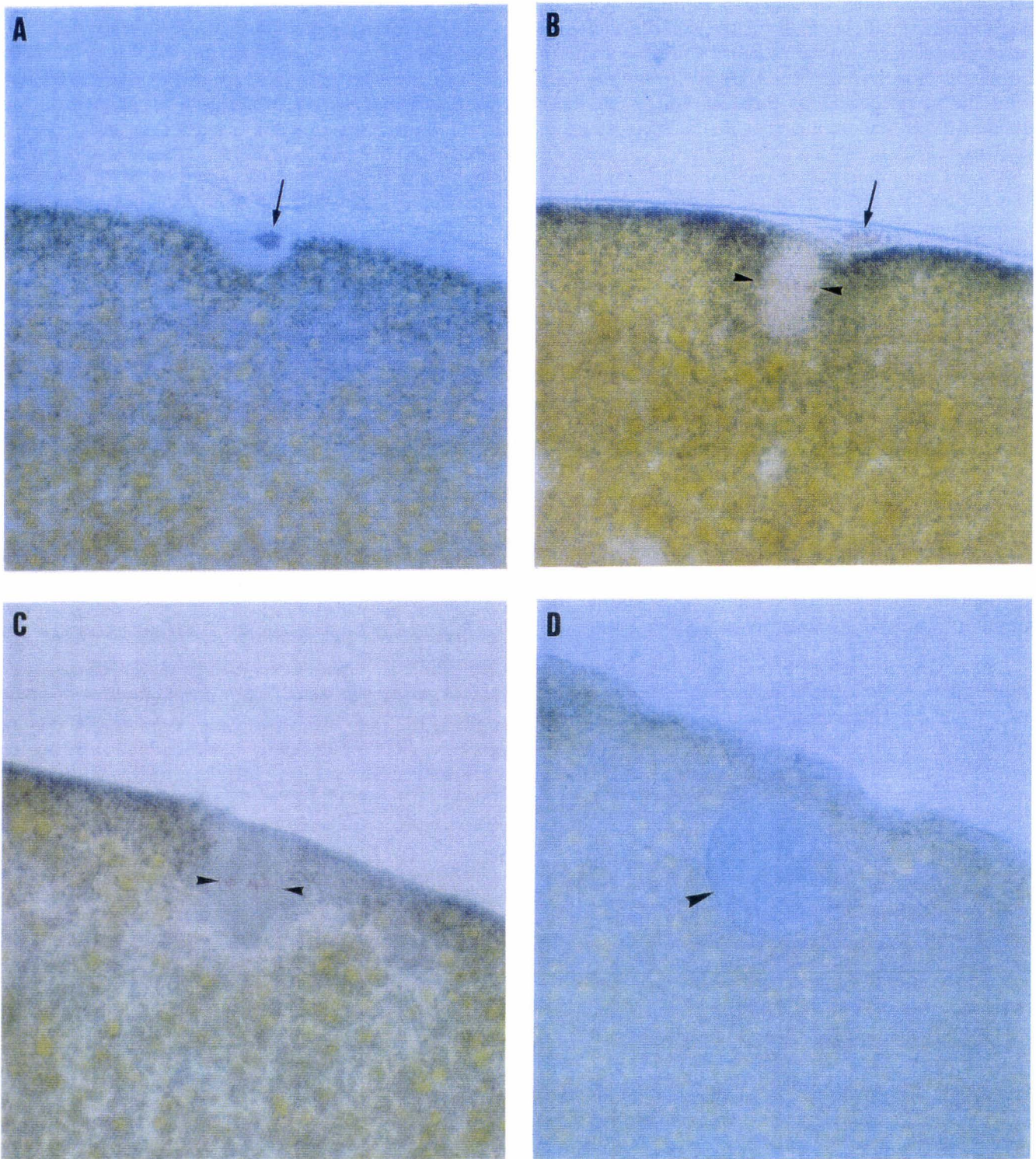


Figure 5 Sections of metaphase II-arrested oocytes treated with 6-DMAP, olomoucine or roscovitine ($\times 700$). (A) Oocyte exposed for 4 h to 1 mM of 6-DMAP: in the area of the first polar body (arrow) there is neither spindle and chromosomes nor pronucleus. (B) Oocyte incubated for 4 h in ND96 medium containing 1 mM of olomoucine: spindle and chromosomes are still present (arrowheads) and are correctly located near the polar body (arrow). (C) Oocyte exposed for the same time to 50 μ M roscovitine: the appearance is similar to control matured oocytes except that the polar body has been lost (note the absence of the vitelline membrane too). (D) Oocyte treated for 4 h with 2 mM 6-DMAP: spindle and chromosomes have disappeared whereas a pronucleus (arrowhead) is present near the animal pole.

they showed neither a cortical reaction nor vitelline membrane formation. Nevertheless, spindle and chromosomes were absent from their cytological sections. These structures were still detected in control eggs after the same period of time as well as in those exposed to 1 mM olomoucine or 50 μ M roscovitine (not shown).

The immunodetection profile of p34^{cdc2} and Erk2 was also analysed since they have been reported to be involved in metaphase II arrest. Both enzymes are inactivated at egg activation. The inactivation of MAP kinase can easily be detected on western blots since a downshift occurs after the dephosphorylation of the protein. Upon inactivation, p34^{cdc2} is detected as two bands whereas only one band is present in metaphase II-arrested oocytes. *In vitro* matured oocytes were incubated for 4 h in the presence of 6-DMAP (1 mM), olomoucine (1 mM) or roscovitine (50 μ M), homogenised and subjected to electrophoresis and western blotting. p34^{cdc2} and MAP kinase showed an inactive profile only in the case of oocytes that had been exposed to 6-DMAP (Fig. 6, lane 2). This profile was similar to those observed in prophase I-arrested oocytes (lane 5) or in A23187-activated oocytes (lane 1). Olomoucine or roscovitine, did not induce any modification of the electrophoretic mobility of these kinases (lanes 3 and 4).

Microinjection experiments

The inhibitors were also injected into metaphase II-arrested oocytes. In this case we observed that

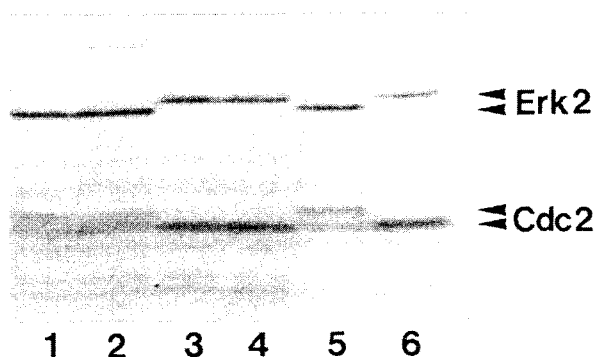


Figure 6 Immunostaining with anti-Erk2 and anti-p34^{cdc2} antibodies following incubation experiments. *Xenopus* oocytes were induced to mature by overnight incubation in progesterone-containing medium and then incubated for 1 h in 1 μ M A23187 (lane 1); or for 4 h in either 1 mM 6-DMAP (lane 2), 1 mM olomoucine (lane 3), 50 μ M roscovitine (lane 4) or ND 96 medium alone (lane 6). Lane 5, prophase I-arrested oocytes. In the case of 6-DMAP treatment, the immunodetection profile of cdc2 and Erk2 is typical of metaphase II-arrested oocytes activated with calcium ionophore, which is similar to that of immature oocytes, while treatment with either olomoucine or roscovitine does not affect these enzymes.

olomoucine and roscovitine were more efficient than 6-DMAP at releasing metaphase II-arrested oocytes from their block (Fig. 7). Indeed, a pronucleus was found in 20% of the oocytes injected with 6-DMAP (100 μ M final), in 41.6% of the oocytes injected with olomoucine (100 μ M final) and in 45.5% of the oocytes injected with roscovitine (50 μ M final). The percentage of oocytes showing a pronucleus following 6-DMAP injection was significantly different from those obtained with olomoucine ($p = 0.0391$) or roscovitine ($p = 0.0284$). In addition, we observed that the percentage of ectopic spindles was higher in oocytes incubated in roscovitine (27.3%) than in those incubated in olomoucine (20.8%) or 6-DMAP (15%).

Discussion

This study was performed to compare the effect of 6-DMAP, a non-specific inhibitor of various kinases, with that of olomoucine (Vesely *et al.*, 1994) and roscovitine (Meijer *et al.*, 1997), two potent inhibitors of MPF that have been shown to inhibit a smaller number of kinases with a higher specificity.

In vitro kinase assays and progesterone-induced maturation

In our hands, the three drugs inhibited p34^{cdc2}-cyclin B (MPF) isolated from *Xenopus* eggs as could be expected, the efficiency of roscovitine being higher than that of olomoucine which in turn was higher than that of 6-DMAP. However, the measured K-IC₅₀ values were higher than those reported previously: 10 versus 0.65 μ M for roscovitine and 40 versus 7 μ M for olomoucine (Vesely *et al.*, 1994; Meijer *et al.*, 1997). Such a difference might be explained by the fact that previous

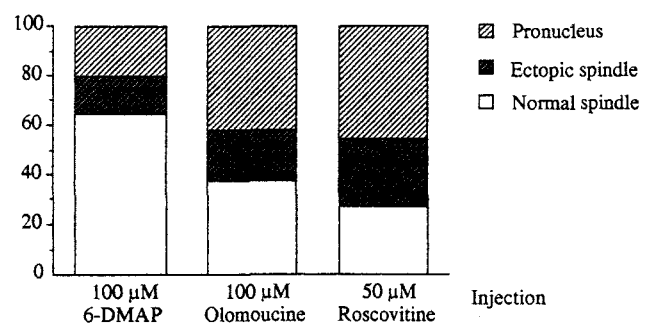


Figure 7 Microinjection of 6-DMAP, olomoucine or roscovitine into metaphase II-arrested oocytes. Olomoucine (100 μ M) or roscovitine (50 μ M) injected for 1 h into metaphase II-arrested oocytes induced the appearance of pronuclei and ectopic spindles in a higher percentage of oocytes than did 6-DMAP microinjection (100 μ M). These percentages were calculated from the pooled number of three different experiments.

measurements were obtained from starfish MPF. In addition to MPF, other kinases might purify on p9^{CKShs1} beads in *Xenopus* and might artificially increase the concentration of inhibitor required to inhibit p34^{cdc2}. Another explanation might be that in our study, MPF was not eluted from p9^{CKShs1} beads. The accessibility of the ATP-binding site of p34^{cdc2} might be lower when the kinase is adsorbed on the beads.

We also verified that in our experimental conditions the three drugs inhibited progesterone-induced oocyte maturation. This was necessary because these inhibitors had been studied together *in vitro* to assess their effect on many different kinases (Vesely *et al.*, 1994; Meijer *et al.*, 1997) but studies on maturation inhibition itself did not include the three compounds, at least in the case of *Xenopus oocytes*. Our results confirmed that roscovitine (M-IC₅₀ 20 µM) was a better inhibitor of maturation than olomoucine (M-IC₅₀ 100 µM), and that olomoucine was in turn a better inhibitor than 6-DMAP (M-IC₅₀ 200 µM). Interestingly, the value we obtained for olomoucine was identical to that reported previously (Abraham *et al.*, 1995) and that obtained for roscovitine was very similar to a previous one (20 versus 25 µM) (Meijer *et al.*, 1997). Thus, the inhibitors seem to inhibit oocyte maturation as expected from the K-IC₅₀ values. The M-IC₅₀ obtained for 6-DMAP (200 µM) was in the range of values reported by other authors: a concentration of 100 µM was required to inhibit 50% of oocyte maturation induced by progesterone whereas 350 µM were required to inhibit 50% of oocyte maturation induced by matured microinjection (Jesus *et al.*, 1991). We noticed that the ratio M-IC₅₀/K-IC₅₀ was different for the three inhibitors: 2 for roscovitine, 2.5 for olomoucine and 0.66 for 6-DMAP. It was surprising that the concentration of 6-DMAP required to inhibit 50% of oocyte maturation was lower than that required to inhibit 50% of the MPF activity, whereas just the opposite was observed for olomoucine and roscovitine.

Cytological study of oocytes treated at GVBD and at metaphase II

When 6-DMAP 1 mM, i.e. 3.3 K-IC₅₀, was applied for 4 h to oocytes at the GVBD stage, neither condensed chromosomes, spindle or nuclear structures were present on the histological sections. Olomoucine at 1 mM, i.e. 25 K-IC₅₀, seemed to slow down the maturation process whereas roscovitine at 50 µM, i.e. 5 K-IC₅₀ did not affect the sequence of events leading to the matured stage since a metaphasic spindle anchored in the plasma membrane was found as though the oocytes had not been exposed to any drug. The use of higher doses of 6-DMAP (3 mM) on maturing oocytes induced the appearance of 'nuclear like structures'

(our unpublished results; Jesus *et al.*, 1991). Unfortunately, no data are available in the literature for roscovitine and olomoucine.

When metaphase II-arrested oocytes or eggs were exposed for 4 h to 6-DMAP, olomoucine or roscovitine at a concentration that is able to inhibit oocyte maturation, we failed to detect either cortical reaction, vitelline membrane elevation, or spindle disappearance and pronucleus formation. This result was not very surprising for 6-DMAP since only high doses of this drug are able to induce the cortical reaction (Zhang & Masui, 1992). This event occurs in 30 min in the presence of 12 mM 6-DMAP while 6 h are needed in the presence of 1 mM 6-DMAP (Zhang & Masui, 1992). High doses of 6-DMAP (5 mM) are also required to activate newt eggs (Iwao & Masui, 1995).

Nevertheless, despite the absence of external changes following the incubation in 6-DMAP containing medium, cytological analysis revealed modifications of spindles and chromosomes. Indeed, between 0.25 and 0.5 mM, the percentage of abnormal or ectopic spindles increased. At 1 mM 6-DMAP, i.e. 3.3 K-IC₅₀, in most cases we detected neither spindle and chromosomes, even ectopic, nor pronucleus. Such a result has not been reported by Zhang & Masui (1992), who analysed the effect of various concentrations of 6-DMAP (including 1 mM) on the latency of cortical reaction, but whose cytological analysis was only performed on eggs treated with 12 mM 6-DMAP.

We propose that 1 mM 6-DMAP could be sufficient to induce microtubule depolymerisation and chromosome decondensation whereas it could not be sufficient to induce nuclear envelope assembly. Consistent with this proposal, at 2 mM 6-DMAP, a pronucleus occurred in oocytes from the same animal. We do not know the state of the chromatin in oocytes incubated in 1 mM 6-DMAP for 4 h, but we observed that if 12 mM 6-DMAP was added to ND96 at this time, a pronucleus occurred in most of the oocytes after 30 min. This suggested that even if no spindle and chromosomes were observed in these oocytes, they were still alive and able to build a nuclear structure. Thus, the concentration of inhibitor needed to completely release metaphase II-arrested oocytes from their block is higher than that necessary to inhibit oocyte maturation. The requirement for high doses of inhibitor at the end of oocyte maturation is probably related to the presence of a high level of kinase activity. Indeed, it is well known that oocyte maturation is associated with an autoamplification of MPF activity and with a burst in phosphorylation (Maller *et al.*, 1977).

The result obtained with 1 mM 6-DMAP was significant enough to be compared with olomoucine and to a lesser extent with roscovitine. When olomoucine was used for the same time at 1 mM, i.e. 25 K-IC₅₀, we could not detect any modification of metaphase II-arrested

oocytes either outside or inside the oocyte as revealed by the cytological analysis. Indeed, spindle and chromosomes were still correctly located at this stage: they were anchored in the plasma membrane of the animal pole. A lack of effect on metaphase II-arrested oocytes was also observed with 50 μM roscovitine, i.e. 5 K-IC_{50} , which inhibited 95% of oocyte maturation.

It was very surprising that not only at GVBD but also at metaphase II, roscovitine and olomoucine, which are better than 6-DMAP at inhibiting $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ (10 and 40 μM vs 300 μM for K-IC_{50}) and which we used at higher doses with regard to their K-IC_{50} (5 and 25 K-IC_{50} vs 3.3 K-IC_{50}), were not able to induce the disappearance of spindle and condensed chromosomes.

Biochemical changes

We attempted to measure H1 kinase activity (for $\text{p34}^{\text{cdc}2}$) and MBP kinase activity (for Erk2) in matured oocytes that had been exposed for 4 h to olomoucine or roscovitine. Unfortunately, the activity of these kinases was not significantly different from those measured in control oocytes (not shown). This result might be expected since these molecules are reversible inhibitors which are diluted during the homogenisation of the oocytes and during kinase activity measurement.

Consequently, the active or inactive state of these kinases was analysed by western blotting because homogenisation could be performed directly in the Laemmli sample buffer and, in these conditions, no dilution of the inhibitor could occur. This study showed changes in the electrophoretic mobility of $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ and Erk2 only in the case of oocytes exposed to 6-DMAP. Such changes were reported previously following application of 6-DMAP just after GVBD (Jessus *et al.*, 1991). These modifications correspond to the tyrosine-14 rephosphorylation of $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ on one hand and to the dephosphorylation of Erk2 on the other hand (Jessus *et al.*, 1991). The rephosphorylation of $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ might be due to the existence of a feedback loop between $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ and its upregulating enzymes $\text{cdc}25$ or $\text{wee}1$. These changes were in agreement with an inactivation of both enzymes and were correlated with the results of the cytological study.

Two hypotheses might explain these differences between 6-DMAP and the two other inhibitors. First, the higher selectivity of roscovitine and olomoucine towards cdk's might be the reason for the absence of effect. The disappearance of spindle and condensed chromosomes observed with 6-DMAP could be due to the inhibition of a kinase which could be insensitive to olomoucine or roscovitine. Second, the lower permeability of the oocyte to roscovitine and olomoucine might be the reason for the lack of effect. A lower permeability could explain why the ratio $\text{M-IC}_{50}/\text{K-IC}_{50}$ was higher for olomoucine and roscovitine than for

6-DMAP. The differences in permeability of the oocyte towards the three drugs might be increased during the process of maturation. Indeed, it is well known that permeability changes occur during oocyte maturation. These changes affect not only ionic species but also macromolecular precursors (Maller & Krebs, 1980).

Microinjections

To discriminate between these two hypothesis, we performed microinjection experiments in metaphase II-arrested oocytes. Following injection into the oocytes, olomoucine and roscovitine were more efficient than 6-DMAP at releasing oocytes from their block, which was consistent with our hypothesis. We observed that the percentage of oocytes showing a pronucleus was not very high, whichever inhibitor was microinjected. This observation might be explained by the concentrations used being too low; we could not increase them due to DMSO toxicity. However, at least for 6-DMAP, our results were consistent with those obtained by Zhang & Masui (1992): they reported 1% of activated eggs following microinjection of 20 μM and 64% following 200 μM (final concentration in the cell). These results are also in agreement with the fact that olomoucine and roscovitine are able to induce resting nuclei when they are added to mitotic *Xenopus* egg extracts (Vesely *et al.*, 1994; Meijer *et al.*, 1997).

In conclusion, our study demonstrates that the formation of a pronucleus in metaphase II-arrested *Xenopus* oocytes may be obtained with olomoucine and roscovitine, two new cdk inhibitors that are more specifically directed against $\text{p34}^{\text{cdc}2}$, provided they are injected into the oocyte.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Laurent Meijer for the generous gift of olomoucine and roscovitine and for scientific discussions about this work. We are also grateful to Dr Franck Chesnel for his suggestions about Erk2 detection and to Dr Alain Leprêtre for his help in statistical analysis. These studies were supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale (DRED, EA no. 1033), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Région Nord - Pas-de-Calais (Centre de Biologie Cellulaire) and the FEDER.

References

- Abraham, R.T., Acquarone, M., Andersen, A., Asensi, A., Bellè, R., Berger, F., Bergounioux, C., Brunn, G., Buquet-Fagot, C., Fagot, D., Glab, N., Goudeau, H., Goudeau, M., Guerrier, P., Houghton, P., Hendriks, H., Kloaereg, B.,

- Lippai, M., Marie, D., Maro, B., Meijer, L., Mester, J., Mulner-Lorillon, O., Poulet, S.A., Schierenberg, E., Schutte, B., Vaultot, D. & Verlhac, M.H. (1995). Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell* **83**, 105–20.
- Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A.C., Lew, J. & Wang, J.H. (1994). Purification of a 15 kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 13279–88.
- Bodart, J.-F., Bechard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.-P. & Flament, S. (1999). Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B2 and p39^{mos} proteolysis. *Exp. Cell Res.* **253**, 413–21.
- Borgne, A., Ostvold, A.C., Flament, S. & Meijer, L. (1999). Intra-M phase promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* **274**, 11977–86.
- Chesnel, F., Bonnec, 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**, 122–33.
- Dorée, M., Peaucellier, G. & Picard, A. (1983). Activity of the maturation promoting factor and the extent of protein phosphorylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.* **99**, 489–501.
- Dumont, L.W. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153–80.
- Flament, S., Browaeys, E., Rodeau, J.L., Bertout, M. & Vilain, J.P. (1996). *Xenopus* oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 471–6.
- Flament, S., Bodart, J.-F., Browaeys, E., Bertout, M., Rousseau, A., Gannon, J. & Vilain, J.-P. (1997). Procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor. *Zygote* **5**, 11–19.
- Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N. & Sagata, N. (1997). Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase. *EMBO J.* **16**, 3860–5.
- Gabrielli, B.G., Roy, L.M. & Maller, J. L. (1993). Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* **259**, 1766–9.
- Gerhart, J., Wu, M. & Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**, 1247–55.
- Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–8.
- Goodger, N., Gannon, J., Hunt, T. & Morgan, P.R. (1996). On the abundance and localization of p34cdc2 in the cells of normal, hyperplastic and malignant human lymphoid and epithelial tissues. *J. Pathol.* **178**, 422–8.
- Grandin, N. & Charbonneau, M. (1991). Intracellular free calcium oscillates during cell division of *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* **122**, 711–18.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E. & Maller, J.L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* **262**, 1262–5.
- Hashimoto, N., & Kishimoto, T. (1988). Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* **126**, 242–52.
- Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E. & Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12**, 53–63.
- Iwao, Y. & Masui, Y. (1995). Activation of newt eggs in the absence of Ca²⁺ activity by treatment with cycloheximide or D₂O. *Dev. Growth Differ.* **37**, 641–51.
- Jessus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W. & Ozon, R. (1991). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* **111**, 813–20.
- King, R.W., Jackson, P.K. & Kirschner, M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563–71.
- Kishimoto, T. (1994). Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 185–91.
- Lorca, T., Labbé, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.-P., Cavadore, J.-C., Le Bouffant, F. & Dorée, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J.* **11**, 2381–980.
- Maller, J.L. & Krebs, E.G. (1980). Regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Cell. Reg.* **16**, 271–310.
- Maller, J.L., Wu, M. & Gerhart, J.C. (1977). Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.* **58**, 295–312.
- Masui, Y. & Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129–46.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P.J., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G. & Moulinoux, J.P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **243**, 527–36.
- Moses, R.M. & Masui, Y. (1994). Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J. Exp. Zool.* **270**, 211–18.
- Moses, R.M., Kline, D. & Masui, Y. (1995). Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium- and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. *Dev. Biol.* **167**, 329–37.
- Murray, A.W., Solomon, M.J. & Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280–6.
- Neant, I. & Guerrier, P. (1988). 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* **176**, 68–79.
- Rime, H., Neant, I., Guerrier, P. & Ozon, R. (1989). 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* **13**, 169–79.
- Sagata, N. (1996). Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* **6**, 22–8.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G.F. & Ikawa, Y. (1989). The *c-mos* proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrates eggs. *Nature* **342**, 512–18.

- Stausfeld, U.P., Fernandez, A., Capony, J.-P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbé, J.-C. & Lamb, N.J. (1994). Activation of p34^{cdc2} protein kinase by microinjection of human Cdc25C into mammalian cells: requirement for prior phosphorylation of Cdc25C by p34^{cdc2} on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 5989–6000.
- Szöllösi, M.S., Kubiak, J.Z., Debey, P., De Pennart, H., Szöllösi, D. & Maro, B. (1993). Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **104**, 861–72.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strand, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J.Y., Detivaud, L., Leclerc, S. & Meijer, L. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771–86.
- Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y. & Sagata, N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytosolic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **352**, 247–8.
- Zhang, S.C. & Masui, Y. (1992). Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J. Exp. Zool.* **263**, 317–29.

Publication 2

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 (1999).

Introduction au travail.

Levée du blocage métaphasique par inhibition des protéines kinases.

La 6-DMAP a été utilisée dans de nombreux modèles animaux pour étudier la maturation et le maintien de l'arrêt en métaphase. Cet inhibiteur de kinases, qui n'empêche pas la synthèse protéique, inhibe la maturation dans toutes les espèces où il a été employé. Nous avons constaté que des inhibiteurs plus spécifiques des cdks, comme l'olomoucine et la roscovitine, n'affectent pas les ovocytes de *Xénope* arrêtés en métaphase II (Publication 1). Il était donc intéressant d'approfondir la connaissance du mécanisme d'action de la 6-DMAP qui s'est avérée l'inhibiteur le plus à même de lever le blocage métaphasique.

Le blocage en métaphase I des ovocytes de *Patella vulgata* ou de *Mytilus edulis* est sensible à l'action de la 6-DMAP. Celle-ci induit la décondensation des chromosomes et la formation de structures de type nucléaire dans le cytoplasme (Néant et Guerrier, 1988a ; Néant et coll., 1994). L'arrêt en métaphase de ces espèces est aussi sensible à l'inhibition de la synthèse protéique.

De même, l'arrêt en métaphase II des ovocytes de souris est dépendant d'une synthèse protéique continue : une brève inhibition de la synthèse protéique suffit à lever le blocage métaphasique (Siracusa et coll., 1978 ; Clarke et Masui, 1983, 1985 ; Clarke et coll., 1988 ; Verlhac et coll., 1993). Les ovocytes de souris sont sensibles à l'action de la 6-DMAP durant une période qui s'étend de la prométaphase I à la télophase I (de la GVBD jusque l'émission du premier globule polaire). A ce stade, l'application de 6-DMAP provoque la décondensation des chromosomes et la formation d'une enveloppe nucléaire (Rime et coll., 1989 ; Fulka et coll., 1997). Par contre, sur les ovocytes bloqués en métaphase II, aucun effet n'a pu être observé : les chromosomes restent condensés (Rime et coll., 1989 ; Moses et Masui, 1994 ; Fulka et coll., 1997). De même, les ovocytes de bovidés bloqués en métaphase sont insensibles à l'action de la 6-DMAP (Susko-Parrish et coll., 1994).

Dans les ovocytes d'amphibien bloqués en métaphase II, l'activité cytotatique est indépendante de la synthèse protéique (Murray et coll., 1989). La 6-DMAP est capable de provoquer l'activation des ovocytes de *Xénope* (Zhang et Masui, 1992). Il en est de même chez le triton *Cynops pyrrhogaster* (Iwao et Masui, 1995). Cependant, la levée du blocage métaphasique des ovocytes d'amphibien induite par la 6-DMAP n'a jamais été caractérisée au niveau moléculaire. Nous avons donc comparé les effets de cet inhibiteur de kinases avec ceux de l'ionophore calcique, qui imite l'augmentation de la concentration intracellulaire de

calcium qui se produit lors de la fécondation. Nous avons réalisé parallèlement une étude cytologique et une étude biochimique d'ovocytes traités par une forte dose de 6-DMAP. Des dosages enzymatiques de l'activité du MPF et de MAPK ont été effectués ainsi qu'une analyse par immuno-empreintes de p34^{cdc2}, des cyclines B1 et B2, de MAPK et de c-mos.

Résultats et Discussion

Appliqué sur des ovocytes de Xénope bloqués en métaphase II, l'ionophore calcique ou la 6-DMAP induit la formation d'un pronucleus. Même si le pronucleus se forme dans un délai de 30 minutes dans les deux cas, des différences majeures ont pu être observées entre ces deux traitements. Dans les ovocytes traités par l'ionophore calcique, le pronucleus migre vers le centre de l'ovocyte, accompagné par une trainée de pigments. Après deux heures, le pronucleus disparaît mais des chromosomes condensés sont observables dans le cytoplasme. Par contre, le pronucleus induit par la 6-DMAP ne migre pas et reste dans la zone corticale où sa taille augmente. La disparition du pronucleus et la condensation des chromosomes ne sont jamais observées en présence de 6-DMAP, même après 2 heures de traitement. Cependant, si des ovocytes traités pendant 45 minutes par la 6-DMAP sont rincés plusieurs fois avec précaution, le pronucleus disparaît et on peut observer la recondensation des chromosomes (tableau 1).

La levée du blocage métaphasique induite par l'ionophore calcique se caractérise aussi par deux autres événements morphologiques : la migration des pigments vers le pôle animal (contraction corticale) et l'exocytose des granules corticaux. Dans nos conditions, nous n'avons jamais observé la contraction corticale lors de l'application de la 6-DMAP. Celle-ci semble en outre inhiber la contraction corticale induite par l'ionophore calcique (tableau 2). De même, l'exocytose des granules corticaux qui suit l'augmentation de calcium intracellulaire ne se produit pas dans les ovocytes traités par la 6-DMAP. L'absence d'exocytose des granules corticaux est peut-être due à un effet inhibiteur de la 6-DMAP sur la Protéine Kinase C (PKC), dont l'activation est suffisante pour déclencher ce phénomène. On peut néanmoins observer une diminution du nombre des granules corticaux au cours du temps. Cette diminution semble indépendante des mécanismes d'exocytose et serait due à des remaniements de la membrane plasmique, qui prend un aspect festonné (figure 16). La 6-DMAP pourrait en effet affecter les composants du cytosquelette (Simili et coll., 1997).

Traitement	Pronucleus (%)	Absence de structure (%)	Chromosomes et microtubules (%)	Nombre d'ovocytes traités
6-DMAP 12 mM 45 minutes	100	0	0	10
6-DMAP 12 mM 45 minutes + 50 minutes rinçages ND96	79	21	0	19
6-DMAP 12 mM 45 minutes + 75 minutes rinçages ND96	21	21	58	14

Tableau 1. Disparition du pronucleus induit par la 6-DMAP après rinçages.

Les ovocytes arrêtés en métaphase II sont incubés dans un milieu physiologique, le ND96, contenant 12mM de 6-DMAP. Après 45 minutes d'incubation, les ovocytes sont rincés plusieurs fois avec précaution dans un milieu ND96 seul. Les ovocytes traités sont ensuite fixés pour une analyse cytologique (voir matériel et méthodes de la Publication 1). Les résultats préliminaires présentés dans ce tableau ont été obtenus sur une seule femelle.

traitement	Nombre d'ovocytes montrant une réaction corticale (%)	N total
Ovocytes témoins bloqués en métaphase II	0	20
Ionophore calcique 10 μ M	100	21(*)
6-DMAP 12 mM puis ionophore calcique 10 μ M	0	34(*)
6-AP 12 mM puis ionophore calcique 10 μ M	100	10
PMA 20 μ M	93,9	33
6-DMAP 12 mM puis PMA 20 μ M	3	32

Tableau 2. Inhibition de la réaction corticale par la 6-DMAP.

Appliqués sur des ovocytes bloqués en métaphase II, l'ionophore calcique et le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate, activateur de la PKC) sont capables d'induire une réaction corticale qui est observable sous loupe binoculaire. Dans les deux cas, une préincubation de 30 minutes dans la 6-DMAP inhibe la réaction corticale : aucun changement de pigmentation n'est observé. Un analogue inactif de la 6-DMAP, la 6-aminopurine (6-AP) n'empêche pas l'activation induite par l'ionophore calcique. Les résultats suivis de (*) représentent les résultats d'expériences réalisées sur deux femelles différentes, les autres résultats ont été obtenus sur une seule femelle.

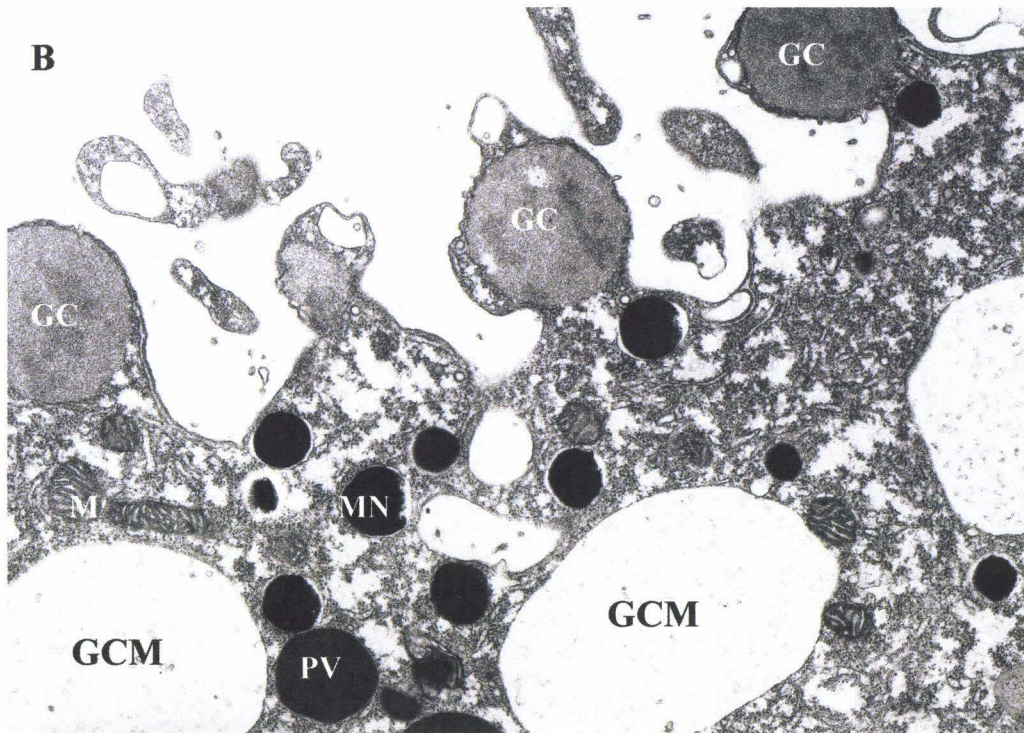
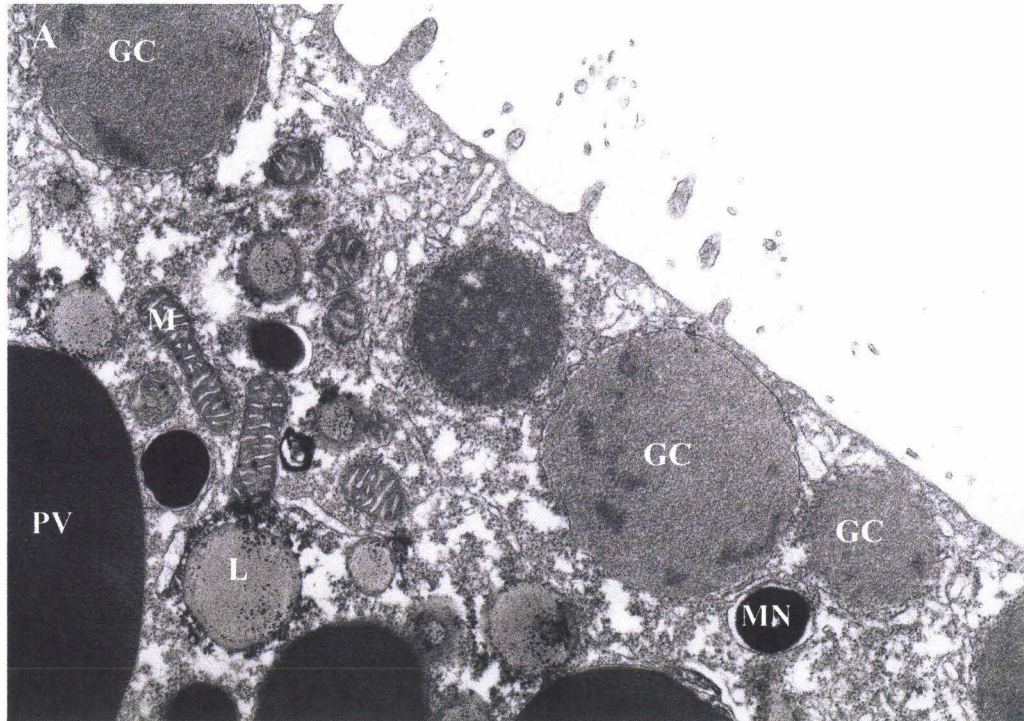


Figure 16. Effets de la 6-DMAP sur l'exocytose des granules corticaux.

A. Coupe d'un ovocyte bloqué en métaphase II de Xénope (x 20000) : les granules corticaux sont présents sous la membrane plasmique. B. Coupe d'ovocyte bloqué en métaphase II après 2 heures de traitement 6-DMAP 12 mM : les granules corticaux (GC) sont toujours présents mais certains d'entre eux présentent un aspect modifié (GCM). La membrane plasmique est festonnée (x 15000). L : globule lipidique. M : mitochondrie. MN : mélanosome. PV : plaquette vitelline.

Même si les deux substances induisent la formation d'un pronucleus, les mécanismes moléculaires impliqués sont différents. En effet, lors de l'activation induite par l'ionophore calcique, l'activité MPF chute avant l'activité MAPK. L'inactivation de l'activité MPF est due à la protéolyse des cyclines B1 et B2 lors des premières minutes du traitement. La chute de l'activité MAPK se produit en même temps que la déphosphorylation de la kinase. En revanche, en présence de 6-DMAP, les activités MPF et MAPK disparaissent simultanément dès les premières minutes du traitement. p34^{cdc2} est rapidement rephosphorylée sur son résidu tyrosine. La disparition de l'activité MPF dans ce cas n'est pas associée à la dégradation des cyclines B1 et B2 dans la mesure où ces protéines restent stables dans les ovocytes traités. Auparavant, l'inhibition de la dégradation des cyclines B par la 6-DMAP n'avait été rapportée qu'*in vitro* dans des extraits acellulaires de *Spisula* (Luca et Ruderman, 1989) et dans les extraits mitotiques de Xénope (Félix et coll., 1990). L'inhibition du MPF dans ces ovocytes pourrait expliquer l'absence de protéolyse des cyclines B. En effet, il a été proposé que le MPF induit la dégradation de la cycline B, par un mécanisme qui reste encore inconnu (Townsend et Ruderman, 1998). Nos expériences préliminaires avec les extraits CSF d'ovocytes de Xénope, ont indiqué que des inhibiteurs spécifiques de p34^{cdc2} sont capables d'empêcher partiellement (roscovitine) ou complètement (alsterpaullone) la dégradation de la cycline B induite par l'addition de calcium (figure 17). En outre, il a été récemment mis en évidence que les phosphorylations par p34^{cdc2} de la sous-unité Cdc27 de l'APC et de Fizzy sont nécessaires à l'activité de l'APC (Patra et Dunphy, 1998 ; Lorca et coll., 1998).

Il est également intéressant de noter que la cycline B2 est partiellement déphosphorylée au cours du temps. Dans les ovocytes d'étoile de mer, il a été démontré que p34^{cdc2} phosphoryle la cycline (Borgne et coll., 1999). Cette situation semble différente dans les ovocytes de Xénope, puisque l'inhibition totale de cdc2 n'entraîne pas la déphosphorylation totale de la cycline. Une autre kinase pourrait donc également intervenir dans la phosphorylation de la cycline B chez le Xénope.

Dans les ovocytes traités par la 6-DMAP, l'inactivation de MAPK est rapide, suggérant que la MAPK est directement inhibée. L'inactivation de MAPK est également plus rapide en présence de 6-DMAP lors de l'activation des ovocytes de bovidés (Liu et Yang, 1999). En outre, cette chute de l'activité MBP Kinase n'est pas liée à l'état de phosphorylation de MAPK, qui est déphosphorylée plus tardivement. En amont dans la voie MAPK, c-mos est totalement dégradée après 40 minutes dans les deux traitements. La dégradation de c-mos dans les ovocytes traités par la 6-DMAP est surprenante dans la mesure où les cyclines B sont

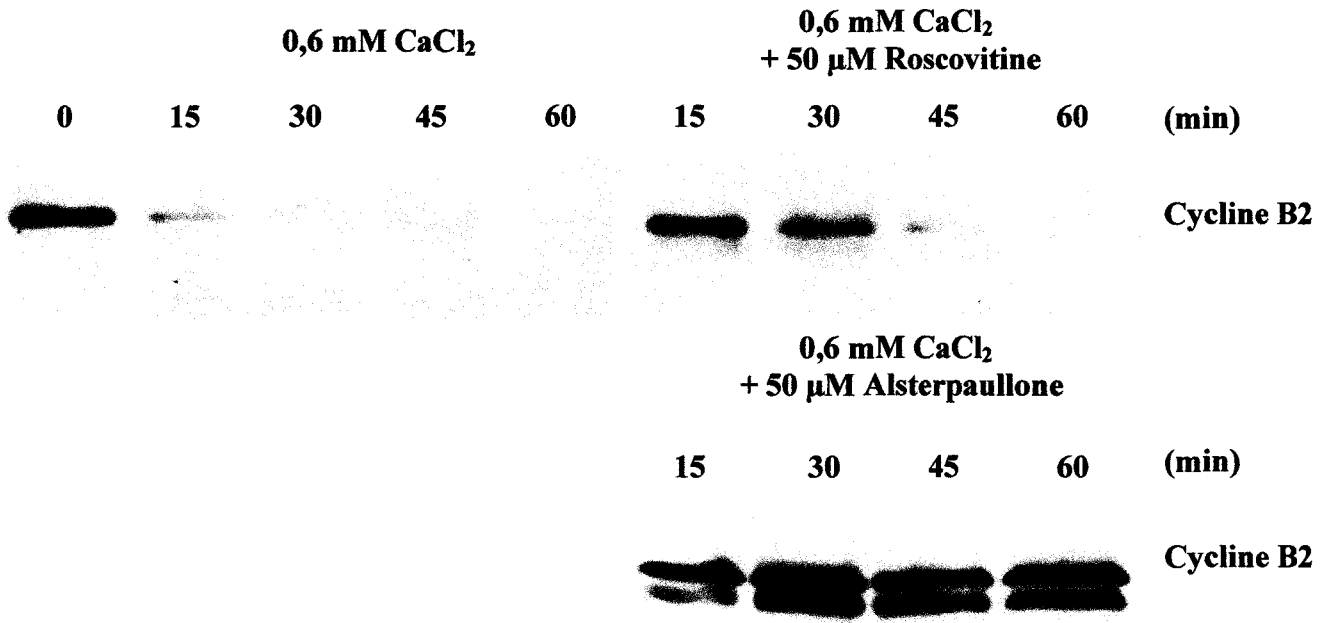


Figure 17 . Inhibition de la dégradation de la cycline B2 par des inhibiteurs spécifiques des cdks dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope.

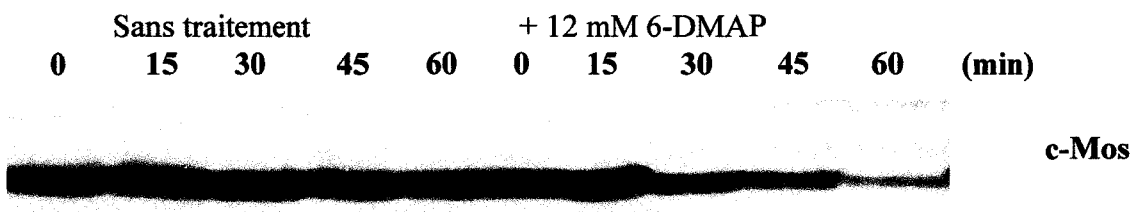


Figure 18. Dégradation de c-mos induite par la 6-DMAP dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope.

stables dans ces mêmes ovocytes. Des travaux préliminaires dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de *Xénope* fraîchement préparés, nous ont montré que la 6-DMAP est capable d'induire la dégradation de *c-mos* *in vitro* (figure 18). Ce dernier résultat suggère donc des régulations différentes de la protéolyse des cyclines B et de la protéolyse de *c-mos*. Certaines données indiquaient déjà des différences entre les mécanismes de dégradation de la cycline et de *c-mos*. La protéolyse de la cycline B est gouvernée par son ubiquitination. Celle-ci est effectuée par l'APC grâce à la reconnaissance d'un signal de destruction, la "destruction box", qui est située dans la partie N-terminale de la cycline (Glotzer et coll., 1991 ; King et coll., 1995). *c-mos* ne possède pas un tel signal, son ubiquitination repose sur la reconnaissance de la proline en deuxième position (Nishizawa et coll., 1993).

Quel est le mécanisme qui entraîne la protéolyse de *c-mos* dans les ovocytes traités par la 6-DMAP? Cet inhibiteur de protéines-kinases à large spectre pourrait agir en inhibant une kinase nécessaire à la phosphorylation stabilisatrice de *c-mos*. La déphosphorylation de *c-mos* par la phosphatase appropriée conduirait alors à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. Hormis ce mécanisme de protéolyse qui implique l'activation du système ubiquitine, il a été précédemment rapporté que des protéases dépendantes du calcium, les calpaïnes, dégradent *c-mos* (Watanabe et coll., 1989). Dans la mesure où la 6-DMAP est capable de provoquer une augmentation de la concentration intraovocytaire de calcium chez le singe Rhésus (Wu et coll., 1996), on peut se demander si une telle libération de calcium se produit dans les ovocytes de *Xénope*. Dans ce cas, elle pourrait être responsable de l'activation de protéases dépendantes du calcium et de la protéolyse de *c-mos*.



Activation of *Xenopus* Eggs by the Kinase Inhibitor 6-DMAP Suggests a Differential Regulation of Cyclin B and p39^{mos} Proteolysis

Jean-François Bodart,* David Bécharde,* Marc Bertout,* Julian Gannon,† Arlette Rousseau,* Jean-Pierre Vilain,* and Stéphane Flament*¹

*Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; and †Imperial Cancer Research Fund Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, United Kingdom

In *Xenopus* eggs, metaphase II arrest is due to the cytostatic factor that maintains a high level of MPF activity. Kinases are important in this phenomenon since p39^{mos} and MAPK play a part in the cytostatic activity whereas p34^{cdc2} is the catalytic subunit of MPF. Fertilization induces a rise in intracellular calcium leading to egg activation that can be mimicked by calcium-increasing agents such as calcium ionophore. We have performed on *Xenopus* eggs a biochemical comparison of the effects of the kinase inhibitor 6-DMAP and the calcium ionophore. Both drugs were able to induce pronucleus formation but the underlying molecular events were different. The inactivation of MAPK occurred earlier in eggs exposed to 6-DMAP. Cyclins B1 and B2 were stable and p39^{mos} was proteolysed in 6-DMAP-treated eggs while the three proteins underwent degradation in A23187-treated ones. These results suggest a differential regulation of ubiquitin-dependent proteolysis of cyclin B and p39^{mos}. © 1999

Academic Press

Key Words: *Xenopus*; metaphase II arrest; 6-DMAP; proteolysis; calcium; cell cycle.

INTRODUCTION

Full-grown stage VI *Xenopus* oocytes are arrested at prophase of the first division of meiosis. They are released from this block by progesterone stimulation which induces them to mature. This event is allowed by the activation of a cytoplasmic factor called maturation-promoting factor (MPF) which is a complex between a Ser/Thr kinase (p34^{cdc2}) and cyclin B [19]. The activation of MPF is subjected to a complex regulation; for instance, a positive feedback loop exists between Cdc2 and its activating phosphatase Cdc25 [17, 38]. Once activated, MPF induces morphological changes accompanying maturation such as germinal vesicle

breakdown (GVBD), chromosome condensation, and spindle formation [21].

However, meiosis is again arrested at metaphase II due to the cytostatic factor (CSF). The product of the protooncogene *c-mos* (p39^{mos}) [35] and mitogenic-activated protein kinase (MAPK) [15] are involved in CSF activity. It appears that metaphase arrest depends on the maintenance of MPF activity which could be stabilized by CSF. MAPK could mediate the CSF activity of p39^{mos} by preventing the cyclin degradation pathway from being turned on [1].

The interaction of the sperm with the egg membrane at fertilization leads to an increase in the intracellular calcium which mediates egg activation [3]. The calcium rise prevents polyspermy and releases the egg from metaphase II arrest. The completion of meiosis is demonstrated by the second polar body extrusion and female pronucleus formation. Then, male and female pronuclei move for karyogamy. The female centrosome that was lost during oogenesis is replaced by those of the sperm which is necessary for pronuclei migration and the later cleavages of the embryo [40]. The first mitotic cycle is 65–75 min long whereas the next 11 cycles consist of alternating S and M phases and are only 30 min long. After midblastula transition, standard mitotic cycles reoccur [32].

MPF activity rapidly declines following fertilization or treatment of eggs with Ca²⁺-increasing agents that mimic the fertilization-associated calcium rise [12]. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) has been shown to act downstream of intracellular calcium elevation [23, 27]. Cyclin degradation by the ubiquitin pathway [13, 16, 29, 30] as well as p34^{cdc2} dephosphorylation on Thr 161 [22] both inactivate MPF at the metaphase/anaphase transition. If *Xenopus* egg extracts are depleted from their mRNA and then supplemented with mRNA encoding an undestructible form of cyclin B, metaphasic spindles are formed that do not disappear even if Ca²⁺ is increased in the extract [29, 30]. Following fertilization, both CSF and MPF activities disappear but MPF activity

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: 03-20-43-40-38. E-mail: Stephane.Flament@univ-lille1.fr.



decreases before CSF and cyclin B is degraded before p39^{mos} [35, 42]. Proteolysis of p39^{mos} also occurs by the ubiquitin pathway [33].

6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) inhibits phosphorylation without affecting protein synthesis [31]. It inhibits maturation in all animal species that have been studied. When applied to *Xenopus* eggs just after FVD when the oocytes are still in the first division of meiosis, 6-DMAP induced chromosome decondensation and formation of nuclear-like structures [18]. It is also possible to activate metaphase II-arrested *Xenopus* eggs even if the drug is applied following microinjection of A23187 which prevents calcium changes [44].

The release of metaphase II arrest induced in *Xenopus* eggs by 6-DMAP has never been characterized at the molecular level and an understanding of its action might be helpful to explain the processes involved in normal egg activation. This prompted us to reinvestigate the effects of 6-DMAP on *Xenopus* egg. We compared its activity with those of the calcium ionophore A23187, which mimics fertilization. This allowed us to demonstrate that even if 6-DMAP and A23187 induced identically the formation of the pronucleus, the underlying molecular mechanisms were different. Our results show that cyclin B is stabilized whereas p39^{mos} is proteolyzed. This is discussed in terms of regulation of proteolysis of these two proteins.

MATERIALS AND METHODS

Handling of oocytes and gametes. Adult *Xenopus laevis* females were purchased from CRBM (CNRS, Montpellier France). To obtain eggs, females were primed with 500 IU of human chorionic gonadotropin (hCG). Mature oviposited eggs were dejellied in 2% cysteine in high salt Barth (HSB) medium (31.2 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 1.9 mM NaOH, and 2 mM NaHCO₃; buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES) for 15 min. They were washed three times in HSB medium before use. A23187 (Boehringer Mannheim) was used at 10 μM from a stock solution (100 mM) prepared in DMSO. 6-DMAP was diluted in HSB and used at 12 mM. This concentration was chosen since it was reported to be the most efficient; such a concentration of 6-DMAP induced egg activation in 30 min [44]. All experiments were performed at 20°C and were always performed at least in triplicate.

Cytological analysis. Eggs were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (7 μm thick) were stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes and with picroindigo carmine which reveals cytoplasmic structures. This method is fine enough to detect spindles and condensed chromosomes, even if they are not located near the plasma membrane [10].

Electrophoresis and Western blotting. Eggs (20 per batch) were homogenized in homogenization buffer [2] and centrifuged for 10 min at 10,000g (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were then incubated at 4°C for 30 min, under constant rotation with 10 μl p9^{CKShs1}-Sepharose beads. After a brief centrifugation, 1 vol of 2× Laemmli sample buffer was added to 1 vol of supernatant for p34^{cdc2}, Erk2, and p39^{mos} analysis. Beads were washed three times with ice-cold bead buffer [2] and treated with 2× Laemmli sample buffer for detection of cyclin B. Eggs proteins were denatured by heating the mixture (100°C, 5 min) and then separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In the particular case of

Erk2/MAPK immunodetection, proteins were resolved by 15% SDS-PAGE (prepared from a stock solution containing 29.82% acrylamide/0.18% bisacrylamide). Such gels allowed a good discrimination between active and inactive MAPK [5]. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell) using a semidry apparatus. Nitrocellulose sheets were incubated for 1 h in 5% lowfat milk in TBS (15 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween, pH 8). The sheets were then washed with TBS and incubated for 1 h with primary antibody. p34^{cdc2} was detected using the monoclonal antibody A17 [13] (1/1000 in TBS). MAPK was detected using the anti-Erk2 monoclonal antibody D-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (1/2500 in TBS). Cyclin B1 detection was performed using a rabbit polyclonal antibody (1/1000 in TBS). Cyclin B2 was detected using the monoclonal antibody X121 diluted at 1/1000 in TBS. The kinase p39^{mos} was detected using an antiserum raised against the carboxy-terminal part of the enzyme, diluted at 1/1000 in TBS (C-237 Santa Cruz Biotechnology). After six washes in TBS, we added for 1 h either horseradish peroxidase-coupled rabbit anti-mouse IgG antiserum (1/3000 in TBS) or goat anti-rabbit IgG antiserum (1/12000 in TBS). After six washes in TBS, horseradish peroxidase was detected with ECL (Amersham).

Protein kinase assays. The kinase activity of MPF was measured after its purification on p9^{CKShs1}-Sepharose beads by incubating 10 μl of packed-p9^{CKShs1}-sepharose beads for 10 min at 30°C with 1 mg/ml histone H1 and 15 μM [γ -³²P]ATP (4500 mCi/mmol; 10 μCi/μl), in a final volume of 30 μl [10].

The kinase activity of MAPK was measured from MPF-free homogenates (supernatant of p9^{CKShs1}-Sepharose beads). Ten microliters of supernatant was added to 15 μl of a mixture containing one volume of 2.5 mg/ml myelin basic protein (MBP, Sigma), 1 vol of 20 μM protein kinase A inhibitor (PKI, Sigma), and 1 vol of 200 μM [γ -³²P]ATP (4500 mCi/mmol; 10 μCi/μl). The reaction was performed at 30°C for 30 min.

Assays were terminated by transferring the tubes into ice. After a brief centrifugation 15 μl of supernatant was spotted on 2.5 × 3-cm pieces of Whatman P81 phosphocellulose paper. Filters were washed five times in 1% phosphoric acid, dried, and transferred in plastic scintillation vials with 1 ml scintillation fluid (Aquasafe 300 plus, Zinsser analytic). [³²P]Phosphate incorporation was measured in a LKB counter. The kinase activities were measured in triplicate and the results in cpm were expressed as percentages of the control.

RESULTS

Pronucleus Formation

In untreated eggs, a metaphasic spindle anchored in the plasma membrane was present (Figs. 1A and 1E). The first polar body was often located on an adjacent section.

After 30 min of ionophore treatment, a pronucleus was seen instead of a spindle (Fig. 1B). We observed important changes in the distribution of the pigment granules at this stage (Fig. 1B). After 1 h of ionophore treatment, the pronucleus moved from the cortical area toward the center of the egg as demonstrated by the trail of pigments (Fig. 1C). In both cases (30 and 60 min), the pronucleus was rather translucent. After 2 h, we did not find the pronucleus but red structures which looked like condensed chromosomes; they were surrounded by microtubules and pigment granules (Fig. 1D). In the 6-DMAP-treated eggs, our cytological analysis revealed the formation of a pronucleus at the same

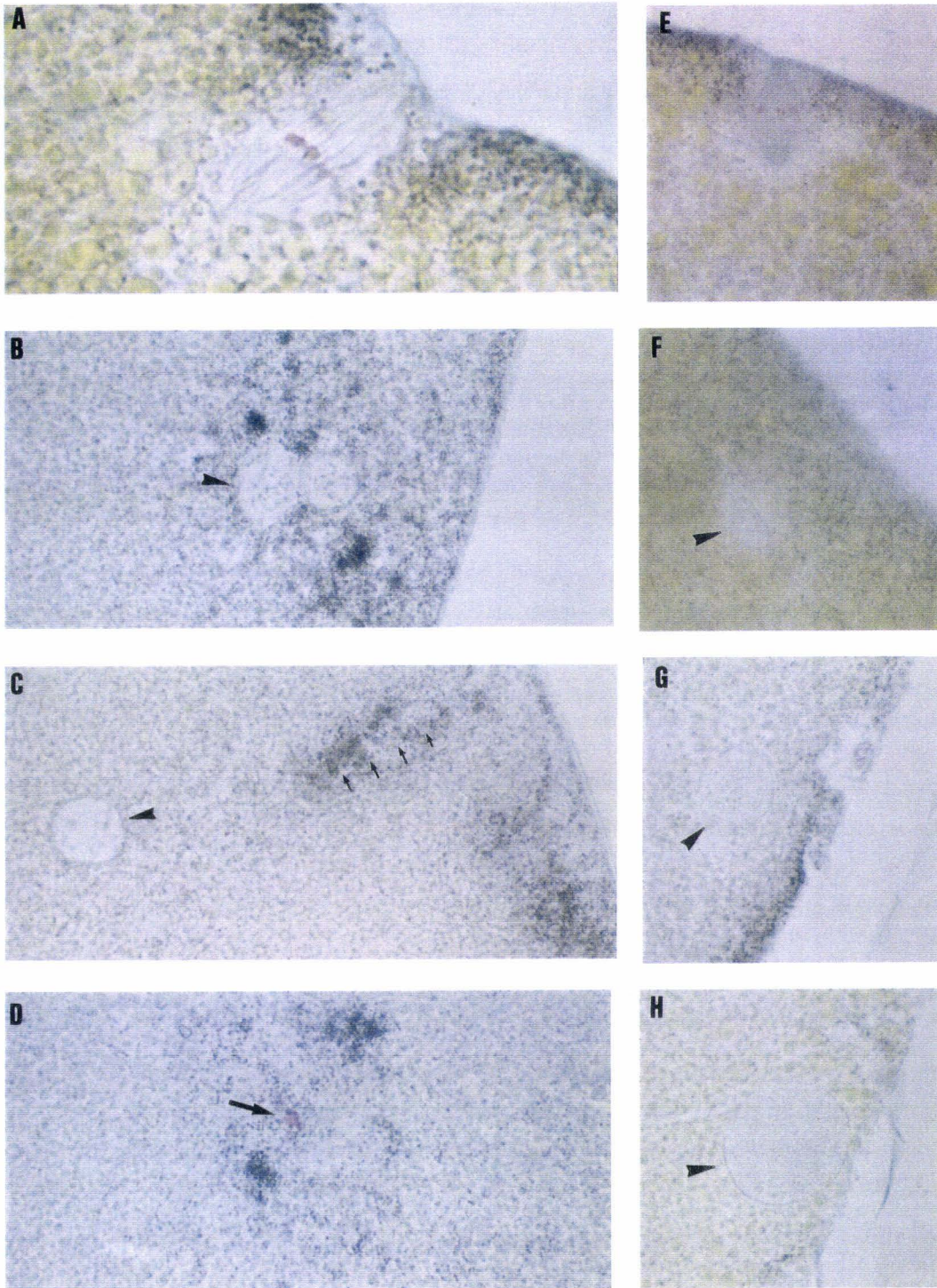


FIG. 1. Cytological changes in *Xenopus* eggs exposed to A23187 or 6-DMAP for different times ($\times 1300$; E, $\times 600$). Dejellied eggs were treated either with $10 \mu\text{M}$ A23187 (A–D) or with 12 mM 6-DMAP (E–H) and subjected to a cytological analysis as reported under Materials and Methods. (A and E) 0 h; (B and F) 30 min; (C and G) 1 h; (D and H) 2 h. A pronucleus (arrowheads) appeared simultaneously in both batches of oocytes. In the case of A23187, the pronucleus migrated in the deep cytoplasm as attested by the pigment trail (small arrows) where condensed chromosomes (arrow) were observed after 120 min. In eggs treated for 2 h with 6-DMAP, the pronucleus was still near the plasma membrane but it was enlarged.

TABLE 1
Pronucleus Formation Following A23187 and 6-DMAP Treatments

Treatment	Total	Spindle	Cortical pronucleus	Cytoplasmic pronucleus	Condensed chromosomes	No structure
A23187 10 μ M 30 min	16	0	13	0	2	1
A23187 10 μ M 60 min	17	0	6	9	1	1
A23187 10 μ M 120 min	21	1	0	0	8	12
6-DMAP 12 mM 30 min	16	0	14	0	0	2
6-DMAP 12 mM 60 min	14	0	12	0	0	2
6-DMAP 12 mM 120 min	15	0	15	0	0	0

me as in the eggs treated with A23187 (Fig. 1F). This pronucleus stayed in the cortical layer where its size increased from 15 μ m after 30 min to 50 μ m after 120 min (compare Fig. 1F with Fig. 1H). No chromatin condensation was observed in these eggs as demonstrated by the absence of red structures. The results are summarized in Table 1.

MAPK and p34^{cdc2} Analysis

We analyzed MAPK/Erk2 and p34^{cdc2} kinases which are very active in unfertilized eggs. Two forms of the Erk2 kinase may be detected on Western blots: an active phosphorylated form and an unphosphorylated slower migrating inactive form [25]. The other kinase we examined, Cdc2, may also appear as two bands. The slow migrating band is inactive and phosphorylated on three residues (Thr 14, Tyr 15, and Thr 161). The fast migrating band is either unphosphorylated and inactive or monophosphorylated (Thr 161) and active [35]. The results of this Western blot study are shown in Fig. 2. Untreated eggs contained only the slow migrating form of Erk2 and the fast migrating form of Cdc2. The two Erk2 isoforms were present after 25 min of ionophore exposure, but only the dephosphorylated form was detected after 40 min. In the case of Cdc2, the two isoforms were found after 30 min but the fast migrating form alone was present at 120 min. So, following calcium ionophore treatment, changes in Erk2 immunodetection profile occurred at the same time as those of Cdc2 which was the only one to change again after 120 min.

In eggs exposed to 6-DMAP, the changes in Erk2 detection were similar but they appeared more slowly (between 30 and 50 min). The slower migrating form of Cdc2 appeared as early as 20 min but no change in the Cdc2 immunodetection profile was observed thereafter.

6-DMAP induced earlier changes in the electrophoretic mobility of Cdc2. Then, the activities of Cdc2 and Erk2 kinases were measured using histone H1 and MBP, respectively, for 10 min following 6-DMAP or A23187 exposure. The results are reported in Fig. 3 (mean of three different experiments). In eggs treated with A23187, H1 kinase

activity decreased at a stage where changes in the immunodetection profile had not occurred: 50% after 5 min and 4% after 20 min after which the H1 kinase activity remained low. MBP kinase activity was in agreement with the changes in Erk2 detection on the immunoblots: 82.7% after 20 min and 4.6% after 40 min.

In eggs treated with 6-DMAP, H1 kinase activity decreased early, as suggested by the Western blot in Fig. 2: 11.7% after 20 min. MBP kinase activity decreased more quickly than suggested by the changes in its electrophoretic mobility: 7% after 25 min.

We also measured H1 kinase after 120 min of incubation in A23187 since we suspected from the Western blot data that there had been a reactivation of p34^{cdc2}. The activity that we measured was 47.4% of the activity found in untreated eggs. In addition, we have performed injections into immature oocytes of cytoplasm obtained from these A23187-treated eggs according to

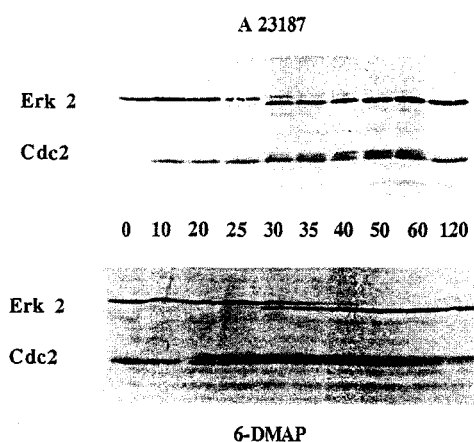


FIG. 2. Western blot study of p34^{cdc2} and Erk2 during the 2 h that follow A23187 or 6-DMAP exposure. In eggs exposed to calcium ionophore, a fast migrating form of Erk2 appeared after 25 min which was the only form to be detected after 40 min. In the case of Cdc2, a slow migrating form appeared after 30 min which disappeared at 120 min. In eggs exposed to 6-DMAP, the changes in Erk2 detection were similar but they appeared somehow later (between 30 and 60 min) whereas the slower migrating form of Cdc2 appeared earlier as soon as 20 min. No change in the Cdc2 immunodetection profile was observed thereafter.

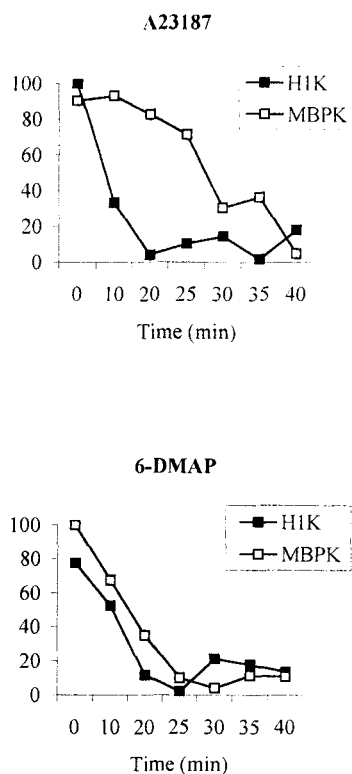


FIG. 3. H1 kinase and MBP kinase activities in metaphase II-arrested *Xenopus* oocytes following treatment with A23187 or 6-DMAP. In eggs incubated in A23187-containing medium, H1 kinase activity disappeared as soon as 20 min and then was maintained at a low level. MBP kinase activity decreased more slowly and did not increase thereafter. In eggs treated with 6-DMAP, H1 kinase and MBP kinase decreased at a similar rate.

the method previously described [10]. When these recipient oocytes were analyzed 4 h later, 29.2% ($n = 24$) of them showed GVBD. Control experiments performed with cytoplasm from untreated eggs induced GVBD in 80.3% ($n = 27$) of the oocytes. MBP kinase activity measurement after 120 min of A23187 treatment did not reveal the presence of active Erk2 kinase at this stage (8.7% of maximal activity) as suggested by the lack of electrophoretic mobility changes.

Cyclin B and p39^{mos} Analysis

We next analyzed the levels of cyclin B since its synthesis as well as its degradation can also regulate the activity of p34^{cdc2}.

First we focused on cyclin B2 (Fig. 4). Cyclin B2 can be detected as two isoforms on immunoblots: a fast migrating one, which is dephosphorylated, and a slower migrating form that is phosphorylated. Both isoforms are present in immature oocytes whereas the slow migrating form only is present after oocyte maturation [38].

Untreated eggs contained only the slow migrating

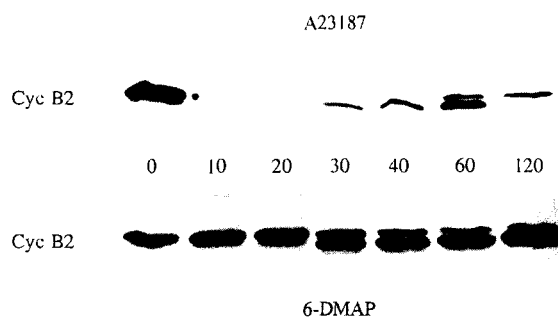


FIG. 4. Western blot analysis of cyclin B2 following incubation of *Xenopus* eggs in A23187- or 6-DMAP-containing medium. In eggs treated with A23187, cyclin B2 was not detected after 10 min but reappeared after 30 min under its faster migrating form. The upper band reappeared at 60 min and was the most important after 120 min. In eggs treated with 6-DMAP, cyclin B2 never disappeared. The lower form was detected at 30 min and the two bands were still present at 120 min.

form. The treatment of the eggs with A23187 caused the disappearance of cyclin B2 which was not detected after 10 min. Cyclin B2 reappeared after 30 min migrating at its unphosphorylated form. The phosphorylated form reappeared after 60 min and this form was by far the most abundant of the two forms after 120 min.

In eggs treated with 6-DMAP, cyclin B2 was detected up to 120 min suggesting that the protein was fairly stable in the presence of the inhibitor. The faster migrating unphosphorylated form appeared after 30 min and unlike was present in higher amounts than the phosphorylated form after 120 min.

Then we studied cyclin B1 (Fig. 5). The analysis of this other component of MPF was interesting since it has been shown that cyclin B1 is proteolyzed earlier than cyclin B2 [41]. Our polyclonal antibody detected two bands in untreated eggs. The addition of A23187 induced the disappearance of cyclin B1 which was not detected after 10 min. In 6-DMAP-treated eggs, our anti-cyclin B1 antiserum revealed that the two bands were still present after 10 min. Cyclin B1 was stable in these eggs since it was found even after 120 min (not shown).

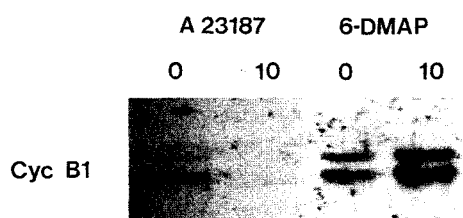


FIG. 5. Western blot analysis of cyclin B1 in *Xenopus* eggs treated with A23187 or 6-DMAP. Cyclin B1 was fully degraded after a 10 min exposure to A23187 whereas no proteolysis occurred following 6-DMAP treatment.

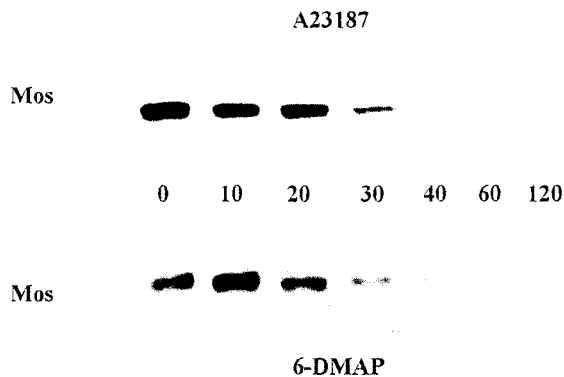


FIG. 6. Western blot analysis of p39^{mos} following incubation of *Xenopus* eggs in A23187 or 6-DMAP-containing medium. When eggs were treated with A23187 or with 6-DMAP, p39^{mos} was not detected after 40 min, and never reappeared, even after a 120 min treatment.

Therefore, the formation of the pronucleus that is induced by 6-DMAP occurs even in the presence of high levels of cyclin B.

Then we studied the levels of p39^{mos} which is synthesized during oocyte maturation in response to progesterone, plays a pivotal role in metaphase II arrest, and is proteolyzed following fertilization or parthenogenetic activation. We observed that p39^{mos} was degraded after 30 min of 6-DMAP exposure as in eggs exposed to A23187 (Fig. 6). The protein did not reappear thereafter.

DISCUSSION

In this study, we have characterized at the molecular levels the effects of 6-DMAP on *Xenopus* eggs in comparison to those of the calcium ionophore A23187 which is well known to mimic fertilization. Such a biochemical analysis had not been performed previously in *Xenopus* eggs. Our analysis showed that even if A23187 and 6-DMAP induced identically pronucleus formation, the underlying molecular events were different. Besides, our results suggest that the proteolysis of cyclin B and p39^{mos} are differentially regulated.

Pronucleus Formation

Our cytological study revealed the disappearance of spindle and condensed chromosomes and the formation of a pronucleus. The time required for this pronucleus to occur (30 min) was similar to that required with A23187. Nevertheless we observed a major difference between these treatments at later stages: the pronucleus migrated toward the center of the egg and was accompanied by a trail of pigments in the case of A23187 incubation whereas it stayed in the cortical layer when 6-DMAP was used. Such a migration occurs usually following egg fertilization and seems to be as-

sociated with entry of the sperm. Indeed the male pronucleus is the first to migrate and the female pronucleus migrates later and appears to be dependent on the male aster for its motion [36]. This absence of migration observed with 6-DMAP might be explained by the fact that the effects of this drug are mediated by kinase inhibition rather than by calcium ions, as demonstrated by experiments using EGTA to chelate calcium ions [43].

Another difference was that the pronucleus was replaced by a condensed material stained in red by our staining procedure. This red structure which looked like condensed chromosomes was only detected in eggs treated with A23187. This result was due to a rise in MPF activity since we observed an active form of p34^{cdc2} and a phosphorylated form of cyclin B2 on the immunoblots even if the H1 kinase activity was not very high at the same time. Although chromatin condensation occurred after 120 min in A23187-treated eggs, we observed neither cleavage furrows nor spindles. This is consistent with the fact that in parthenogenetically activated eggs, no cleavage occurs unless centriole containing fractions or isolated centrosomes are injected at the time of activation [39]. These structures are brought by sperm at fertilization.

The fact that chromatin did not condense in 6-DMAP-treated eggs after 120 min is correlated with the absence of p34^{cdc2} reactivation as shown by the inactive profile of p34^{cdc2} at this stage on the immunoblots. This is due to the presence of the inhibitor. Indeed, when eggs are transferred in a 6-DMAP-free medium after 6-DMAP treatment, chromatin condensation is observed too [our unpublished observations; 43]. So, p34^{cdc2} is reactivated after withdrawal of the drug. It is interesting to note that the presence of spindle is not reported in this case, as observed with A23187.

MPF and CSF Activities

Our biochemical analysis showed that even if A23187 and 6-DMAP induced identically pronucleus formation, the underlying molecular events were different. Indeed, differences were observed in the study of p34^{cdc2} and Erk2 kinases. Erk2 is a component of CSF activity which maintains a high level of MPF (p34^{cdc2}-cyclin B) activity in unfertilized eggs [14].

In A23187-treated eggs, the modification of the electrophoretic mobility of Erk2 occurred just before those of p34^{cdc2}. Previous studies with anti-phosphotyrosine antibodies revealed tyrosine phosphorylation of MAPK during the 25–30 min following fertilization or parthenogenetic activation whereas those of p34^{cdc2} occurred between 30 and 70 min [8, 27]. Our results based on mobility shift changes are in agreement with these reports. What is the signification of these changes? The

increase in electrophoretic mobility of Erk2 was associated to the inactivation of the enzyme as demonstrated by the results of MBP phosphorylation assays. However, the changes in the immunodetection profile of p34^{cdc2} occurred later than the drop in H1 kinase activity which was observed as soon as 10 min after the incubation in A23187 containing medium. This is because the tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} reflects mitotic pre-MPF formation rather than the meiotic inactivation of the kinase. Indeed, tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} has been observed during the first mitosis that begins between 60 and 75 min following fertilization and is completed after 80 min, but this event was never observed during the next 11 cell cycles that are shorter (30 min) [27].

The inactivation of MPF involves the degradation of cyclin B (regulatory subunit) and p34^{cdc2} dephosphorylation on its Thr 161 residue [21, 28, 29]. This dephosphorylation of p34^{cdc2} did not induce mobility shift under our SDS-PAGE conditions. However, H1 kinase activity measurement and cyclin B detection on Western blots demonstrate MPF inactivation. So, the results we obtained with calcium ionophore showing that MPF activity decreases before MAPK activity are consistent with the fact that the drop in MPF activity precedes those of CSF activity [41].

In 6-DMAP-treated eggs, the decrease in the H1 kinase activity was in agreement with the changes in the electrophoretic mobility of p34^{cdc2} which occurred earlier than in A23187-treated eggs. Changes in p34^{cdc2} phosphorylation at Thr 14 and Tyr.15 are due to the kinases wee1 and myt1 [6]. There is a feedback loop between p34^{cdc2} and its activating phosphatase cdc25 which acts at these two residues [16, 37]. The rephosphorylation of p34^{cdc2} observed in our study and previously reported in maturing oocytes [17] might be due to the inhibition of this feedback loop in the presence of 6-DMAP.

Surprisingly, Erk2 was dephosphorylated at the same time that in eggs incubated in A23187-containing medium. This dephosphorylation did not reflect the inactivation of the enzyme since kinase activity measurement showed an earlier inhibition probably due to a direct inhibition of the kinase by 6-DMAP. Since Erk2 is dephosphorylated approximately at the same time (around 30 min) in both A23187 and 6-DMAP-treated eggs and since we observed no difference in p39^{mos} degradation in both treatments (faint detection at 30 min and then no detection), Erk2 dephosphorylation might be simply dependent on p39^{mos} degradation. The dephosphorylation of MAPK might also be explained by the fact that 6-DMAP inhibits other kinases upstream in the cascade. Another explanation might be associated to the existence of a feedback loop between MAPK and its upregulating enzymes. For instance, MAPK has been shown to phosphorylate p39^{mos}

at Ser 3 *in vitro* and to stimulate p39^{mos} synthesis [24]. Consequently, the inhibition of MAPK could modify indirectly the activity of its upregulating kinases.

Cyclin B and p39^{mos} Proteolysis

In contrast to the ready proteolysis of cyclins B1 and B2 in eggs treated with A23187, we observed that these cyclins were not degraded in presence of 12 mM 6-DMAP, even after a 2-h incubation. Why do these eggs not carry out the proteolysis of cyclin B2?

One explanation for the absence of cyclin B degradation might be the lack of calcium release. However, we observed that A23187 addition following 1-h treatment with 12 mM 6-DMAP did not enhance cyclin B2 degradation (not shown). So, rather than the absence of calcium release, another effect of 6-DMAP seems to inhibit cyclin B proteolysis. We propose that it is due to the inhibition of MPF. Indeed, it has been reported that when 12 U μl^{-1} of MPF was added to interphase *Xenopus* egg extracts, methionine-labeled sea urchin cyclin was rapidly destroyed [7]. In the presence of 1 mM 6-DMAP in the extracts, sea urchin cyclin degradation was substantially inhibited. 6-DMAP also inhibited cyclin degradation in a cell-free system from clam embryos [23]. In addition, biochemical characterization of the anaphase-promoting complex (APC)/cyclosome (a multimeric 20S complex corresponding to an ubiquitin ligase E3) suggests that the activation of the APC may depend on multiple kinases, including Cdc2/cyclin B [19]. The mechanism by which Cdc2/cyclin B triggers activation of the APC remains unclear but seems to be regulated by Xe-p9, a protein belonging to the Suc1/Cks family, as demonstrated by experiments using *Xenopus* egg extracts [33].

Although cyclin B was not proteolysed, we observed that p39^{mos} was degraded after 30 min of 6-DMAP treatment that is similar to what occurs in A23187-treated eggs. This result was very surprising because both proteins are thought to be degraded by the ubiquitin pathway and calcium ions seem to be able to activate the proteolysis of both proteins [41]. Why p39^{mos} is proteolysed in these eggs?

Since MPF is inhibited by 6-DMAP treatment and that p39^{mos} is proteolyzed in this case, one might propose that active p34^{cdc2}/cyclin B could prevent p39^{mos} proteolysis. Another explanation might be that the inhibition by 6-DMAP of a kinase that phosphorylates p39^{mos} could allow the dephosphorylation of p39^{mos} by an appropriate phosphatase. Indeed, it has been demonstrated that degradation of p39^{mos} required its dephosphorylation at Ser 3 [32]. However, the proteolysis of p39^{mos}, even in a dephosphorylated state, can occur only if the ubiquitin degradation machinery has been activated. The activation of APC in 6-DMAP-treated eggs might be obtained by the inhibition of a kinase

that could allow the dephosphorylation by an appropriate phosphatase of an inhibitor of APC leading to the activation of the degradation machinery [40]. This explanation is in agreement with the fact that inhibitors of tyrosine phosphatases block calcium-induced activation of *Xenopus* eggs [4].

Differences exist between cyclin B and p39^{mos} proteolysis. Cyclin B degradation requires a destruction box which is necessary for the ubiquitination of cyclin B by the APC [12, 19]. p39^{mos} proteolysis is mediated by the N-terminal Pro2-dependent ubiquitin pathway [32] but the ubiquitin protein ligase has not been yet identified. The involvement of an ubiquitin ligase distinct from APC and differently regulated could explain our results showing a differential proteolysis of cyclin B and p39^{mos}.

One might also propose that in *Xenopus* eggs, 6-DMAP induces an increase in intracellular calcium as has been shown in oocytes from rhesus monkeys [42]. This calcium increase might be sufficient to trigger p39^{mos} degradation whereas MPF inhibition could block cyclin B proteolysis.

In conclusion, our study shows that even if A23187 and 6-DMAP induced identically pronucleus formation, the underlying molecular events were different. Our results suggest that the proteolysis of cyclin B and p39^{mos} is differentially regulated. Experiments are currently being performed to elucidate the reason for such discrepancy in the degradation of p39^{mos} and cyclin B.

We thank Dr. Laurent Meijer for helping us in kinase activity measurement and cyclin B immunodetection as well as Dr. Franck Chesnel for his suggestions about ERK 2 detection. We are also grateful to both of them and to doctor Eve Damiens for their helpful comments on an early manuscript. These studies were supported by grants from the French "Ministère de l'Éducation Nationale" (DRED, A No. 1033), the "Association pour la Recherche sur le Cancer," the "Région Nord-Pas-de-Calais" (Centre de Biologie Cellulaire), and the EDER.

REFERENCES

- Abrieu, A., Lorca, T., Labbé, J.-C., Morin, N., Keyse, S., and Dorée, M. (1996). MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* **109**, 239–246.
- Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A. C., Lew, J., and Wang, J. H. (1994). Purification of a 15 kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**(6), 13279–13288.
- Berger, F. (1992). Mechanisms of initiation and propagation of the calcium wave during fertilization in deuterostomes. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 245–262.
- Bodart, J.-F., Béchar, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.-P., and Flament, S. (1999). Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **457**(2), 175–178.
- Chesnel, F., Bonnac, G., Tardivel, A., and Boujard, D. (1997). Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **188**, 122–133.
- Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 877–882.
- Félix, M.-A., Labbé, J.-C., Dorée, M., Hunt, T., and Karsenti, E. (1990). Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature* **346**, 379–382.
- Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C., and Martin, G. S. (1991). Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* **11**(4), 1965–1971.
- Flament, S., Browaeys, E., Rodeau, J. L., Bertout, M., and Vilain, J. P. (1996). *Xenopus* oocyte maturation: Cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 471–476.
- Flament, S., Bodart, J.-F., Browaeys, E., Bertout, M., Rousseau, A., Gannon, J., and Vilain, J.-P. (1997). Procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor. *Zygote* **5**, 11–19.
- Gerhart, J., Wu, M., and Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**, 1247–1255.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138.
- Goodger, N., Gannon, J., Hunt, T., and Morgan, P. R. (1996). On the abundance and localization of p34cdc2 in the cells of normal, hyperplastic and malignant human lymphoid and epithelial tissues. *J. Pathol.* **178**, 422–428.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., and Maller, J. L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* **262**, 1262–1265.
- Hershko, A. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *J. Biol. Chem.* **266**(25), 16376–16379.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12**, 53–63.
- Jessus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W., and Ozon, R. (1991). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte: Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* **111**, 813–820.
- King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563–571.
- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M. W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279–288.
- Kishimoto, T. (1994). Cell reproduction: Induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 185–191.
- Lorca, T., Labbé, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.-P., Cavadore, J.-C., Le Bouffant, F., and Dorée, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J.* **11**(7), 2381–2390.
- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J.-C., Méry, J., Means, A., and Dorée, M. (1993). Calmodulin-dependent kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**, 270–273.

3. Luca, F., and Ruderman, J. (1989). Control of programmed cyclin destruction in a cell-free system. *J. Cell Biol.* **109**, 1895-1909.
4. Matten, W. T., Copeland, T. D., Ahn, N. G., and Vande Woude, G. F. (1996). Positive feedback between MAP kinase and mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev. Biol.* **179**, 485-492.
5. Mordret, G. (1993). MAP kinase kinase: A node connecting multiple pathways. *Biol. Cell* **79**, 193-207.
6. Morin, N., Abrieu, A., Lorca, T., Martin, F., and Dorée, M. (1994). The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs. *EMBO J.* **13**(18), 4343-4352.
7. Murakami, M., and Vande Woude, G. F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*: Regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *mos*. *Development* **125**, 237-248.
8. Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-280.
9. Murray, A. W., Solomon, M. J., and Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-286.
0. Néant, I., and Guerrier, P. (1988). 6-Dimethylaminopurine-blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* **176**(1), 68-79.
1. Newport, J., and Kirschner, M. W. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* **30**(3), 675-686.
2. Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y., and Sagata, N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro²)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: Possible significance of natural selection for Pro² in Mos. *EMBO J.* **12**(10), 4021-4027.
3. Patra, D., and Dunphy, W. G. (1998). *Xe-p9*, a *Xenopus* *Suc1/Cks* protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* **12**, 2549-2559.
34. Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., and Ikawa, Y. (1989). The *c-mos* proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrates eggs. *Nature* **342**, 512-518.
35. Solomon, M. J. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 180-186.
36. Stewart-Savage, J., and Grey, R. D. (1982). The temporal and spatial relationships between cortical contraction, sperm trail formation, and pronuclear migration in fertilized *Xenopus* eggs. *Wilhelm Roux's Arch.* **191**, 241-245.
37. Strausfeld, U. P., Fernandez, A., Capony, J.-P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbé, J.-C., and Lamb, N. J. (1994). Activation of p34^{cdc2} protein kinase by microinjection of human Cdc25C into mammalian cells: Requirement for prior phosphorylation of Cdc25C by p34^{cdc2} on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**(8), 5989-6000.
38. Taieb, F., Thibier, C., and Jessus, C. (1997). On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **48**, 397-411.
39. Tournier, F., Joly, A., and Bornens, M. (1994). Parthenogenetic production of partial blastulas in *Xenopus*. *C. R. Acad. Sci.* **317**, 405-410.
40. Vorlauffer, E., and Peters, J. M. (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1817-1831.
41. Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y., and Sagata, N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **352**, 247-248.
42. Wu, G. J., Simerly, C., Zoran, S. S., Funte, L. R., and Schatten, G. (1996). Microtubule and chromatin dynamics during fertilization and early development in rhesus monkeys, and regulation by intracellular calcium ions. *Biol. Reprod.* **55**, 260-270.
43. Zhang, S. C., and Masui, Y. (1992). Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J. Exp. Zool.* **263**, 317-329.

Received May 25, 1999

Revised version received August 20, 1999

Publication 3

c-Mos proteolysis is independent of the rise in intracellular calcium activity induced by 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) in metaphase II-arrested *Xenopus laevis* oocytes.

Article en préparation.

Introduction au travail.

La 6-DMAP est capable de lever le blocage métaphasique des ovocytes de Xénope (Zhang et Masui, 1992 ; Bodart et coll., 1999b). Cette activation se caractérise par la formation d'un pronucleus à la membrane plasmique, la rephosphorylation de cdc2 et la déphosphorylation partielle de la cycline B2. L'événement le plus surprenant de cette levée de blocage métaphasique est la dégradation de c-mos, qui se produit en l'absence de dégradation des cyclines B.

Par quel mécanisme la 6-DMAP est-elle capable de provoquer la protéolyse de c-mos? Parmi toutes les explications plausibles, nous avons d'abord testé l'hypothèse d'une libération de calcium induite par la 6-DMAP. Il a été démontré que la 6-DMAP induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les ovocytes du singe Rhésus (Wu et coll., 1996). Si une telle augmentation de la concentration de calcium se produit dans les ovocytes de Xénope lorsqu'ils sont traités par la 6-DMAP, elle pourrait activer des protéases dépendantes du calcium et ainsi induire la dégradation de c-mos. En effet, certains auteurs soutiennent l'hypothèse d'un rôle crucial de ces protéases dépendantes du calcium dans la progression du cycle cellulaire (Santella, 1998).

Résultats et Discussion.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré les variations éventuelles du taux de calcium en utilisant une sonde fluorescente, le Fura-2. Lorsque la 6-DMAP est appliquée sur des ovocytes de Xénope bloqués en métaphase II et préalablement injectés de Fura-2, elle provoque une augmentation transitoire du taux de calcium : elle commence $22,7 \pm 2,1$ minutes après ajout de l'inhibiteur de protéines-kinases et elle est maximale après $32,3 \pm 1,8$ minutes. Nous n'avons pas déterminé l'origine du signal calcique, mais cette augmentation n'est pas dépendante du calcium présent dans le milieu externe dans la mesure où elle se produit même en milieu dépourvu de calcium.

L'augmentation transitoire de calcium induite par la 6-DMAP n'est pas immédiate. Elle se produit au même moment que la dégradation de c-mos et suggère l'implication d'une protéase calcium-dépendante dans ce phénomène. Afin de déterminer si cette augmentation transitoire de calcium induite par la 6-DMAP est suffisante pour déclencher la dégradation de c-mos, nous avons utilisé un chélateur calcique, le BAPTA. Nous avons déterminé qu'une concentration intraovocytaire de BAPTA de 2,5 mM inhibe totalement la libération de

calcium induite par la 6-DMAP. Dans ces conditions, la formation du pronucleus n'est pas inhibée. En outre, la présence du chélateur calcique n'inhibe pas la déphosphorylation de la cycline B2 ni la protéolyse de c-mos induites par la 6-DMAP.

La capacité de la 6-DMAP à induire la protéolyse de c-mos a également été étudiée à un stade où les ovocytes ne sont pas sensibles aux effets du calcium. En effet, appliqué au stade de la rupture de l'enveloppe, l'ionophore calcique A23187 n'affecte pas la progression de la méiose, ni la stabilité de la cycline B ou de c-mos. Par contre, il avait déjà été rapporté que la 6-DMAP était capable d'induire la formation de structures de type nucléaire dans le cytoplasme au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire (Jesus et coll., 1991). Nous avons mis en évidence qu'à ce stade, la 6-DMAP induit également la déphosphorylation de la cycline B2, et la protéolyse de c-mos.

Nos résultats démontrent que la 6-DMAP est capable de provoquer une libération intracellulaire de calcium dans les ovocytes de Xénope. Cette augmentation de calcium est différente de celle qui a été rapportée dans les ovocytes de singe Rhésus (Wu et coll., 1996), puisqu'elle apparaît plus tardivement et qu'elle est transitoire dans les ovocytes de Xénope. Les protéines-kinases sont donc impliquées dans la régulation de la libération des ions calcium. Plus récemment, l'utilisation de la roscovitine, inhibiteur de p34^{cdc2}, dans les ovocytes de souris, a révélé que l'inhibition des cdk entraîne une inhibition des oscillations calciques induites par la fécondation (Deng et Shen, 2000).

La libération de calcium que nous avons démontrée n'est cependant pas impliquée dans la protéolyse de c-mos induite par la 6-DMAP. En effet, cette protéolyse peut se produire non seulement en présence de BAPTA, mais aussi au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire, qui est insensible à l'ionophore calcique. Toutefois, l'absence de c-mos observée à ce stade en présence de 6-DMAP pourrait être due à d'autres mécanismes que la protéolyse. La 6-DMAP pourrait également agir sur la synthèse de c-mos et ainsi inhiber l'accumulation de la protéine. La protéolyse de c-mos induite par la 6-DMAP dans les ovocytes bloqués en métaphase II est donc due à l'inhibition d'une protéine kinase impliquée dans la stabilisation de c-mos. La protéolyse de c-mos est effectivement inhibée par la phosphorylation de la sérine 3, qui empêche la reconnaissance de c-mos par l'ubiquitine-ligase (Nishizawa et coll., 1993). MAPK est capable de phosphoryler ce site *in vitro* (Matten et coll., 1996). Toutefois, nous ne pensons pas que MAPK soit impliquée dans le maintien de la phosphorylation de c-mos à la métaphase II. En effet, dans les ovocytes bloqués en métaphase II traités par la 6-DMAP, l'activité MAPK décroît rapidement alors que c-mos demeure stable jusqu'à 30-40

minutes après addition de 6-DMAP (Bodart et coll., 1999b). p34^{cdc2} pourrait être la kinase impliquée dans la stabilisation de c-mos. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication de p34^{cdc2} dans la régulation de c-mos. Par exemple, l'injection d'un dominant négatif de p34^{cdc2} inhibe l'accumulation de c-mos dans les ovocytes de Xénope, mais n'affecte pas la synthèse de la protéine (Nebreda et coll., 1995). De même, c-mos n'est pas détecté dans les ovocytes de Xénope stimulés par la progestérone après injection de p21^{cip1}, un inhibiteur de cdk1 et cdk2 (Franck-Vaillant et coll., 1999). L'absence d'activité MPF entraînant probablement la synthèse d'une forme instable de c-mos.

L'hypothèse d'une stabilisation de c-mos par p34^{cdc2} est cohérente avec l'observation que le MPF est inactivé avant le CSF (Watanabe et coll., 1991). En effet, l'inactivation du MPF par protéolyse de la cycline B entraînerait la déphosphorylation puis l'inactivation de c-mos.

c-Mos proteolysis is independent of the rise in intracellular calcium induced by 6-dimethylaminopurine in metaphase II-arrested *Xenopus* oocytes.

Bodart J.-F.¹, Rodeau J.-L.², Vilain J.-P.¹ and Flament S.¹.

1 - Laboratoire de Biologie du Développement, "*Régulation Ionique et Moléculaire du Cycle Cellulaire*", UPRES EA 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

2 - Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, CNRS, FRE 2180, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

Abstract : The kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) releases matured *Xenopus* oocytes from their metaphase II block. This is characterized by c-Mos proteolysis without degradation of cyclin B. We hypothesized that 6-DMAP induced an increase in intracellular calcium. Using the calcium-sensitive fluorescent dye Fura-2, we observed a systematic increase in intracellular calcium following 6-DMAP application. In matured oocytes previously microinjected with the calcium chelator BAPTA, no calcium changes occurred after 6-DMAP addition, however c-Mos was still proteolysed. In oocytes at the GVBD stage, c-Mos proteolysis occurred in response to 6-DMAP but not to calcium ionophore treatment. We suggest that c-Mos proteolysis is rather controlled by a phosphorylation-dependent event.

Key words : *Xenopus*, metaphase II arrest, c-Mos, calcium, proteolysis, 6-DMAP.

Corresponding author :

Stéphane FLAMENT,
Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033,
Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.
Tel : 33 3 20 43 68 67 , Fax : 33 3 20 43 40 38.
E-mail : stephane.flament@univ-lille1.fr.

1. Introduction.

The c-mos proto-oncogene encodes for a Ser/Thr protein kinase, which can induce oncogenic transformation of somatic cells when ectopically expressed. c-Mos is also essential for progesterone-induced *Xenopus laevis* oocyte maturation. Indeed, oocytes injected with c-Mos antisense nucleotide fail to undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) in response to the hormone [1], whereas microinjection of c-Mos mRNA promotes oocyte maturation in the absence of progesterone [2]. Moreover, microinjection of purified recombinant c-Mos protein is sufficient to trigger germinal vesicle breakdown (GVBD), even in the presence of cycloheximide [3]. c-Mos is regulated by phosphorylation, and several sites of phosphorylation have been identified to play important role in its activity and stabilization [4]. Ser-3 is the major site of phosphorylation *in vivo*, although it does not seem to be essential for c-Mos-induced maturation [5]. c-Mos can directly phosphorylate and activate MEK1, an immediate upstream activator of MAPK [6]. During maturation, the maturation promoting factor (MPF), a heterodimer made up of a catalytic subunit, cdk1, and a regulatory subunit, cyclin B, is activated simultaneously to MAPK [7]. MPF phosphorylates several substrates and induces the morphological changes accompanying maturation, such as GVBD, chromosomes condensation and spindle formation [8].

c-Mos is also the essential component of CSF, the cytostatic factor that arrests meiosis at metaphase II [9]. CSF activity could prevent MPF inactivation which is necessary for M-Phase exit. Oocytes of mice homozygously deleted for c-Mos fail to arrest at metaphase II and undergo parthenogenetic activation [10]. MAPK and p90^{rsk} have also been shown to be implicated in CSF arrest [11, 12]. MAPK could prevent the cyclin degradation pathway from being turned on, hereby leading to a high level of MPF activity in the cell [13]. Implication of Cdk2 in CSF activity is still discussed [14, 15].

At fertilization, the interaction of the sperm with the egg membrane leads to an increase in the intracellular concentration of calcium, $[Ca^{2+}]_i$. This event, which can be mimicked by the calcium ionophore A23187, releases the egg from metaphase II arrest. The calcium/calmodulin protein kinase II has been shown to act downstream the intracellular calcium elevation [16]. The completion of meiosis is demonstrated by the extrusion of the second polar body and by pronucleus formation. Following

fertilization or parthenogenetic activation, both CSF and MPF activities disappear. Cyclin B proteolysis by the ubiquitin pathway [17], as well as dephosphorylation of Cdk1 on residue T161 [18], both inactivate MPF at the metaphase-anaphase transition. CSF activity drops later, due to c-Mos proteolysis [19] which is ruled by the ubiquitin pathway [20]. Involvement of the calcium-sensitive proteases calpains in c-Mos proteolysis had been suggested [21], but was discussed [22].

6-dimethylaminopurine (6-DMAP) inhibits phosphorylation without affecting protein synthesis [23]. It inhibits maturation in all animal species studied. 6-DMAP was also shown to induce parthenogenetic activation of *Xenopus* eggs [24]. In a study aiming at characterizing the 6-DMAP-induced activation, we observed that c-Mos was proteolysed while cyclins B1 and B2 were stable in 6-DMAP-treated eggs [25]. The absence of cyclin B proteolysis might be due to MPF inhibition [26], but the reason for c-Mos proteolysis is unclear. It has been reported that 6-DMAP was able to induce a rise in $[Ca^{2+}]_i$ in Rhesus monkey oocytes [27]. Therefore, we hypothesized that a similar effect of 6-DMAP could trigger c-Mos proteolysis in *Xenopus* eggs.

2. Materials and methods.

Handling of oocytes.

Adult *Xenopus laevis* females were purchased from C.R.B.M. (C.N.R.S, Montpellier France). Full-grown stage VI oocytes (5) were obtained as previously described (9) and used in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5/NaOH). Progesterone was used overnight at 10 μ M to obtain metaphase II-arrested oocytes. For experiments performed at GVBD stage, oocytes were stimulated with the hormone in the morning and were observed to determine GVBD time. This stage was identified by the occurrence of the first changes in pigment granules distribution. A23187 (Boehringer Mannheim) was used at 10 μ M from a stock solution (100 mM) prepared in DMSO. 6-DMAP and 6-AP (Sigma) were diluted in ND96, and used at 12 mM. (Zhang et Masui, Bodart et al. 1999). All experiments were performed at 20°C and at least in triplicate.

Microinjections and calcium measurements.

Microinjections by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo) were performed in a Calcium-Limited Medium in order to prevent activation due to pricking [36]. After injection of either Fura-2 potassium salt (100 μ M final; Molecular Probes) or a mix between BAPTA and Fura-2 (final concentrations 2.5 mM and 125 μ M respectively), the oocytes were allowed to heal 15 min in this medium, and then incubated for 45 min in ND96 before calcium measurements.

Fluorescence emitted above 520 nm from the vegetal pole of a single oocyte was measured every 3 sec with a 20 \times UV objective on an inverted microscope (Zeiss Axiovert 35) using a dual excitation microfluorometry system [37]. The ratio of fluorescence excited alternately at 350 and 380 nm was calculated after subtraction of the corresponding background (always < 10% of signal) determined on oocytes not injected with Fura-2. A cytological analysis was subsequently performed on each oocyte (see below).

For western blot analysis (see below), matured oocytes were microinjected with the same mix of BAPTA and Fura-2 using the protocole described herefore.

Cytological analysis.

Oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, sectioned and stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes, and with picroindigo carmine which reveals cytoplasmic structures (9).

Electrophoresis and Western blotting.

Oocytes (20 per batch) were homogenized in homogenization buffer (2) and centrifuged for 10 min at 10000 g (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were After this brief centrifugation, one volume of 2x Laemmli sample buffer was added to one volume of supernatant. Proteins were denatured by heating the mixture (100°C - 5 min) and then separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Separated proteins were subjected to western blot analysis as previously reported (9). p34^{cdc2} was detected using the monoclonal antibody A17 (11) (1/1000 in TBS). Cyclin B2 was detected using the monoclonal antibody X121 diluted at 1/1000 in TBS. p39^{mos} was detected using the rabbit polyclonal antibody C-237 (SantaCruz biotechnology, Heidelberg, Germany), 1/1000 in TBS.

2. Results and discussion.

In order to test this, we have used the calcium indicator Fura-2 to monitor the variations of $[Ca^{2+}]_i$ following 6-DMAP application. When metaphase II-arrested oocytes were treated with 6-DMAP, they exhibited a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ after about 30 minutes (Fig. 1, upper trace). The relative rise in the Fura-2 fluorescence ratio was $76 \pm 14 \%$ (\pm SEM, $n = 14$), and was not significantly different in the presence ($n = 11$) or in the absence of external calcium ($n = 3$). It may therefore result from the release of calcium from intracellular stores. A pronucleus located near the plasma membrane or in the sub-cortical layer was found in these oocytes (92.8 %, $n = 14$). As a control, an inactive analogue of 6-DMAP, 6-aminopurine (6-AP), did not trigger any change in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1, lower trace), nor pronucleus formation (not shown).

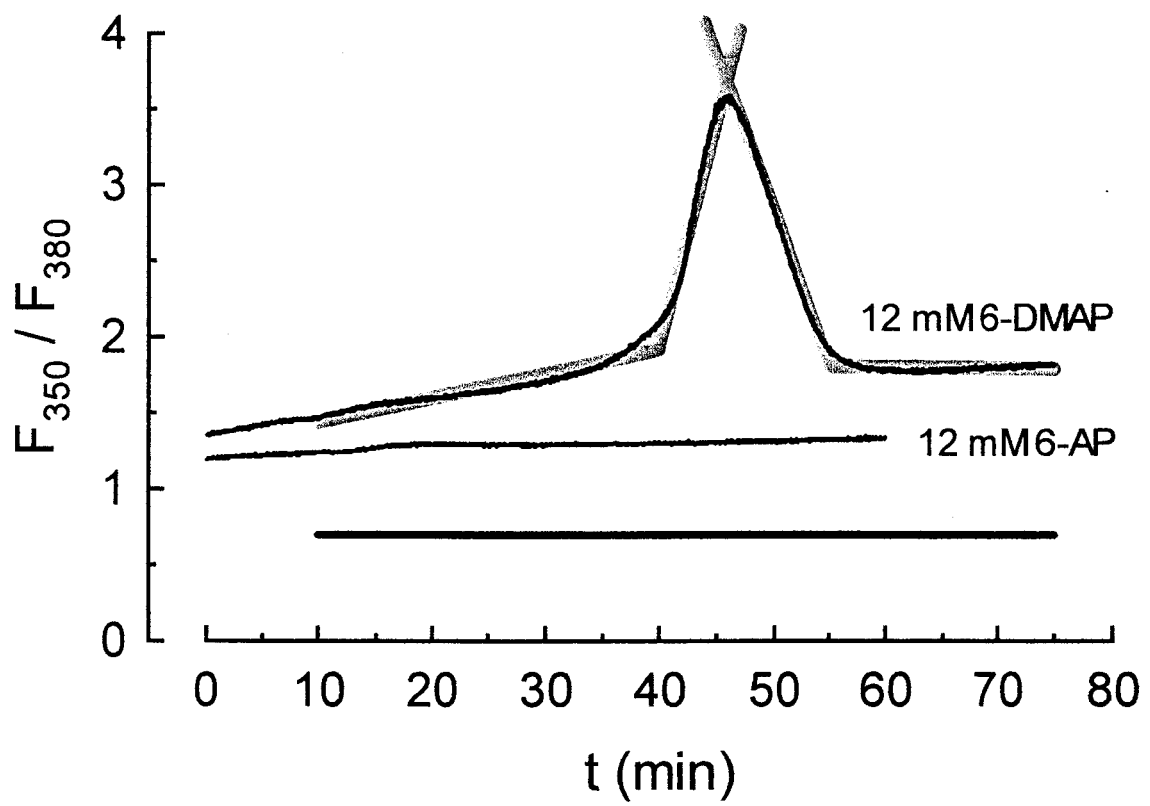
The increase in $[Ca^{2+}]_i$ elicited by 6-DMAP occurred at the same time as the beginning of c-Mos proteolysis [25], suggesting a triggered proteolysis. To determine if this rise of $[Ca^{2+}]_i$ was really implicated in c-Mos degradation, the calcium chelator

BAPTA was microinjected into matured oocytes before 6-DMAP addition in the medium. A concentration of 2.5 mM BAPTA was sufficient to inhibit the rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by 6-DMAP (Fig. 2A). Oocytes subjected to a cytological examination always showed a pronucleus near the plasma membrane ($n = 3$). However, BAPTA inhibited neither pronucleus formation, nor c-Mos degradation and cyclin B2 dephosphorylation induced by 6-DMAP (Fig. 2B). 87.5 % of these oocytes exhibited a pronucleus ($n = 7$).

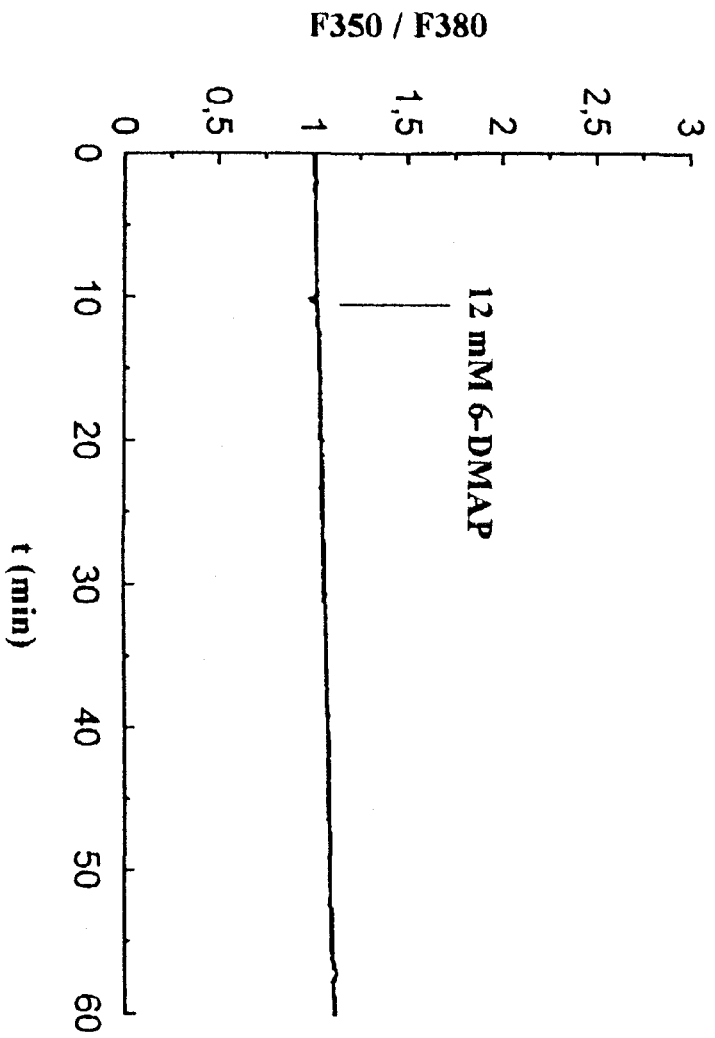
Finally, the effects of 6-DMAP on c-Mos proteolysis were analyzed at the GVBD stage. This stage was chosen because it is insensitive to calcium activation, at least for criteria such as vitelline membrane elevation or cortical granule exocytosis [28]. Actually, our cytological analysis (Fig. 3A) show that application of the calcium ionophore A23187 for one hour at the GVBD stage did not affect progression of meiosis in *Xenopus* oocytes. Application of 6-DMAP for one hour just after GVBD induced the formation of nuclear-like structures in the cytoplasm, in agreement with previous observations [29]. Western blot analysis of cdk1, cyclin B2 and c-Mos (Fig. 3B) revealed that exposure to A23187 during one hour did not affect these proteins. On another hand, 6-DMAP was able to induce rephosphorylation of cdk1 and dephosphorylation of cyclin B2, probably via the inhibition of a feedback loop between cdk1 and its up-regulating enzymes cdc25 or wee1 [30 ; 31]. Moreover, in the presence of 12 mM 6-DMAP, our antibodies failed to detect c-Mos after a 1 hour treatment.

To conclude, our results show for the first time that 6-DMAP triggers an increase of intracellular calcium in *Xenopus* eggs. This phenomenon is therefore not restricted to *Rhesus* monkey oocytes [27] and might be a universal effect of 6-DMAP on eggs. However we demonstrate that this rise in $[Ca^{2+}]_i$ is not involved in c-Mos proteolysis. Indeed, the 6-DMAP-induced degradation of the protein occurred not only in BAPTA-injected eggs, where no changes in calcium were observed, but also in oocytes at the GVBD stage, which were insensitive to the calcium ionophore A23187. This finding is in agreement with a previous report showing at the cytological level that the effects of 6-DMAP on *Xenopus* eggs were unaffected by calcium ions chelation [24]. We suggest that c-Mos proteolysis induced *in vivo* by 6-DMAP only results from the inhibition of a protein kinase activity involved in

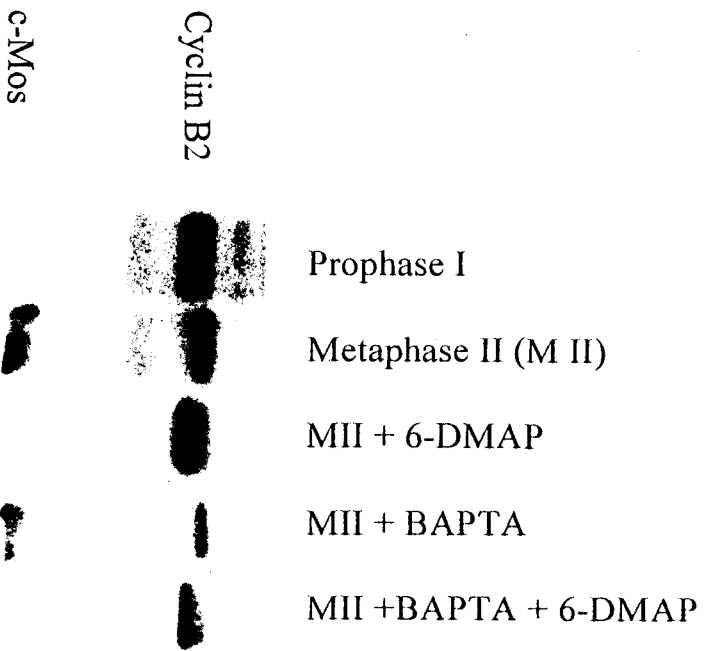
c-Mos stabilization and thus in CSF maintenance. Phosphorylation on Ser-3 increases c-Mos stability by inhibiting its recognition by the ubiquitin-degradation pathway [20]. Ser-16 is also thought to play an important role in c-Mos regulation and may prevent its proteolysis [32]. Cdk1 might be a good candidate for c-Mos stabilization and the maintenance of CSF activity during metaphase II arrest in *Xenopus* oocytes. Indeed, microinjection of oocytes with a kinase-minus cdk1 protein blocks c-Mos accumulation, but it does not affect the rate of c-Mos synthesis following progesterone addition [33]. Recently, it has been reported that c-Mos could not be detected following progesterone treatment of oocytes where cdk1 was inhibited by p21^{cip1} microinjection [34]. These results, interpreted as an inhibition of c-Mos synthesis, might also be due to the synthesis of an unstable form of c-Mos related to the inhibition of cdk1. Such an hypothesis is in agreement with the fact that, at fertilization, MPF decreases before CSF activity and that cyclin B proteolysis occurs earlier than c-Mos degradation [19].



A



B



Figures legends

Figure 1. 6-DMAP induces a calcium increase in matured *Xenopus* oocytes.

Oocytes treated with 12 mM 6-DMAP exhibited a transitory increase in calcium (*upper trace*, representative of 14 oocytes from 3 animals). 12 mM 6-aminopurine (6-AP), an inactive analogue of 6-DMAP, did not trigger any change in calcium (*lower trace*, $n = 4$). *Black horizontal line*: extent of 6-DMAP application. *Thick gray lines* show the non-linear fitting approach used to determine the critical times for the rise and fall of $[Ca^{2+}]_i$. As an average ($n = 14$, \pm SEM) the calcium rise started after 22.7 ± 2.1 min, peaked at 32.3 ± 1.8 min, and lasted 18.6 ± 1.5 min.

Figure 2. Chelation of calcium ions does not prevent c-Mos proteolysis in 6-DMAP-treated oocytes.

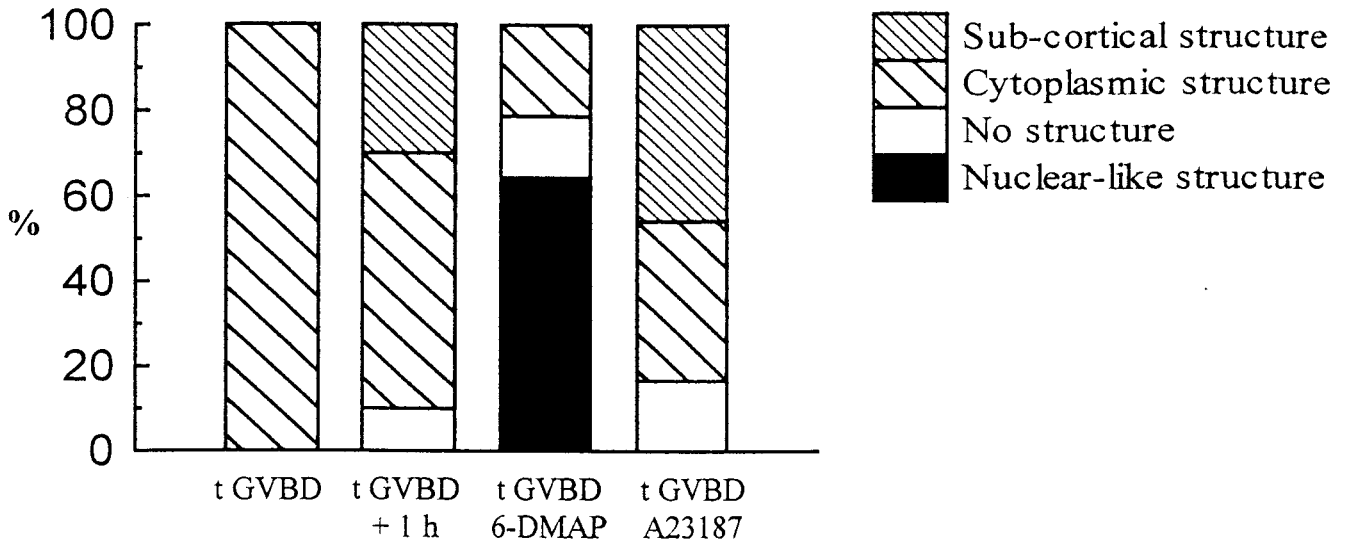
A. Calcium measurement.

Matured oocytes were microinjected with a mix of the calcium chelator BAPTA and of Fura-2. After 1 h recovery, microinjected oocytes showing activation were discarded and unactivated oocytes were treated with 12 mM 6-DMAP. 2.5 mM BAPTA inhibited the rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by 6-DMAP ($n = 5$).

B. Western blot analysis.

In immature oocytes (*Prophase I*), cyclin B2 was detected as two isoforms, whereas c-Mos was not present. In matured oocytes (*Metaphase II*), only the upper phosphorylated form of cyclin B2 was present and c-Mos was synthesized. In matured oocytes homogenized 1 h after 6-DMAP treatment, cyclin B2 dephosphorylation and c-Mos proteolysis were observed. Oocytes microinjected with 2.5 mM BAPTA showed an immunodetection profile similar to those of metaphase II-arrested oocytes, even two hours after microinjection. The effects of 6-DMAP were not prevented by the presence of BAPTA.

A



B

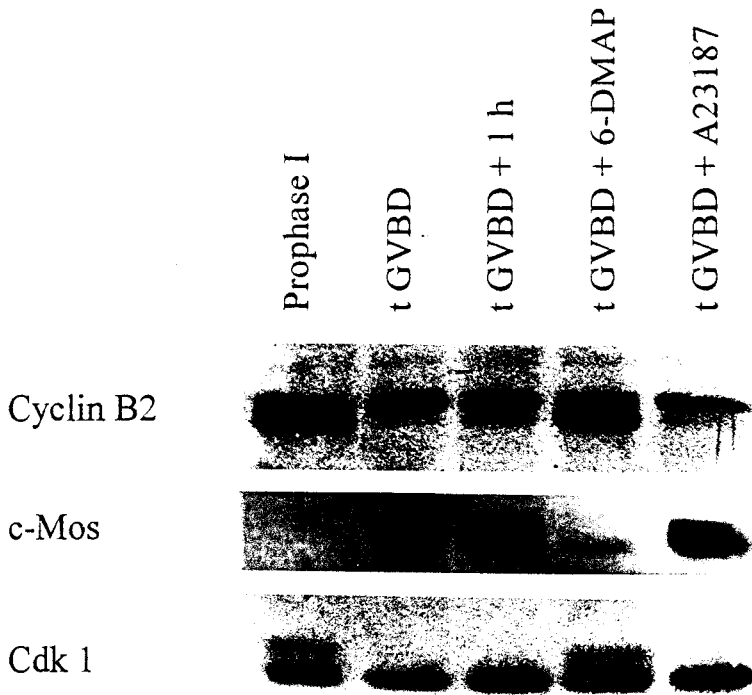


Figure 3. Effects of 6-DMAP and A23187 on *Xenopus* oocytes at GVBD stage.

A. Cytological Analysis. Maturation was stimulated by 10 μ M progesterone addition. The first pigment rearrangement at the animal pole revealed the GVBD stage. GVBD was confirmed on histological section : germinal vesicle was disrupted ; condensed chromosomes and microtubules were found in cytoplasm (n = 10).

Oocytes at GVBD stage were incubated for 1 h with 10 μ M A23187 in ND96. Histological sections showed chromosomes and microtubules in the sub-cortical layer (45.8%) or in the cytoplasm (37.5%). These A23187-treated oocytes (n = 24) were not different from untreated controls (n = 10). Addition of 12 mM 6-DMAP for 1 h at GVBD stage induced formation of nuclear-like structures in 64.3% of the oocytes (n=14).

B. Western blot analysis. In immature *Xenopus* oocytes (*Prophase I*), cdk1 was detected as two isoforms, the upper one corresponding to its inactive phosphorylated-form; cyclin B2 was also detected as two isoforms, phosphorylated and dephosphorylated; c-Mos was not detected since its synthesis occurs during maturation. Oocytes at GVBD stage (*t GVBD*) showed the dephosphorylated active-form of cdk1, the phosphorylated isoform of cyclin B2 and c-Mos. These three proteins were not affected by application of 10 μ M A23187 for 1 h (compare *t GVBD + 1 h* and *t GVBD A23187*). However, 12 mM 6-DMAP applied at GVBD stage (*t GVBD 6-DMAP*) triggered cdk1 rephosphorylation, cyclin B2 dephosphorylation and c-Mos disappearance.

Acknowledgements.

Measurements of calcium were permitted by a grant of the "Société de Secours des Amis des Sciences". Jean-François Bodart is now recipient of a grant from the "Fondation pour la Recherche Médicale". These studies were supported by grants from the French "Ministère de l'Education Nationale" (DRED, EA n°1033) and the "Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer".

References

- [1] Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. and Vande Woude, G.F. (1988). *Nature* **335**, 519-525.
- [2] Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G.F., and Ikawa, Y. (1989). *Nature* **342**, 512-518.
- [3] Yew, N., Mellini, M.L. and Vande Woude, G.F. (1992). *Nature* **355**, 649-652.
- [4] Singh B. and Arlinghaus R.B. (1997). *Progress in Cell Cycle* **3**, 251-259, Plenum Press, New York, USA.
- [5] Freeman, R.S., Meyer, A.N., Li, J. and Donoghue, D.S. (1992). *J. Cell Biol.* **116**, 725-735.
- [6] Posada, J., Yew, N., Ahn, N.G., Vande Woude, G.F. and Cooper, J.A. (1993). *Mol. Cell Biol.* **13**, 2546-53.
- [7] Nebreda, A., and Hunt, T. (1993) *EMBO J* **12**, 1979-86.
- [8] Kishimoto, T. (1994). *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 185-191.
- [9] Sagata, N. (1996). *Trends Cell Biol.* **6**, 22-28.

- [10] Colledge, W.H., Carlton, M.B., Udy, G.B. and Evans, M.J. (1994). *Nature* **370**, 65-68.
- [11] Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., and Maller, J.L. (1993). *Science* **262**, 1262-1265.
- [12] Gross, S.D, Schwab, M.S., Lewellyn, A.L. and Maller, J.L. (1999). *Science* **286**, 1365-1367.
- [13] Abrieu, A., Lorca, T., Labbé, J.-C., Morin, N., Keyse, S., and Dorée, M. (1996). *J. Cell Sci.* **109**, 239-246.
- [14] Gabrielli, B.G., Roy, L.M. and Maller, J.L. (1993). *Science* **259**, 1766-9.
- [15] Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N. and Sagata, N. (1997). *EMBO J.* **16**, 3860-3865.
- [16] Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.-C., Méry, J., Means, A. and Dorée, M. (1993). *Nature* **366**, 270-273.
- [17] Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). *Nature* **349**, 132-138.
- [18] Lorca, T., Labbé, J.C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Le Bouffant, F. and Dorée, M. (1992). *EMBO J.* **11**, 2381-2390.
- [19] Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y. & Sagata, N. (1991). *Nature* **352**, 247-248.
- [20] Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y., and Sagata, N. (1993). *EMBO J.* **12**, (10) 4021-4027.
- [21] Watanabe, N., Vande Woude, G.F., Ikawa, Y., and Sagata, N. (1989). *Nature* **342**, 505-511.

- [22] Lorca, T., Galas, S., Fesquet, D., Devault, A., Cavadore, J.C. and Doree, M. (1991). *EMBO J.* **10**, 2087-2093.
- [23] Néant, I., and Guerrier, P. (1988). *Exp. Cell Res.* **176**, (1) 68-79.
- [24] Zhang, S.C., and Masui, Y. (1992). *J. Exp. Zool.* **263**, 317-329.
- [25] Bodart J-F., Bécharard D., Bertout M., Gannon J., Rousseau A., Vilain J-P. and Flament S. (1999a). *Exp. Cell Res.* **253**, 413-421.
- [26] Félix, M.-A., Labbé, J.-C., Dorée, M., Hunt, T., and Karsenti, E. (1990). *Nature* **346**, 379-382.
- [27] Wu, G.J., Simerly, C., Zoran, S.S., Funte, L.R., and Schatten, G. (1996). *Biol. Reprod.* **55**, 260-270.
- [28] Bélanger, A.M. and Schuetz, A.W. (1975). *Dev. Biol.* **45**, 378-381.
- [29] Jesus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W., and Ozon, R. (1991). *Development* **111**, 813-820.
- [30] Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E. and Draetta, G. (1993). *EMBO J.* **12**, 53-63.
- [31] Strausfeld, U.P., Fernandez, A., Capony, J.-P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbé, J.-C. & Lamb, N.J. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 5989-6000.
- [32] Pham, C.D., Vuyyuru, V.B., Yang, Y., Bai, W. and Singh B. (1999). *Oncogene* **18**, 4287-4294.
- [33] Nebreda, A., Gannon, J. and Hunt, T. (1995). *EMBO J.* **14**, 5597-5607.
- [34] Frank-Vaillant, M., Jesus, C., Ozon, R., Maller, J.L. and Haccard, O. (1999). *Mol. Biol. Cell* **10**, 3279-3288.

[35] Flament, S., Bodart, J.-F., Browaeys, E., Bertout, M., Rousseau, A., Gannon, J., and Vilain, J.-P. (1997). *Zygote* **5**, 11-19.

[36] Bodart J.-F., Béchard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.-P., and Flament, S. (1999b) *FEBS lett.* **457**, 175-178.

[37] Rodeau, J.-L., Flament, S., Browaeys, E. and Vilain, J.-P. (1998). *Mol. Membrane Biol.* **15**, 145-151.

Publication 4

Inhibition of protein-tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*.

FEBS lett. **457** : 175-178 (1999).

Introduction au travail.

Dans les ovocytes d'amphibien, l'arrêt en métaphase II est dû à un facteur cytotatique (CSF) dont l'identité n'est pas encore bien connue. Plusieurs protéines sont impliquées dans cette activité cytotatique : c-mos (Sagata et coll., 1989), MAPK (Haccard et coll., 1993) et p90^{rsk} (Gross et coll., 1999). La MAPK agirait en aval de c-mos et empêcherait l'activation du système de dégradation de la cycline B (Abrieu et coll., 1996), conduisant au maintien d'une activité MPF élevée dans les ovocytes.

Après la fécondation, les activités CSF et MPF disparaissent rapidement mais l'activité MPF chute la première (Watanabe et coll., 1989). La disparition de ces deux activités permet l'émission du second globule polaire et la formation du pronucleus femelle.

Plusieurs protéines-kinases sont actives lors du blocage métaphasique et sont inhibées lors de la levée de ce blocage. L'état de phosphorylation d'une protéine résulte de l'équilibre entre une kinase et une phosphatase. De ce fait, il est possible que certaines phosphatases soient inactivées lors de l'arrêt métaphasique et qu'elles soient activées pour que le blocage métaphasique ait lieu. Par conséquent, si un inhibiteur de kinases est capable de lever ce blocage, un inhibiteur de phosphatases pourrait faire obstacle à cette levée de blocage. En outre, un inhibiteur de l'APC pourrait être présent dans les ovocytes d'amphibiens arrêtés en métaphase II (Peters et coll., 1996). L'identité de cet inhibiteur, qui se lierait à l'APC (Peters et coll., 1996) reste à déterminer. La régulation de l'activité de cet inhibiteur impliquerait également une protéine-phosphatase (Abrieu et coll., 1996 ; Vorlaufer et Peters, 1998). La CaMKII est capable d'induire la dégradation de la cycline B sans inactiver MAPK. Elle pourrait activer une phosphatase responsable de la déphosphorylation d'un inhibiteur de l'APC (Abrieu et coll., 1996). L'implication d'une telle protéine-phosphatase reste hypothétique. La possibilité de l'intervention de la protéine-phosphatase 1 (PP1) a déjà été étudiée : des mutations de la sous-unité catalytique de PP1 entraînent un défaut d'anaphase chez *Drosophila*, *Aspergillus*, les levures bourgeonnantes et fissipares (Doonan et Morris, 1989 ; Okhura et coll., 1989 ; Axton et coll., 1990 ; Hisamoto, 1994). Chez les levures, il a été démontré que les suppresseurs des mutants de PP1 interagissaient avec les sous-unités de l'APC (Ishii et coll., 1996). Un arrêt du cycle cellulaire a aussi été observé dans des cellules de mammifères injectées d'anticorps neutralisant anti-PP1 (Fernandez et coll., 1992) ou lors d'un traitement par l'acide okadaïque, un inhibiteur des protéine-phosphatases PP2A et PP1 (Ghosh et Paaweletz, 1992 ; Vandré et Wills, 1992). Dans les ovocytes de rat activés par la

puromycine, l'acide okadaïque empêche l'inactivation du MPF et provoque même une augmentation de l'activité H1 kinase, suggérant l'absence de protéolyse de la cycline B (Zernicka-Goetz et coll., 1993). De même, l'acide okadaïque inhibe la sortie de métaphase II induite par l'ionophore calcique dans les ovocytes de porc (Grocholova et coll., 1997). De plus, la microinjection d'acide okadaïque dans les ovocytes d'étoile de mer inhibe la protéolyse de la cycline B (Picard et coll., 1989). Cependant dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope, l'inhibition de PP1 n'empêche pas l'activation de l'APC ni la dégradation de la cycline B (Vorlaufer et Peters, 1998). Ces résultats suggèrent qu'une ou plusieurs protéines-phosphatases sont impliquées dans la transition métaphase-anaphase. Nous avons donc utilisé un inhibiteur de protéines tyrosine-phosphatases (PTP), le molybdate d'ammonium (Kato et coll., 1986 ; Matic et Trakovic, 1986), afin de déterminer si ces enzymes étaient impliquées dans la levée du blocage métaphasique de l'ovocyte de Xénope.

Résultats et Discussion.

Nous avons constaté que l'injection de molybdate d'ammonium (1,6 mM) inhibe la formation du pronucleus induite par l'ionophore calcique. Cependant, le molybdate d'ammonium n'inhibe pas la formation du pronucleus induite par un inhibiteur de protéines-kinases, la 6-DMAP. Ce résultat exclut un effet toxique du molybdate d'ammonium qui aurait pu nuire à la formation du pronucleus. Ainsi, une PTP joue un rôle important dans la cascade des événements qui aboutit à la formation du pronucleus. Une étude récente rapporte également qu'un autre inhibiteur de PTP, l'orthovanadate de sodium, empêche l'apparition des signes externes de l'activation des ovocytes de Xénope induite par des spermatozoïdes (Sato et coll., 1998).

De manière à vérifier si l'injection de molybdate d'ammonium n'inhibait pas la libération de calcium habituellement induite par l'ionophore calcique, nous avons observé si l'exocytose des granules corticaux se produisait, dans la mesure où cet événement est directement influencé par la libération de calcium. L'injection de l'inhibiteur de PTP ne provoque pas l'exocytose des granules corticaux et n'empêche pas l'exocytose induite par l'ionophore calcique. Le molybdate d'ammonium n'inhibe pas l'augmentation du calcium intracellulaire induite par l'ionophore A23187. En outre, ce résultat suggère que la PTP, impliquée dans la formation du pronucleus, agit en aval du signal calcique.

Au niveau moléculaire, l'injection de molybdate d'ammonium seule ne provoque aucun changement de la mobilité électrophorétique de la sous-unité catalytique du MPF, la p34^{cdc2}. De même, elle n'affecte pas la stabilité de la cycline B ni celle de mos. La présence de l'inhibiteur de PTP inhibe donc tous les effets moléculaires observés lors de l'activation des ovocytes de Xénope induite par l'ionophore calcique. La déphosphorylation de MAPK est également inhibée, témoignant de l'efficacité du molybdate d'ammonium. La déphosphorylation de MAPK est effectivement l'étape-clef de son inactivation (Ferrell et coll., 1991). Plusieurs MAPK-phosphatases ont été mises en évidence dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope. Une PTP de 47 kDa a été purifiée à partir de fractions cytosoliques d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope (Sarcevic et coll., 1993). La phosphatase XCL100, qui présente une forte homologie avec la CL100 de souris, a été clonée dans les embryons de Xénope, elle inactive MAPK (Lewis et coll., 1995). L'expression ectopique d'une CL100, tronquée dans sa partie carboxy-terminale, provoque d'ailleurs l'inactivation de MAPK et la libération de l'arrêt en métaphase (Minshull et coll., 1994).

En présence de l'inhibiteur de PTP, l'ionophore calcique est donc incapable de provoquer l'inactivation du MPF. En effet, la cycline B n'est pas dégradée et aucun changement de mobilité électrophorétique de p34^{cdc2} n'est observé. De même, c-mos qui est dégradée lors de la fécondation ou de l'application d'ionophore calcique, n'est plus dégradé dans ces conditions. Ainsi, dans les ovocytes injectés de molybdate d'ammonium, les phénomènes de protéolyse sont inhibés. Par quels mécanismes l'inhibition des PTP empêche-t-elle la dégradation de la cycline B et de c-mos? Dans les levures bourgeonnantes, une phosphatase à double spécificité, Cdc14p, est nécessaire à la progression du cycle cellulaire (Taylor et coll., 1997). Cdc14p induirait la dégradation des cyclines mitotiques en déphosphorylant Cdh1/Hct1, dont la fonction est d'activer l'APC (Visintin et coll., 1998 ; Jaspersen et coll., 1999). Cdh1/Hct1 appartient à une famille de protéines contenant un motif répété WD40 dans leur partie carboxy-terminale, impliquées dans la régulation de l'APC chez les levures et les eucaryotes. Récemment, Fizzy, homologue au produit du gène *fizzy* de *Drosophila*, a été caractérisé chez le Xénope. Son activité est requise pour l'activation de l'APC, la dégradation des cyclines A et B, et la ségrégation des chromatides dans les extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope (Lorca et coll., 1998). Cependant, aucun membre de la famille de Cdh1/Hct1 (aussi baptisée Fizzy-related, FZR) n'a été caractérisé chez le Xénope et leur existence à des stades précoces du développement semble incertaine. L'hypothèse de l'implication d'une phosphatase homologue de cdc14 dans la levée de blocage métaphasique semble peu probable.

En conclusion, nos résultats montrent que l'ionophore calcique ne provoque pas la formation de pronucleus lorsque les PTP sont inhibées. Outre l'inhibition de la déphosphorylation de MAPK, nous avons constaté l'inhibition de la protéolyse de la cycline B2 et de c-mos. Une protéine tyrosine-phosphatase sensible au molybdate d'ammonium semble donc impliquée dans la régulation de l'APC et dans les mécanismes moléculaires qui mènent à l'activation des ovocytes de Xénope.

Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*

Jean-François Bodart^a, David Béchard^a, Marc Bertout^a, Arlette Rousseau^a, Julian Gannon^b, Jean-Pierre Vilain^a, Stéphane Flament^{a,*}

^aCentre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^bImperial Cancer Research Fund Clare Hall Laboratories, South Mimms, Herts., UK

Received 2 June 1999

Abstract We have studied the effect of a protein tyrosine phosphatases (PTP) inhibitor on calcium-induced activation of *Xenopus laevis* oocytes arrested at metaphase II. Ammonium molybdate microinjection blocked pronucleus formation following A23187 treatment while cortical granules still underwent exocytosis. Pronuclei still occurred in ammonium molybdate-injected oocytes following 6-DMAP addition. Changes that usually occurred following A23187 exposure were inhibited in the presence of ammonium molybdate in the oocyte: MAPK dephosphorylation, p34^{cdc2} rephosphorylation and cyclin B2 and p39^{mos} proteolysis. These results suggest that a PTP is involved in the activation of the ubiquitin-dependent degradation machinery.

© 1999 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Oocyte; Calcium; Protein tyrosine phosphatase; Activation; *Xenopus*

1. Introduction

Entry into M phase is due to the activation of MPF, a kinase made up of two subunits: the catalytic subunit p34^{cdc2} and the regulatory subunit cyclin [4,16]. Exit from M phase is dependent on MPF inactivation. Cyclin is proteolysed by the ubiquitin pathway [10,13] while p34^{cdc2} is dephosphorylated on T161 [19]. Ubiquitination of proteins requires a 20S multisubunit complex that has been termed the anaphase-promoting complex (APC) which targets proteins for destruction by the 26S proteasome complex [34]. APC is believed to be the target of a cell cycle-dependent regulation. Degradation of cyclin B is stimulated in cell-free extracts prepared at interphase by addition of purified MPF [6,19]. The MPF has therefore been proposed to promote degradation of M phase cyclins by a mechanism that remains almost completely unknown [18,34].

In *Xenopus*, metaphase II arrest is due to a cytostatic factor (CSF) [21]. Although CSF has not yet been purified, the product of the protooncogene *c-mos* (p39^{mos}) [28] and mitogen-activated protein kinase (MAPK) [12] are thought to be involved in CSF activity. MAPK could mediate the CSF activity of p39^{mos} by preventing the cyclin degradation pathway from being turned on and leading to the maintenance of a high level of MPF activity in the cell [1]. This might be due to the presence in the egg of an inhibitor acting either on APC [1] or on ubiquitin-dependent proteolysis [36].

The interaction of the sperm with the egg membrane at fertilization leads to egg activation. This is mediated by a transient increase in intracellular calcium which induces cortical granule exocytosis for fertilization membrane formation as well as release from metaphase II arrest. Following this increase in calcium, both CSF and MPF activities disappear but MPF is inactivated before CSF [28,38]. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) has been shown to act downstream of intracellular calcium elevation [20,25]. Although p39^{mos} could be cleaved by the protease calpain [30,37], its proteolysis is thought to occur by the ubiquitin pathway [26]. MAPK is inactivated but this event is not required for CaMKII to turn on the cyclin degradation machinery in CSF extracts [1]. This is consistent with the fact that MAPK is inactivated after cyclin B proteolysis. It was suggested that CaMKII could activate a phosphatase responsible for the dephosphorylation of an inhibitor of APC [1].

The role of some protein phosphatases has already been discussed as regulators of the APC. Cyclin B proteolysis has been found to be inhibited by the microinjection of okadaic acid (OA) into starfish oocytes [27]. It has recently been reported in *Xenopus* egg extracts that proteolysis of cyclin B is prevented by the use of OA, which induces an activity that inhibits cyclin B ubiquitination [36]. Nevertheless, this activity is still calcium-sensitive. Taken together, these results indicate a role for protein phosphatases in the metaphase-anaphase transition.

However, less is known about the role of protein tyrosine phosphatases (PTP) in the metaphase-anaphase transition. We have addressed the question of involvement of these PTP in the activation of *Xenopus* metaphase II-arrested oocytes, by using ammonium molybdate, a PTP inhibitor [15,22]. We report that inhibition of PTP blocks A23187-induced pronucleus formation. At the molecular level, ammonium molybdate inhibited not only the dephosphorylation of MAPK but also the proteolysis of cyclin B and p39^{mos}. This inhibitory effect may be due to a PTP implicated in the regulation of the APC.

2. Materials and methods

2.1. Handling of oocytes and gametes

Adult *Xenopus laevis* females were purchased from C.R.B.M. (C.N.R.S., Montpellier France). Full-grown stage VI oocytes [5] were obtained as previously described [9] and used in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5/NaOH). Progesterone was used overnight at 10 μM to obtain metaphase II-arrested oocytes. A23187 (Boehringer Mannheim) was used at 10 μM from a stock solution (100 mM) prepared in DMSO. 6-DMAP (Sigma) was diluted in ND96, and used at 12 mM.

*Corresponding author. Fax: (33) 3-20-43-40-38.
E-mail: stephane.flament@univ.lille1.fr

This concentration was chosen since it was reported to induce egg activation within 30 min [39]. All experiments were performed at 20°C and at least in triplicate.

2.2. Microinjections

The PTP inhibitor ammonium molybdate [15,22] (Sigma) was microinjected into in vitro matured oocytes, by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo) in a calcium-limited medium (CaLM: 120 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 22.5 mM HEPES, 400 μ M EDTA, 500 μ M MgSO₄, 150 μ M CaCl₂, pH 7.4), in order to prevent activation due to pricking [39]. After injection of ammonium molybdate (1.6 mM final), the oocytes were allowed to heal for 15 min in this medium, and then incubated for 45 min in ND96 for the ammonium molybdate to diffuse throughout the oocytes, before treatment with A23187 or 6-DMAP.

2.3. Cytological analysis

Oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, sectioned and stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes, and with picroindigo carmine which reveals cytoplasmic structures [9].

In order to detect cortical granule exocytosis, oocytes were fixed in ND96 medium pH 7.5 containing 2.5% glutaraldehyde, after cutting into two parts to improve fixation. They were then dehydrated in a graded series of acetone, embedded in EMBED 812 and sectioned with a Reichert OmU2 ultramicrotome (Reichert, Vienna, Austria). Sections (1 μ m thick) were stained with a 0.1% toluidine blue solution.

2.4. Electrophoresis and Western blotting

Oocytes (20 per batch) were homogenized in homogenization buffer [2] and centrifuged for 10 min at 10 000 \times g (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were then incubated at 4°C for 30 min, under constant rotation with 10 μ l p9^{CKShs1}-Sepharose beads. After a brief centrifugation, one volume of 2 \times Laemmli sample buffer was added to one volume of supernatant for p39^{mos} and MAPK analysis. Beads were washed three times with ice-cold bead buffer [2] and treated with 2 \times Laemmli sample buffer for detection of p34^{cdc2} and cyclin B2. Oocyte proteins were denatured by heating the mixture (100°C, 5 min) and then separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In the particular case of MAPK immunodetection, proteins were resolved by 15% SDS-PAGE (prepared from a stock solution containing 29.82% acrylamide/0.18% bisacrylamide). Such gels allowed a good discrimination between active and inactive MAPK [3]. Separated proteins were subjected to Western blot analysis as previously reported [9]. p34^{cdc2} was detected using the monoclonal antibody A17 [11] (1/1000 in TBS). MAPK was detected using the anti-Erk2 monoclonal antibody D-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (1/2500 in TBS). Cyclin B2 was detected using the monoclonal antibody X121 diluted at 1/1000 in TBS. p39^{mos} was detected using the rabbit polyclonal antibody C-237 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), 1/1000 in TBS.

3. Results and discussion

3.1. Cytological analysis of ammonium molybdate-injected oocytes

The results of this analysis are summarized in Fig. 1. A pronucleus was observed in 100% of the in vitro matured oocytes that had been exposed to calcium ionophore A23187 (10 μ M) or 6-DMAP (12 mM) for 60 min. Ammonium molybdate microinjection itself did not trigger activation of the oocytes. When treated by calcium ionophore, 14% of oocytes microinjected ($n=14$) showed pronucleus formation. Ammonium molybdate did not block pronucleus formation induced by 6-DMAP, since pronuclei were found in 70% of the oocytes ($n=10$).

This result showing that ammonium molybdate inhibits calcium-induced pronucleus formation suggests that PTP play an important role in the cascade of events leading to pronucleus formation. This confirms a recent report indicating that inhibition of PTP with sodium orthovanadate leads to disruption of sperm-induced *Xenopus* egg activation [31], even if these

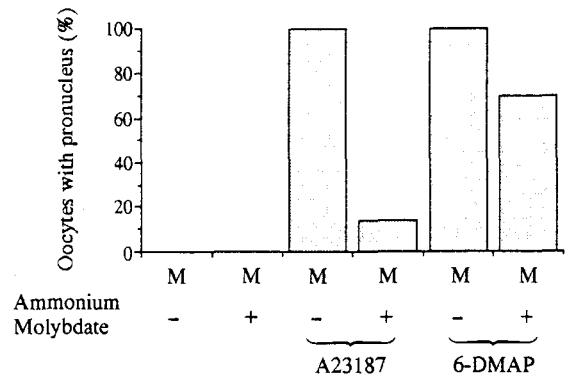


Fig. 1. Pronucleus formation after treatment with A23187 or 6-DMAP of metaphase II-arrested oocytes previously injected with ammonium molybdate. Oocytes were injected or not with ammonium molybdate and 1 h later they were incubated for 1 h in control or test solutions. Results are expressed as percentage of oocytes showing a pronucleus on the histological sections. No pronuclei were found in matured oocytes, even 2 h after the injection of ammonium molybdate. Matured oocytes showed a pronucleus in all cases when analyzed after 1 h of A23187 or 6-DMAP exposure. In the presence of the PTP inhibitor, only 14% ($n=14$) of the A23187-treated oocytes showed a pronucleus whereas such a structure was found in 70% ($n=10$) of the 6-DMAP-treated oocytes.

authors observed only cortical reaction without pronucleus analysis.

One might argue that the lack of pronucleus might be due to a toxic effect of the drug. However, this does not seem to be the case since 6-DMAP, a kinase inhibitor able to activate *Xenopus* eggs in the absence of calcium changes [39], induced pronucleus formation in these injected oocytes.

Another explanation might be that the calcium increase could not occur in these injected oocytes. Since cortical granule exocytosis is a reliable event associated with calcium changes in the egg, we analyzed the cortical granule content of in vitro matured oocytes. In control oocytes, cortical granules were located under the plasma membrane (Fig. 2A), while these granules underwent exocytosis after A23187 treatment (Fig. 2B). Ammonium molybdate injection itself did not trigger cortical granule exocytosis (Fig. 2C). The presence of the PTP inhibitor did not block exocytosis induced by the calcium ionophore (Fig. 2D). The vitelline envelope was not present on the sections because oocytes were cut into two halves to aid fixation. The fact that cortical granule exocytosis still occurred in oocytes injected with ammonium molybdate following A23187 addition demonstrated that the PTP inhibitor did not prevent the increase in intracellular calcium.

3.2. Analysis of MPF and CSF in ammonium molybdate-injected oocytes

First, phosphorylation states of p34^{cdc2} and MAPK were analyzed. p34^{cdc2} may appear as two forms on Western blots: the slow migrating band is inactive and phosphorylated on three residues (Thr-14, Tyr-15 and Thr-161), the fast migrating band is either unphosphorylated and inactive or monophosphorylated (Thr-161) and active [32]. Two forms of MAPK may also be detected: an active tyrosine phosphorylated form and an unphosphorylated faster migrating inactive form [24].

Immature oocytes contain two forms of p34^{cdc2} and the dephosphorylated form of MAPK whereas matured oocytes contain only the fast migrating band for p34^{cdc2} and the slow

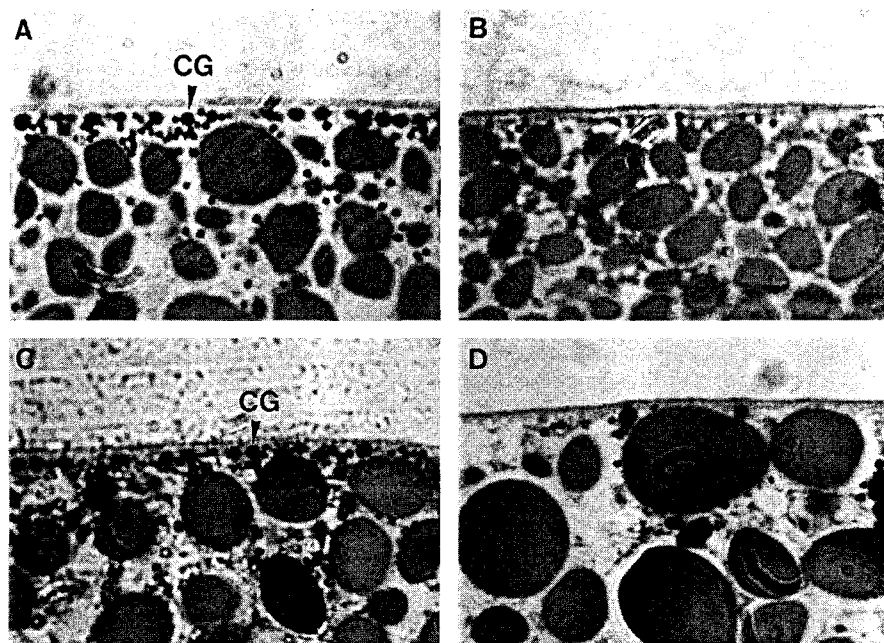


Fig. 2. Sections of matured oocytes showing cortical granule content following ammonium molybdate microinjection and treatment with A23187. In vitro matured oocytes were injected or not with ammonium molybdate and 1 h later, they were treated or not with A23187 for 20 min. Cortical granules (CG) appeared located under the plasma membrane in control metaphase II-arrested oocytes (A) as well as in oocytes injected with ammonium molybdate (B). A23187 induced CG exocytosis in matured oocytes (B) even in the presence of ammonium molybdate (D) ($\times 1000$). The vitelline envelope is not observed on the sections due to its loss following the cutting of the oocytes into two halves to improve fixation.

migrating band for MAPK (Fig. 3). In metaphase II-arrested oocytes previously injected with ammonium molybdate, calcium ionophore failed to induce changes in the immunodetection profiles of $p34^{cdc2}$ and MAPK (Fig. 3).

Ammonium molybdate inhibited calcium-induced dephosphorylation of MAPK, providing efficiency of its inhibitory action. Indeed, it is well-known that tyrosine dephosphorylation of MAPK is a key event for its inactivation [7]. MAPK phosphatases have been found in *Xenopus* egg extracts: an uncharacterized 47 kDa PTP was purified from the cytosolic fraction of *Xenopus* eggs [29], and XCL100, close to the mouse homologue CL100, has been cloned in *Xenopus* embryos and shown to inactivate MAPK [17]. In metaphase II-arrested extracts of *Xenopus* eggs, ectopic overexpression of a C-terminally truncated form of CL100 results in premature inactivation of MAPK and exit from metaphase arrest [23].

The role of MAPK in the metaphase II arrest has recently been discussed. MAPK has been shown to prevent the cyclin B degradation rather than to inhibit it [1]. Indeed, in metaphase II-arrested oocytes extracts, CaMKII is able to release metaphase block, and to trigger cyclin degradation without inactivation of MAPK. This is consistent with the fact that MAPK inactivation does not occur earlier than 20–30 min after fertilization, which is well after cyclin degradation [1].

So we focused on the proteolysis of the components of MPF and CSF. When calcium ionophore A23187 was applied on matured oocytes, cyclin B2 was degraded in the first minutes and was not detected on the Western blots performed after 20 min. The kinase $p39^{mos}$ was not detected on the Western blots performed after a 60 min A23187 exposure (Fig. 3). PTP inhibition by itself did not affect the stability of the two proteins (Fig. 3). In homogenates of oocytes exposed for 20 min to 10 μ M A23187 after ammonium molybdate injection, cyclin B2 and $p39^{mos}$ were still detected (Fig. 3).

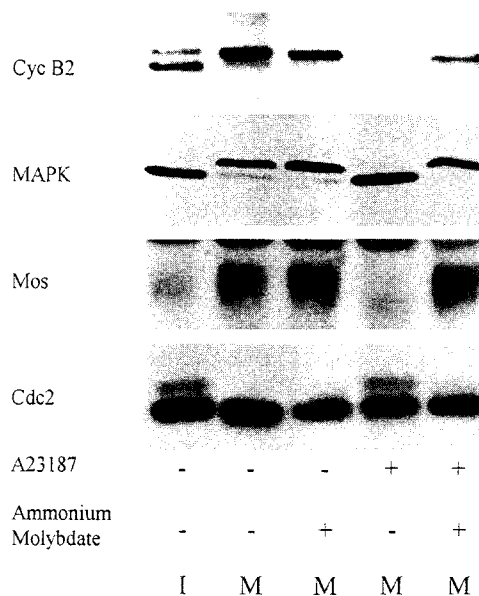


Fig. 3. Western blot analysis of $p34^{cdc2}$, $p39^{mos}$, MAPK and cyclin B2 in metaphase II-arrested oocytes microinjected with ammonium molybdate and treated with A23187. Metaphase II-arrested oocytes were injected or not with ammonium molybdate and 1 h later they were treated or not with A23187. Analyses were performed after 20 min for cyclin B2 and after 60 min for the other proteins. In homogenates from immature oocytes (I), we observed two forms of $p34^{cdc2}$, the absence of $p39^{mos}$, the dephosphorylated form of MAPK and two cyclin B2 isoforms. In matured oocytes (M), we found the fast migrating form of $p34^{cdc2}$, $p39^{mos}$ which was synthesized in response to progesterone, the phosphorylated active form of MAPK and the phosphorylated form of cyclin B2. Microinjection of the PTP inhibitor alone did not modify these profiles. Treatment with 10 μ M A23187 induced rephosphorylation of $p34^{cdc2}$, degradation of $p39^{mos}$, dephosphorylation of MAPK and degradation of cyclin B2. These changes failed to occur when A23187 was applied on oocytes previously microinjected with the PTP inhibitor.

Why are these oocytes unable to carry out the proteolysis of cyclin B2 and p39^{mos} when PTP are inhibited? In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14p, a dual specificity PTP, is required for cell cycle progression [33]. Cdc14p mutants, arrested in late mitosis, expressed a phenotype similar to that of cells expressing a non-degradable form of mitotic cyclins [8]. It has been proposed that Cdc14p induces degradation of mitotic cyclins through dephosphorylation of Cdh1/Hct1, the function of which is to activate APC [14,35]. Cdh1/Hct1 belongs to a family of proteins containing seven WD-40 repeats in their C-termini, involved in the regulation of the ubiquitin-proteasome pathway in both yeast and eukaryotes. A similar explanation might be proposed in *Xenopus* oocytes in which a PTP might be located downstream of calcium and CaMKII and upstream of APC.

In conclusion, our study shows that the calcium ionophore A23187 cannot induce pronucleus formation when PTP are inhibited. Since this effect is mediated not only by the inhibition of MAPK dephosphorylation but also by the inhibition of cyclin B2 and p39^{mos} proteolysis, we suggest that a PTP sensitive to ammonium molybdate is involved in APC regulation. The identification of this enzyme could be of great interest for the understanding of cell cycle regulation.

Acknowledgements: We would like to thank Dr. Franck Chesnel for his suggestions about MAPK detection. These studies were supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale (DRED, EA No. 1033), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Région Nord-Pas-de-Calais (Centre de Biologie Cellulaire) and the F.E.D.E.R.

References

- [1] Abrieu, A., Lorca, T., Labbé, J.-C., Morin, N., Keyse, S. and Dorée, M. (1996) *J. Cell Sci.* 109, 239–246.
- [2] Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A.C., Lew, J. and Wang, J.H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13279–13288.
- [3] Chesnel, F., Bonnac, G., Tardivel, A. and Boujard, D. (1997) *Dev. Biol.* 188, 122–133.
- [4] Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1994) *FASEB J.* 8, 182–191.
- [5] Dumont, L.W. (1972) *J. Morphol.* 136, 153–180.
- [6] Felix, M.A., Labbe, J.C., Doree, M., Hunt, T. and Karsenti, E. (1990) *Nature* 346, 379–382.
- [7] Ferrell, J.E., Wu, M., Gerhart, J.C. and Martin, G.S. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 1965–1971.
- [8] Fitzpatrick, P.J., Toyn, J.H., Millar, J.B. and Johnston, L.H. (1998) *Mol. Gen. Genet.* 258, 437–441.
- [9] Flament, S., Bodart, J.-F., Browaeys, E., Bertout, M., Rousseau, A., Gannon, J. and Vilain, J.-P. (1997) *Zygote* 5, 11–19.
- [10] Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) *Nature* 349, 132–138.
- [11] Goodger, N., Gannon, J., Hunt, T. and Morgan, P.R. (1996) *J. Pathol.* 178, 422–428.
- [12] Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E. and Maller, J.L. (1993) *Science* 262, 1262–1265.
- [13] Hershko, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16376–16379.
- [14] Jaspersen, S.L., Charles, J.F. and Morgan, D.O. (1999) *Curr. Biol.* 9, 227–236.
- [15] Kato, T., Hara, A., Nakayama, T., Sawada, H., Hamatake, M. and Matsumoto, Y. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 83, 813–817.
- [16] King, R.W., Jackson, P.K. and Kirschner, M.W. (1994) *Cell* 79, 563–571.
- [17] Lewis, T., Groom, L.A., Sneddon, A.A., Smythe, C. and Keyse, S.M. (1995) *J. Cell Sci.* 108, 2885–2896.
- [18] Lohka, M.J., Hayes, M.K. and Maller, J.L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3009–3013.
- [19] Lorca, T., Labbé, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.-P., Cavadore, J.-C., Le Bouffant, F. and Dorée, M. (1992) *EMBO J.* 11, 2381–2390.
- [20] Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.-C., Méry, J., Means, A. and Dorée, M. (1993) *Nature* 366, 270–273.
- [21] Masui, Y. and Markert, C.L. (1971) *J. Exp. Zool.* 177, 129–146.
- [22] Matic, G. and Trakovic, D. (1986) *Eur. J. Biochem.* 9, 841–845.
- [23] Minshull, J., Sun, H., Tonks, N.K. and Murray, A.W. (1994) *Cell* 79, 475–486.
- [24] Mordret, G. (1993) *Biol. Cell* 79, 193–207.
- [25] Morin, N., Abrieu, A., Lorca, T., Martin, F. and Dorée, M. (1994) *EMBO J.* 13, 4343–4352.
- [26] Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1993) *EMBO J.* 12, 4021–4027.
- [27] Picard, A., Capony, J.-P., Brautigan, D.L. and Doree, M. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 3347–3354.
- [28] Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G.F. and Ikawa, Y. (1989) *Nature* 342, 512–518.
- [29] Sarcevic, B., Erikson, E. and Maller, J.L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 25075–25083.
- [30] Santella, L., Kyoizuka, K., De Riso, L. and Carafoli, E. (1998) *Cell Calcium* 23, 123–130.
- [31] Sato, K., Iwasaki, T., Tamaki, I., Aoto, M., Tokmakov, A.A. and Fukami, Y. (1998) *FEBS Lett.* 424, 113–118.
- [32] Solomon, M.J. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 180–186.
- [33] Taylor, G.S., Liu, Y., Baskerville, C. and Charbonneau, H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 24054–24063.
- [34] Townsley, F.M. and Ruderman, J.V. (1998) *Trends Cell Biol.* 8, 238–244.
- [35] Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M. and Amon, A. (1998) *Mol. Cell.* 2, 709–718.
- [36] Vorlaufer, E. and Peters, J.M. (1998) *Mol. Biol. Cell* 9, 1817–1831.
- [37] Watanabe, N., Vande Woude, G.F., Ikawa, Y. and Sagata, N. (1989) *Nature* 342, 505–511.
- [38] Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y. and Sagata, N. (1991) *Nature* 352, 247–248.
- [39] Zhang, S.C. and Masui, Y. (1992) *J. Exp. Zool.* 263, 317–329.

Conclusion et Perspectives

Au terme de la maturation, les ovocytes de Xénope subissent un deuxième blocage, en métaphase de deuxième division de méiose. Cet arrêt physiologique est dépendant de l'activité de plusieurs protéines kinases. L'activité du MPF, responsable de l'entrée et de la sortie de phase M, est maintenue dans les ovocytes de Xénope arrêtés en métaphase II. Le maintien de cette activité dans la cellule est permise par un facteur cytotatique (CSF), et empêche la transition métaphase-anaphase. La principale protéine-kinase impliquée dans cette activité CSF est la sérine-thréonine kinase c-mos, située en amont de la voie MAPK. Les mécanismes par lesquels la voie c-mos-MAPK parvient à bloquer l'ovocyte ne sont que très partiellement compris : elle agirait en inhibant la dégradation de la cycline B.

Afin de déterminer les rôles respectifs de c-mos et du MPF dans le maintien de l'arrêt en métaphase II des ovocytes de Xénope, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de p34^{cdc2}. L'olomoucine et la roscovitine sont deux inhibiteurs spécifiques de cdc2, cdk2 et cdk5 dont nous avons caractérisé les effets sur la transition G2/M et sur le blocage de la transition métaphase-anaphase des ovocytes de Xénope. Si ces inhibiteurs se sont révélés efficaces pour inhiber la maturation induite par la progestérone, ils se sont en revanche avérés inefficaces pour lever le blocage en métaphase II lorsqu'ils sont appliqués dans le milieu externe. La microinjection de ces inhibiteurs dans des ovocytes bloqués en métaphase II est capable de lever ce blocage mais dans des pourcentages qui n'excèdent pas 45%. Ainsi, même si l'olomoucine et la roscovitine montrent une très grande sélectivité *in vitro*, de nombreux effets cellulaires affectent leur sélectivité *in vivo*. En l'occurrence, les ovocytes bloqués en métaphase II sont très peu perméables à ces inhibiteurs spécifiques de cdk. Au contraire de la 6-DMAP, ces outils se sont donc révélés peu maniables *in vivo*, dans l'étude de la levée de blocage métaphasique des ovocytes de Xénope (Publication 1).

La disparition de c-mos lors de la levée du blocage métaphasique pourrait être due à l'inhibition du MPF (Singh et Arlinghaus, 1992), qui survient d'ailleurs avant l'inactivation du CSF et la dégradation de c-mos, tant chez les amphibiens (Watanabe et coll., 1991) que chez les mammifères (Weber et coll., 1991). Le modèle qui émerge propose que c-mos stabilise le MPF en inhibant la dégradation des cyclines par le biais de MAPK et que le MPF stabilise en retour c-mos (Figure 19). La déstabilisation ou l'inactivation de l'un des composants de ce cycle entraîne l'inactivation de l'autre composant. Ce modèle semble étayé par plusieurs autres observations. c-mos est phosphorylé de manière maximale dans les

ovocytes bloqués en métaphase II, dans lesquels l'activité MPF est élevée. v-mos peut être phosphorylé par le MPF sur un site qui est conservé dans toutes les séquences de c-mos. Certains résultats plaident en faveur de l'implication du MPF dans le maintien de l'activité et de l'accumulation de c-mos lors de la maturation (Nebreda et coll., 1995 ; Ballantyne et coll., 1997 ; Franck-Vaillant et coll., 1999). Enfin, comme le MPF (Bailly et coll., 1989), c-mos se localise au niveau des microtubules, ce qui donne une base structurale à ce modèle de régulation mutuelle entre c-mos et le MPF.

Nos résultats confortent ce modèle et s'ajoutent aux données déjà recueillies. La 6-DMAP, un inhibiteur de protéines-kinases à large spectre est capable de lever le blocage métaphasique des ovocytes d'amphibien (*Xenopus laevis*, Zhang et Masui, 1992 ; *Cynops pyrrhogaster*, Iwao et Masui, 1995). Cependant, les effets de cet inhibiteur de protéines-kinases sur le blocage en métaphase II n'avaient pas été caractérisés au niveau moléculaire. Ainsi, même si la 6-DMAP et l'ionophore calcique sont capables de provoquer la formation d'un pronucleus dans les ovocytes de Xénope, les mécanismes qui sous-tendent la levée du blocage métaphasique sont différents. L'activation des ovocytes de Xénope, induite par l'ionophore calcique, est caractérisée par une chute brutale de l'activité MPF, principalement due à la protéolyse de la cycline B dès les premières minutes du traitement. Elle est suivie par l'inactivation de MAPK et la protéolyse de c-mos. Par contre, la 6-DMAP induit une diminution rapide des activités MAPK et MPF. L'inactivation de MAPK ne requiert pas sa déphosphorylation et la chute de l'activité MPF n'est pas liée à la dégradation des cyclines B. En dépit de cette absence de protéolyse des cycline B, nous avons été surpris de constater que c-mos était dégradé lors de la levée de blocage métaphasique induite par la 6-DMAP (publication 2). L'inhibition des kinases par la 6-DMAP entraîne l'inactivation du MPF et la dégradation de c-mos.

Nous avons tenté de déterminer le mécanisme responsable de la protéolyse de c-mos induite par la 6-DMAP. Des travaux menés chez le singe Rhésus avaient montré une augmentation de calcium dans les ovocytes traités par la 6-DMAP (Wu et coll., 1996). Nous avons mesuré la concentration de calcium intracellulaire des ovocytes de Xénope et nous avons constaté que la 6-DMAP induit une augmentation transitoire de calcium lorsqu'elle est appliquée sur des ovocytes de Xénope bloqués en métaphase II. Cette libération de calcium ne semble cependant pas impliquée dans la formation du pronucleus et la dégradation de c-mos induites par la 6-DMAP. En effet, la 6-DMAP est capable de provoquer ces événements au stade de la rupture de l'enveloppe nucléaire, stade où les ovocytes sont insensibles à l'action du calcium. De plus, la chélation des ions calcium dans des ovocytes bloqués en métaphase II n'empêche

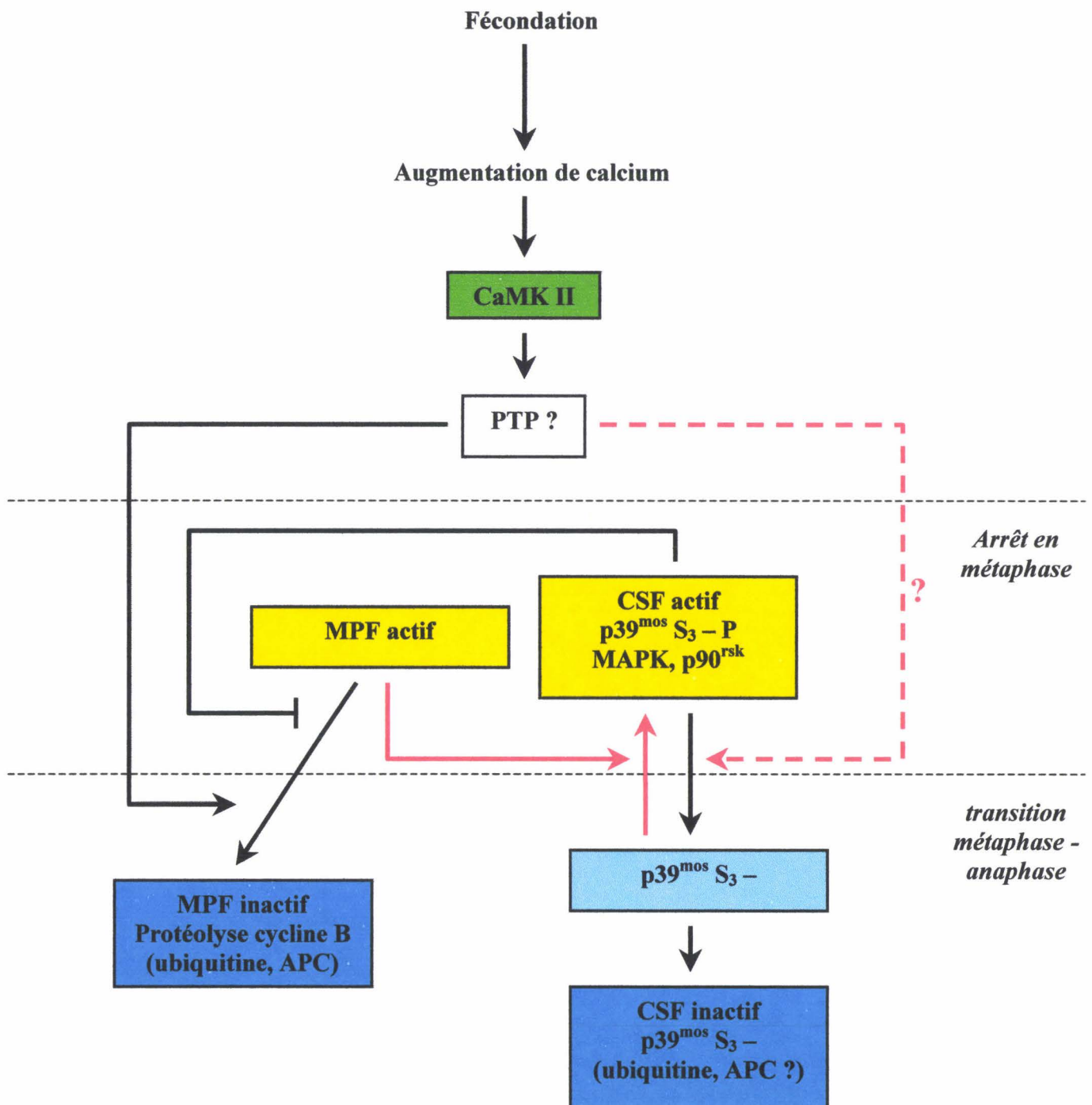


Figure 19 : Hypothèse concernant la cascade d'événements survenant lors de l'activation des ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope

Notre étude nous amène à proposer ce modèle qui précise celui de la figure 14 : lors de l'arrêt en métaphase II, le MPF stabilise l'activité CSF en maintenant c-mos sous forme phosphorylée non dégradable. Cet équilibre conduit au maintien d'une activité MPF élevée dans la cellule et empêche la sortie de phase M. Lors de la fécondation, l'augmentation de calcium active la CaMKII. Une protéine tyrosine-phosphatase activée par la CamKII permettrait la levée d'une inhibition sur les mécanismes de protéolyse. Cela entraîne la protéolyse de la cycline B. Le MPF est inactivé et ne peut plus phosphoryler c-mos, celui-ci est dégradé et l'activité CSF chute.

pas la formation du pronucleus, et la dégradation de c-mos induite par la 6-DMAP. Cette dégradation est indépendante du calcium et semble donc exclusivement due à l'inhibition des kinases induite par la 6-DMAP (Publication 3).

De même, les mécanismes qui permettent l'inactivation du MPF lors de la fécondation sont peu connus. Lors de la fécondation, l'inactivation du MPF se produit en présence d'une activité détectable de CSF. Ainsi, la protéolyse de la cycline B se réalise indépendamment de l'activité MAPK. Celle-ci empêchait auparavant l'activation de la voie de dégradation des cyclines B lors de l'arrêt en métaphase. L'activation de la voie de dégradation de la cycline B est dépendante de la régulation de l'APC. Cette ubiquitine-ligase est régulée par l'état de phosphorylation de certaines sous-unités telles que cdc27, et par sa liaison à d'autres protéines, notamment à un inhibiteur dont l'identité reste à préciser (Peters et coll., 1996). La régulation de cet inhibiteur pourrait être effectuée par une protéine-phosphatase, qui se situerait en aval de la CaMKII (Abrieu et coll., 1996).

Les mécanismes par lesquels les événements ioniques de la fécondation, et plus particulièrement, l'augmentation de calcium intracellulaire, affectent le MPF et le CSF restent obscurs. Plusieurs études ont souligné l'importance des protéines-phosphatases dans cette cascade d'événements. Certaines protéines-phosphatases constitueraient les chaînons manquants entre l'augmentation de calcium, l'activation de la CaMKII et l'inactivation du MPF ainsi que celle du CSF. Nous avons voulu tester l'hypothèse de l'implication d'une protéine-tyrosine phosphatase (PTP) en aval du signal calcique qui permet la levée du blocage métaphasique des ovocytes de Xénope. Nous avons employé un inhibiteur de protéines tyrosine-phosphatases, le molybdate d'ammonium. Sans entraver la libération de calcium induite par l'ionophore calcique, le molybdate d'ammonium s'est avéré capable d'inhiber les événements moléculaires induits lors de la levée de blocage métaphasique. En effet, outre l'inhibition de la déphosphorylation de MAPK, ni la rephosphorylation de p34^{cdc2}, ni les protéolyses de la cycline B et de c-mos ne se produisent en présence de cet inhibiteur de PTP. Une protéine tyrosine-phosphatase serait donc impliquée en aval du signal calcique, dans la régulation de l'APC (Publication 4).

L'ensemble de ces résultats nous amène à proposer l'hypothèse présentée dans la figure 19, et soulève un certain nombre de questions. L'identification de la protéine tyrosine-phosphatase impliquée dans la levée du blocage métaphasique devrait permettre la mise à jour de nouveaux mécanismes de régulation de l'APC et des voies de protéolyse. De même, l'identification des protéines-kinases impliquées dans la libération de calcium induite par la 6-

DMAP, permettra sans doute de mieux comprendre les mécanismes de régulation des oscillations calciques, au cours des divisions embryonnaires et dans les cellules somatiques.

Par ailleurs, il est important de tester le modèle de stabilisation de c-mos par p34^{cdc2}. Des inhibiteurs spécifiques de p34^{cdc2}, tel que le Purvalanol A ou p21^{cip1}, ainsi que des anticorps monoclonaux dirigés contre p34^{cdc2}, pourraient être avantageusement employés pour étudier le blocage métaphasique des ovocytes de Xénope. Ils permettraient de déterminer si la stabilité de c-mos lors de l'arrêt en métaphase II est dépendante de p34^{cdc2} ou non. Il serait indispensable de déterminer le mécanisme impliqué dans la dégradation de c-mos. Celui-ci pourrait être étudié dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II de Xénope déplétés en APC ou grâce à l'emploi d'inhibiteurs du système d'ubiquitination.

A plus long terme, ce projet pourrait permettre d'accéder à une meilleure connaissance de la régulation des effecteurs moléculaires de l'arrêt métaphasique et à l'identification de nouvelles molécules responsables de la levée de blocage métaphasique. Ces résultats pourraient ouvrir de nouvelles perspectives en thérapie anticancéreuse. Le MPF étant un facteur universel de l'entrée et de la sortie de phase M hautement conservé dans l'évolution, cette étude pourra être étendue à d'autres modèles. Aussi, les molécules responsables de l'activité cytotatique pourraient servir à la mise au point de mimétiques capables de bloquer la prolifération. L'identification de nouvelles molécules responsables de la levée de blocage métaphasique pourrait permettre de réaliser de nouveaux inhibiteurs.

Références.

Abdelmajid, H., Leclerc-David, C., Moreau, M., Guerrier, P., et Ryazanov A. (1993) Release from the metaphase I block in invertebrate oocytes: possible involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase III. *Int. J. Dev. Biol.* Jun ; 37 : 279-90

Abraham, R.T., Acquarone, M., Andersen, A., Asenti, A., Bellé, R., Berger, F., Bergounioux, C., Brunn, G., Buquet-Fagot, C., Fagot, D., Glab, N., Goudeau, H., Goudeau, M., Guerrier, P., Houghton, P., Hendriks, H., Kloareg, B., Lippai, M., Marie, D., Maro, B., Meijer, L., Mester, J., Mulner-Lorillon, O., Poulet, S.A., Schierenberg, E., Schutte, B., Vaultot, D. and Verlhac, M.H. (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell*, 83 : 105-120.

Abrieu, A., Lorca, T., Labbé, J.-C., Morin, N., Keyse, S., and Dorée, M. (1996). MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* 109, 239-246.

Abrieu, A., Fisher, D., Simon, M.N., Dorée, M. et Picard, A. (1997) MAPK inactivation is required for the G2 to M phase transition of the first meiotic cell cycle. *EMBO J.* 16: 6407-6413.

Adachi, Y., Luke, M. et Laemmli U.K.(1991) Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* 64 : 137-48

Al-Bagdadi, F., Singh, B. et Arlinghaus, R.B. Evidence for involvement of the protein kinase C pathway in the activation of p37^{v-mos} protein kinase. *Oncogene*. (1990) *Oncogene* 1251-1257.

Albeiro, R., Kubelka, M., Zakhartchenko, V., Hajduch, M., Wolf, E. et Motlick, J. (2000) activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol. Reprod. Dev.* 55 : 422-432.

Alessi, D.R., Smythe, C., et Keyse, S.M. (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene*. 8 : 2015-20.

Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer A., et Nasmyth, K. (1999) Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* 18 : 2707-21.

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K. et Sturgill T.W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*. 343 : 651-3.

Aoyagi, Y., Kameyama, K. et Takeda, T. (1992) Artificial activation of bovine oocytes matured in vitro by electric shocks or exposure to ionophore A23187. *Theriogenology*, 34 : 188.

Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y. et Sato E. (1996) Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes : activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod.* 55 : 1315-24.

- Atherton-Fessler, S., Parker, L.L., Geahlen, R.L. et Piwnica-Worms H. (1993) Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol.* 13 : 1675-85.
- Atherton-Fessler, S., Liu, F., Gabrielli, B., Lee, M.S., Peng, C.Y. et Piwnica-Worms H. (1994) Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell.* 5 : 989-1001.
- Axton, J.M., Dombradi, V., Cohen, P.T. et Glover D.M. (1990) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell.* 63 : 33-46.
- Bai, W.L., Singh, B., Karshin, W.L., Shonk, R.A. et Arlinghaus R.B. (1991) Phosphorylation of v-mos Ser 47 by the mitotic form of p34cdc2. *Oncogene.* 6 : 1715-23.
- Bailly, E., Doree, M., Nurse, P. et Bornens M. (1989) p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm ; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J.* 8 : 3985-95.
- Balakier, H. et Czolowska, R. (1977) Cytoplasmic control of nuclear maturation in mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* 110 : 466-9.
- Balakier, H. et Masui, Y. (1986) Chromosome condensation activity in the cytoplasm of anucleate and nucleate fragments of mouse oocytes. *Dev Biol.* 113 : 155-9.
- Balakier, H. et Casper, R.F. (1993) Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum. Reprod.* 8 : 740-743.
- Ballantyne, S., Daniel, D.L. Jr et Wickens M.A. (1997) dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation. *Mol Biol Cell.* 8 : 1633-48.
- Baltus, E., Brachet, J., Hanocq-Quertier, J. et Hubert, E. (1973). Cytochemical and biochemical studies on progesterone-induced maturation in amphibian oocytes. *Differentiation* 1 : 127-143.
- Bandyopadhyay, A., Bandyopadhyay, J., Choi, H.H., Choi, H.S. et Kwon, H.B. (1998) Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (*Rana dybowskii*) oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 109 : 293-301.
- Barkoff, A., Ballantyne, S. et Wickens M. (1998) Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs. *EMBO J.* 17 : 3168-75.
- Barkoff, A.F., Dickson, K.S., Gray, N.K., et Wickens M. (2000). Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol.* 220 : 97-109.
- Baud, C. et Barish, M.E. (1984) Changes in membrane hydrogen and sodium conductances during progesterone-induced maturation of *Ambystoma* oocytes. *Dev Biol.* 105 : 423-34.

- Beaulieu, E.E., Godeau, F., Schorderet, M. and Schorderet-Slatkine, S. (1978) Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes : surface and calcium. *Nature*, 275 : 593-598.
- Bellé, R., Schorderet-Slatkine, S., Drury, K.C. and Ozon, R. (1975) *In vitro* progesterone bonding to *Xenopus laevis* oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 25 : 339-345.
- Bellé, R., Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R., et Mulner-Lorillon, O. (1995) Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. *Prog Cell Cycle Res.*1 : 265-70.
- Bément W.M., Capco D.G. (1990) Protein kinase C acts downstream of calcium at entry into the first mitotic interphase of *Xenopus laevis*. *Cell Regul.* 3 : 315-26.
- Bément, W.M., et Capco, D.G. (1991) Parallel pathways of cell cycle control during *Xenopus* egg activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 : 5172-6.
- Bément W.M. (1992) Signal transduction by calcium and protein kinase C during egg activation. *J Exp Zool.* 263 : 382-97.
- Berridge, M.J. et Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 341 : 197-205.
- Bhatt, R.R. et Ferrell, J.E. Jr. (1999) The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosstatic factor activity. *Science.* 286 : 1362-5.
- Bitangcol, J.C., Chau, A.S., Stadnick, E., Lohka, M.J., Dicken, B. et Shibuya, E.K. (1998) Activation of the p42 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits Cdc2 activation and entry into M-phase in cycling *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell.* 9 : 451-67
- Bloom, T.L., Szuts, E.Z. et Eckberg, W.R. (1988) Inositol trisphosphate, inositol phospholipid metabolism, and germinal vesicle breakdown in surf clam oocytes. *Dev Biol.* 129 : 532-40.
- Bodart, J.-F., Béchar, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.-P., and Flament, S. (1999a). Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*. *FEBS lett.* 457 : 175-178.
- Bodart J.-F., Bechar D., Bertout M., Gannon J., Rousseau A., Vilain J.-P. & Flament S. (1999b) Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of Cyclin B2 and p39^{mos} proteolysis. *Exp. Cell Res.* 253 :413-421.
- Booher, R. et Beach, D. (1987) Interaction between cdc13+ and cdc2+ in the control of mitosis in fission yeast ; dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2+ protein kinase. *EMBO J.* 6 : 3441-7.
- Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. et Beach, D.H. (1989) The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58 : 485-497

Borgne, A., Ostvold, A.C., Flament, S. et Meijer, L. (1999) Intra-M phase promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* 274 : 11977-86.

Brachet, J., Hanocq, F. et Van Gansen, P.A. (1970) cytochemical and ultrastructural analysis of in vitro maturation in amphibian oocytes. *Dev Biol.* 21 : 157-95.

Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M.A., Kirk, J., Gannon, J. et Hunt, T. (1998) Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null micedie *in utero*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 : 4344-9.

Brassac, T., Castro, A., Lorca, T., Le Peuch, C., Doree, M., Labbe, J.C., et Galas, S. (2000).The polo-like kinase Plx1 prevents premature inactivation of the APC(Fizzy)-dependent pathway in the early *Xenopus* cell cycle.*Oncogene.* 19 : 3782-90.

Bravo, R., Otero, C., Allende, C.C. et Allende, J.E. (1978) Amphibian oocyte maturation and protein synthesis : related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papavérine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 : 1242-1246.

Brizuela, L., Draetta, G. et Beach, D. (1987) p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J.* 6 : 3507-14.

Burke, B. et Gerace, L.A. (1986) cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis.*Cell.* 44 : 639-52.

Burns, A.G., Islam, K. et Chapman, R. (1984) the multiple phosphorylation of microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2 : tubulin interaction. *Eur. J. Biochem.*, 141 : 609-615.

Busa, W.B., Ferguson, J.E., Joseph, S.K., Williamson, J.R. et Nuccitelli, R. (1985) Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol trisphosphate. I. Characterization of Ca²⁺ release from intracellular stores. *J Cell Biol.* 101 : 677-82.

Carrasco, D., Allende, C.C. et Allende, J.E. (1990) The incorporation of myo-inositol into phosphatidylinositol derivatives is stimulated during hormone-induced meiotic maturation of amphibian oocytes. *Exp Cell Res.* 191 : 313-8.

Charbonneau, M. et Picheral, B. (1983) Early events in anuran amphibian fertilization : an ultrastructural study of changes occurring in the course of monospermic fertilization and artificial activation. *Dev. Growth Differ.*, 25 : 23-37.

Charles, J.F., Jaspersen, S.L., Tinker-Kulberg, R.L., Hwang, L., Szidon, A., et Morgan, D.O. (1998) The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8 : 497-507.

Chen, M. et Cooper, J.A. (1995) Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol.* 15 : 4727-34.

Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D., et Murray, A.W. (1996) Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science.* 274 : 242-6.

- Chiba, K., Kado, R.T. et Jaffe, L.A. (1990) Development of calcium release mechanisms during starfish oocyte maturation. *Dev Biol.* 140 : 300-6.
- Cicirelli, M.F., Robinson, K.R. et Smith, L.D. (1983) Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev Biol.* 100 : 133-46.
- Cicirelli, M.F. et Smith, L.D. (1985) Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol.* 108 : 254-8.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., et Nasmyth, K. (1998) An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell.* 93 : 1067-76.
- Clarke, H.J. et Masui, Y. (1983) The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 97 : 291-301.
- Clarke, H.J. et Masui, Y. (1985) Inhibition by dibutyryl cyclic AMP of the transition to metaphase of mouse oocyte nuclei and its reversal by cell fusion to metaphase oocytes. *Dev Biol.* 108 : 32-7.
- Clarke, H.J., Rossant, J. et Masui, Y. (1988) Suppression of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development.* 104 : 97-103.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W. et Koshland, D. (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 10 : 3081-93.
- Colas, P., Launay, C., van Loon, A.E. et Guerrier, P. (1993a) Protein synthesis controls cyclin stability in metaphase I-arrested oocytes of *Patella vulgata*. *Exp Cell Res.* 208 : 518-21.
- Colas, P., Serras, F. et Van Loon, A.E. (1993b) Microinjection of *sucl* transcripts delays the cell cycle clock in *Patella vulgata* embryos. *Int J Dev Biol.* 37 : 589-94.
- Colas, P. et Dubé, F. (1998) Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Semin Cell Dev Biol.* 9 : 539-48.
- Collas, P. et Robl, J.M. (1990) Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43 : 877-884.
- Collas, P. et Robl, J.M. (1991) Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45 : 455-465.
- Collas, P., Fissore, R., Robl, J.M., Sullivan, E. et Barnes, F.L. (1993) Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34 : 212-223.

Colledge W.H., Carlton M.B., Udy G.B. et Evans M.J. (1994) Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370 : 65-8.

Colonna, R., Taton, C., Masgalori, A., Eusebi, F. et Mangia, F. (1989) Effects of PKC stimulation and free calcium rise in mammalian egg activation. *Gamete Res.*, 24 : 171-183.

Conklin, D.S., Galaktionov, K. et Beach, D. (1995) 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 : 7892-6.

Coux, O., Tanaka, K., et Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 65 : 801-47.

Cran, D.G., Moor, R.M. et Irvine, R.F. (1988) Initiation of the cortical reaction in hamster and sheep oocytes in response to inositol trisphosphate. *J Cell Sci*. 91: 139-44.

Cross, N.L. et Elinson, R.P. (1980) A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. *Dev Biol*. 75 : 187-98.

Daar, I., Paules, R.S. et Vande Woude, G.F. (1991) A characterization of cytotostatic factor activity from *Xenopus* eggs and c-mos-transformed cells. *J Cell Biol*. 114 : 329-35.

Daar, I., Yew, N. et Vande Woude, G.F. (1993) Inhibition of mos-induced oocyte maturation by protein kinase A. *J Cell Biol*. 120 : 1197-202.

De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. et Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 363 : 595-602.

Deguchi, R., Osanai, K. et Morisawa, M. (1996) Extracellular Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores function at fertilization in oocytes of the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Development*. 122 : 3651-60.

de Moor C.H., Richter J.D. (1997) The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol*. 17 : 6419-26.

Deng, M.Q. et Shen, S.S. (2000) A specific inhibitor of p34(cdc2)/cyclin B suppresses fertilization-induced calcium oscillations in mouse eggs. *Biol Reprod*. 62 : 873-8.

Descombes, P. et Nigg, E.A. (1998) The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J*. 17 : 1328-35.

Doonan, J.H. et Morris, N.R. (1989) The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*. 1989 57 : 987-96.

Drury, K.C., et Schorderet-Slatkine, S. (1975) Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturationpromoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell*. 4 : 269-74.

Dubé, F. et Dufresne, L. (1990) Release of metaphase arrest by partial inhibition of protein synthesis in blue mussel oocytes. *J. Exp. Zool*. 256 :323-332.



Ducibella, T., Kurasawa, S., Duffy, P., Kopf, G.S. et Schultz, R.M. (1993) Regulation of the polyspermy block in the mouse egg : maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5 triphosphatase and an activator of protein kinase C. *Biol. Reprod.* 48 : 1251-1257.

Duesbery N.S, Masui Y. (1996a) The role of microtubules and inositol triphosphate induced Ca^{2+} release in the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in extracts of *Xenopus laevis* oocytes. *Zygote.* 4 : 21-30.

Duesbery, N.S. et Masui, Y. (1996b) the role of Ca^{2+} in progesterone-induced germinal vesicle breakdown of *Xenopus laevis* oocytes : the synergic effects of microtubule depolymerization and Ca^{2+} . *Dev. Gen. Evol.*, 206 : 110-124.

Duesbery, N.S., Choi, T., Brown, K.D., Wood, K.W., Resau, J. et Fukasawa, K., Cleveland D.W., et Vande Woude, G.F. (1997) 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 : 9165-70.

Dufresne-Dubé, L., Dubé, F., Guerrier, P. et Couillard, P. (1983) Absence of a complete block to polyspermy after fertilization of *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes. *Dev. Biol.* 97 : 27-33.

Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136 : 153-180.

Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D., et Newport, J. (1988). The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell.* 54 : 423-31.

Dunphy, W.G., et Newport, J.W. (1989) Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell* 58 : 181-91.

Dupont, G., McGuinness, O.M., Johnson, M.H., Berridge, M.J., et Borgese, F. (1996) Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of beta and gamma isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. *Biochem J.* 316 : 583-91.

Elinson R.P. (1977) Fertilization of immature frog eggs: cleavage and development following subsequent activation. *J Embryol Exp Morphol.* 37 : 187-201.

Erikson, E., et Maller, J.L. (1985) A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 : 742-6.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., et Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33 : 389-96.

Fabian, J.R., Morrison, D.K., et Daar, I.O. (1993) Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol.* 122 : 645-52.

- Falkenstein, E., Meyer, C., Eisen, C., Scriba, P.C., et Wehling, M. (1996) Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 229 :86-9.
- Fang, G., Yu, H., et Kirschner, M.W. (1998a) Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell.* 2 : 163-71.
- Fang, G., Yu, H., et Kirschner, M.W. (1998b) 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 : 1871-83.
- Farr, K.A., et Hoyt, M.A. (1998) Bub1p kinase activates the *Saccharomyces cerevisiae* spindle assembly checkpoint. *Mol Cell Biol.* 18 : 2738-47.
- Fattaey, A., et Booher, R.N (1997). Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog Cell Cycle Res.* 3 : 233-40.
- Faure, S., Morin, N., et Doree, M. Inactivation of protein kinase A is not required for c-mos translation during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Oncogene.* 17 : 1215-21.
- Fautrez, J. et Fautrez-Firlefyn, N. (1961) *Arch. Biol.* 72 : 611-626.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L., et Kornberg, R.D. (1994) Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell.* 79 : 1103-9.
- Fellous, A., Kubelka, M., Thibier, C., Taieb, F., Haccard, O., et Jessus, C. (1994) Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Int J Dev Biol.* 38 : 651-9.
- Ferby, I., Blasquez, M., Palmer, A., Eritja, R. et Nebreda, A.R. (1999) A novel p34cdc2-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M transition in *Xenopus* oocytes, *Genes & Dev* 13, 217-2189
- Félix, M.-A., Labbé, J.-C., Dorée, M., Hunt, T., and Karsenti, E. (1990). Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature* 346 : 379-382.
- Ferrell, J.E., Wu, M., Gerhart, J.C., and Martin, G.S. (1991). Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 1965-1971.
- Fernandez, A., Brautigan, D.L., Lamb, N.J. (1992) Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J Cell Biol.* 116 : 1421-30.
- Fesquet, D., Labbe, J.C., Derancourt, J., Capony, J.P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., Cavadore, J.C. (1993) The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* 12 :3111-21.

Fesquet, D., Morin, N., Doree, M., Devault, A. (1997) Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling *Xenopus* egg extracts? *Oncogene*. 11 : 1303-7.

Fesquet, D., Fitzpatrick, P.J., Johnson, A.L., Kramer, K.M., Toyn, J.H., et Johnston, L.H. (1999) A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *EMBO J*. 18 : 2424-34.

Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J., et Baulieu, E.E. (1981) Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*. 292 : 255-7.

Fisher, R.P., et Morgan, D.O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*. 78 : 713-24.

Fisher, D.L., Mandart, E., et Doree, M. (2000) Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 19 : 1516-24.

Flament, S., Browaeys, E., Rodeau, J. L., Bertout, M., and Vilain, J. P. (1996). *Xenopus* oocyte maturation : cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 471-476.

Flament, S., Bodart, J.-F., Browaeys, E., Bertout, M., Rousseau, A., Gannon, J., and Vilain, J.-P. (1997). Procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor. *Zygote* 5, 11-19.

Flament, S., Bodart, J.F., Bertout, M., Browaeys, E., Rousseau, A., et Vilain, J.P. (2000) Differential effects of 6-DMAP, olomoucine and roscovitine on *Xenopus* oocytes and eggs. *Zygote*. 8 : 3-14.

Foltz, K.R, et Shilling, F.M. (1993) Receptor-mediated signal transduction and egg activation. *Zygote*. 1 : 276-9.

Fontanilla, R.A., et Nuccitelli, R. (1998) Characterization of the sperm-induced calcium wave in *Xenopus* eggs using confocal microscopy. *Biophys J*. 75 : 2079-87.

Fortuné, J.E., Concannon, P.W. et Hansel, W. (1975) Ovarian progesterone levels in *in vitro* oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.*, 13 : 561-567.

Frank-Vaillant, M., Jesus, C., Ozon, R., Maller, J.L. et Haccard, O. (1999). Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in *Xenopus* oocytes in response to progesterone. *Mol. Biol. Cell* 10 : 3279-3288.

Fraschini, R., Formenti, E., Lucchini, G., et Piatti, S. (1999) Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol.* 145 : 979-91.

Freeman R.S., Pickham K.M., Kanki J.P., Lee B.A., Pena S.V., et Donoghue D.J. (1989) *Xenopus* homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 : 5805-9.

Freeman, R.S., Meyer, A.N., Li, J., et Donoghue, D.J. (1992) 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 : 725-35.

Fukasawa, K., et Vande Woude, G.F. (1995) Mos overexpression in Swiss 3T3 cells induces meiotic-like alterations of the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 : 3430-4.

Fulka, J. Jr, First, N.L., Lee, C., Fulka, J., et Moor, R.M. Induction of DNA replication in germinal vesicles and in nuclei formed in maturing mouse oocytes by 6-DMAP treatment. *Zygote.* 5 : 213-7.

Funabiki, H., Kumada, K., et Yanagida, M. (1996a) Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.* 15 : 6617-28.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., et Yanagida, M. (1996b) Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature.* 381 : 438-41.

Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., Sagata, N. (1994) Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 13 : 2399-410.

Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N. & Sagata, N. (1997) Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase. *EMBO J.* 16 : 3860-65.

Gabrielli, B.G., Roy, L.M. & Maller, J.L. (1993) Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* 259 : 1766-69.

Galione, A., McDougall, A., Busa, W.B., Willmott, N., Gillot, I., Whitaker, M. (1993) Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* 261 : 348-52.

Gallant, P., Nigg, E.A. (1992) Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol.* 117 : 213-24.

Gallicano, G.I., Schwartz, S.M., McGaughey, R.W. et Capco, D.G. (1993) Protein Kinase C, a pivotal regulator of hamster egg activation, functions after elevation of intracellular free calcium. *Dev. Biol.* 156, 94-106.

Gallo, C.J., Hand, A.R., Jones, T.L. et Jaffe, L.A. (1995) Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *J Cell Biol.* 130 : 275-84.

Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., Maller, J.L. (1990) Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell.* 60 : 487-94.

Gautier, J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F., Kirschner, M.W. (1991) cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell.* 67 : 197-211.

- Gavin, A.C., Nebreda, A.R. (1999) A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Curr Biol.* 9 : 281-4.
- Gebauer, F., Xu, W., Cooper, G.M., Richter, J.D. (1994) Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *EMBO J.* 13 : 5712.
- Gerhart, J., Wu, M. and Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* 98, 1247-55.
- Ghosh, S., Paweletz, N. (1992) Okadaic acid inhibits sister chromatid separation in mammalian cells. *Exp Cell Res.* 200(1) : 215-7.
- Giusti, A.F., Carroll, D.J., Abassi, Y.A., Terasaki, M., Foltz, K.R., Jaffe, L.A. (1999) Requirement of a Src family kinase for initiating calcium release at fertilization in starfish eggs. *J Biol Chem.* 274(41) : 29318-22.
- Glahn, D., Mark, S.D., Behr, R.K., Nuccitelli, R. (1999) Tyrosine kinase inhibitors block sperm-induced egg activation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 205(1) : 171-80.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P., Baulieu, E.E. (1978) Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75 : 2353-7.
- Gorbsky, G.J., Chen, R.H., et Murray, A.W. (1998) Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol.* 141 : 1193-205.
- Gordon, D.M., et Roof, D.M. (1997) Kip1p, a kinesin-related motor protein is a substrate for APC-mediated proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 8, 813.
- Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R., Merlevede, W. (1989) Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* 245 : 91-4.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Matsuda, S., Shiina, N., Kosako, H., Shiokawa, K., Akiyama, T., Ohta, K., Sakai, H. (1991) In vitro effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature.* 349 : 251-4.
- Gotoh, Y., Masuyama, N., Suzuki, A., Ueno, N., Nishida, E. (1995) Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *EMBO J.* 14 : 2491-8.
- Grandin, N., Charbonneau, M. (1992) The increase in intracellular pH associated with *Xenopus* egg activation is a Ca(2+)-dependent wave. *J Cell Sci.* 101 : 55-67.
- Grey, R.D., Wolf, D.P., Hedrick, J.L. Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 36 : 44-61.

Grey, R.D., Working, P.K., Hedrick, J.L. (1976) Evidence that the fertilization envelope blocks sperm entry in eggs of *Xenopus laevis* : interaction of sperm with isolated envelopes. *Dev Biol.* 54 : 52-60.

Grocholova, R., Petr, J., Rozinek, J., Jilek, F. (1997) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid inhibits exit from metaphase II in parthenogenetically activated pig oocytes. *J. Exp. Zool.* 277 : 49-56.

Gross, S.D., Schwab, M.S., Lewellyn, A.L., Maller, J.L. (1999) Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science.* 286 : 1365-7.

Gross, S.D., Schwab, M.S., Taieb, F.E., Lewellyn, A.L., Qian, Y.W., Maller, J.L. (2000) The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol.* 10 : 430-8.

Guo, X.W., Th'ng, J.P., Swank, R.A., Anderson, H.J., Tudan, C., Bradbury, E.M., Roberge, M. (1995) Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J.* 14 : 976-85.

Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J.L. (1993) Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262 : 1262-1265.

Hague, F., Matifat, F., Brule, G., Collin, T. (1999) The inositol (1,4,5)-trisphosphate 3-kinase of *Xenopus* oocyte is activated by CaMKII and involved in the regulation of InsP3-mediated Ca²⁺ release. *FEBS Lett.* 449 : 70-4.

Hake, L.E., Richter, J.D. (1994) CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell.* 79 : 617-27.

Hamaguchi, Y., Hiramoto, Y. (1981) Activation of sea urchin eggs by microinjection of calcium buffers. *Exp Cell Res.* 134 : 171-9.

Han, J.K., Lee, S.K. (1995) Reducing PIP₂ hydrolysis, Ins(1,4,5)P₃ receptor availability, or calcium gradients inhibits progesterone-stimulated *Xenopus* oocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 217 : 931-9.

Hartley, R.S., Lewellyn, A.L., Maller, J.L. (1994) MAP kinase is activated during mesoderm induction in *Xenopus laevis* . *Dev. Biol.* 163 : 521-524.

Hashimoto, N. & Kishimoto, T. (1988) Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 126 : 242-52.

Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okasaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa (1994). *Nature* 370 : 68-71.

Hashimoto, N. (1996) Role of c-mos proto-oncogene product in the regulation of mouse oocytematuration. *Horm Res.* 46 : 11-4.

Havlicek, L., Hanus, J., Vesely, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., et Strnad, M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors : synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem.* 40 : 408-12.

Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., Nurse, P. (1986) The fission yeast cell cycle control gene *cdc2* : isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet.* 202 : 291-3.

Heald, R., McKeon, F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamin disassembly in mitosis. *Cell.* 61 : 579-89.

Hershko, A. (1991) Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *J. Biol. Chem.* 266 : (25) 16376-16379.

Hershko, A., Ganoth, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L.H., Luca, F.C., Ruderman, J.V., et Eytan, E. (1994) Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase *cdc2*. *J Biol Chem.* 269 : 4940-6.

Hindley, J., Phear, G.A. (1984) Sequence of the cell division gene *CDC2* from *Schizosaccharomyces pombe* ; patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene.* 31 : 129-34.

Hisamoto, N., Sugimoto, K. et Matsumoto, K. (1994) The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol. Cell. Biol.* 14 : 3158-3165.

Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L. (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol.* 1 : 60-7.

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

Hollinger, T.G., Schuetz, A.W. (1976) "Cleavage" and cortical granule breakdown in *Rana pipiens* oocytes induced by direct microinjection of calcium. *J Cell Biol.* 71 : 395-401.

Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W., et Murray, A.W. (1993) Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell.* 73 : 1393-402.

Howard, E.L., Charlesworth, A., Welk, J., MacNicol, A.M. (1999) The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates *mos* mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* 19 : 1990-9.

Huang, W., Kessler, D.S., Erikson, R.L. (1995) Biochemical and biological analysis of *Mek1* phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell.* 6 : 237-45.

Huchon, D., Crozet, N., Cantenot, N., Ozon, R. (1981) Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte : description of a transient microtubular structure. *Reprod Nutr Dev.* 21 : 135-48.

Huchon, D., Rime, H., Jesus, C., Ozon, R. (1993) Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte : effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biol Cell.* 77 : 133-41.

Hunt, T. (1991) Cyclins and their partners : from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol.* 2 : 213-22.

Hwang, L.H., et Murray, A.W. (1997) A novel yeast screen for mitotic arrest mutants identifies DOC1, a new gene involved in cyclin proteolysis. *Mol Biol Cell.* 8 : 1877-87.

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., et Nasmyth, K. (1995) Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 81 : 269-78.

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 : 345-8.

Ishii, K., Kumada, K., Toda, T., Yanagida, M. (1996) Requirement for PP1 phosphatase and 20S cyclosome/APC for the onset of anaphase is lessened by the dosage increase of a novel gene *sds23+*. *EMBO J.* 15(23) : 6629-40.

Ishikawa, K., Hanaoka, Y., Kondo, Y., Imai, K. (1977) Primary action of steroid hormone at the surface of amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown. *Mol Cell Endocrinol.* 9 : 91-100.

Iwao, Y., Masui, Y. (1995) Activation of newt eggs in the absence of Ca^{2+} activity by treatment with cycloheximide or D_2O . *Develop. Growth Differ.* 37 : 641-51.

Izumi, T., Walker, D.H., Maller, J.L. (1992) Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell.* 3 : 927-39.

Izumi, T., Maller, J.L. (1993) Elimination of *cdc2* phosphorylation sites in the *cdc25* phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell.* 4 : 1337-50.

Izumi, T., Maller, J.L. (1995) Phosphorylation and activation of the *Xenopus Cdc25* phosphatase in the absence of *Cdc2* and *Cdk2* kinase activity. *Mol Biol Cell.* 6 : 215-26.

Jackman, M., Firth, M., Pines, J. (1995) Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures : B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.* 14 : 1646-54.

Jacobelli, S., Hanocq, J., Baltus, E., Brachet, J. (1974) Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes : effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor. *Differentiation.* 2 : 129-35.

Jaffe, L.A. (1990) First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil Suppl.* 42 : 107-16.

Jaffe, L.F. (1991) The path of calcium in cytosolic calcium oscillations : a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 : 9883-7.

Jaspersen, S.L., Charles, J.F., Morgan, D.O. (1999) Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol.* 9 : 227-36.

Jessus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W., Ozon, R. (1991) Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* 111 : 813-820.

Juang, Y.L., Huang, J., Peters, J.M., McLaughlin, M.E., Tai, C.Y., et Pellman, D. (1997) APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science.* 275 : 1311-4.

Kallio, M., Weinstein, J., Daum, J.R., Burke, D.J., et Gorbsky, G.J. (1998) Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol.* 141 : 1393-406.

Kang, M.G., Kulisz, A., Wasserman, W.J. (1998) Raf-1 kinase, a potential regulator of intracellular pH in *Xenopus* oocytes. *Biol Cell.* 90 : 477-85.

Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C., Ozon, R. (1998) MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp Cell Res.* 244(2) : 491-500.

Karaiskou, A., Jessus, C., Brassac, T., Ozon, R. (1999) Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci.* 112 : 3747-56.

Kato, T., Hara, A., Nakayama, T., Sawada, H., Hamatake, M., Matsumoto, Y. (1986) Purification and characterization of purple acid phosphatase from rat bone. *Comp Biochem Physiol B.* 83 : 813-7.

Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., et Matsumoto, T. (1998) Fission yeast Slp1 : an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science.* 279 : 1045-1047.

King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., Kirschner, M.W. (1995) A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81 : 279-288.

Kishimoto, T., Kanatani, H. (1976) Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature.* 260 : 321-2.

Kishimoto, T. (1994) Cell reproduction : induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int. J. Dev. Biol.* 38 : 185-191.

- Kline, D., et Nuccitelli, R. (1985) The wave of activation current in the *Xenopus* egg. *Dev Biol.* 111 : 471-87.
- Kline, D. (1988) Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg : injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol.* 126 : 346-61.
- Kline, D., Kline, J.T. (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol.* 149 : 80-9.
- Kline, D. (1996) Activation of the mouse egg. *Theriogenology.* 45 : 81-90.
- Kobayashi, H., Minshull, J., Ford, C., Golsteyn, R., Poon, R., Hunt, T. (1991) On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol.* 114 : 755-65.
- Kobrinsky, E., Ondrias, K., Marks, A.R. (1995) Expressed ryanodine receptor can substitute for the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Xenopus laevis* oocytes during progesterone-induced maturation. *Dev Biol.* 172 : 531-40.
- Koepp, D.M., Harper, J.W., et Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* 97 : 431-4.
- Kornbluth S, Sebastian B, Hunter T, Newport J. (1994) Membrane localization of the kinase which phosphorylates Cell. 5 : 273-82.
- Kosako, H., Gotoh, Y., Nishida, E. (1994) Mitogen-activated protein kinase kinase is required for mos-induced metaphase-arrest. *J. Biol. Chem.* 269 : 28354-28358.
- Kosako, H., Akamatsu, Y., Tsurushita, N., Lee, K.K., Gotoh, Y., Nishida, E. (1996) Isolation and characterization of neutralizing single-chain antibodies against *Xenopus* mitogen-activated protein kinase kinase from phage display libraries. *Biochemistry* 35 : 13212-21.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., et Todokoro, K. (1998) PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell.* 1 : 371-80.
- Kotani, S., Tanaka, H., Yasuda, H., et Todokoro, K. (1999) Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J Cell Biol.* 146 : 791-800.
- Kramer, E.R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., et Peters, J.M. (1998) Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol.* 8 : 1207-10.
- Krek, W., Nigg, E.A. (1991) Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells : evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation invertebrates. *EMBO J.* 10 : 3331-41.

- Krek, W., Nigg, E.A. (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle : identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* 10 : 305-16.
- Kubiak, J.Z., Weber, M., Geraud, G., Maro, B. (1992) Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *J Cell Sci.* 102 : 457-67.
- Kubiak, J.Z., Weber, M., de Pennart, H., Winston, N.J., Maro, B. (1993) The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J.* 12 : 3773-8.
- Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., Funabiki, H., Nakagawa, T., et Yanagida, M. (1998) Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr Biol.* 8 : 633-41.
- Kumagai, A., Dunphy, W.G. (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell.* 64 : 903-14.
- Kumagai, A., Dunphy, W.G. (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell.* 70 : 139-51.
- Kumagai, A., Dunphy, W.G. (1996) Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science.* 273 : 1377-80.
- Kumagai, A., Yakowec, P.S., Dunphy, W.G. (1998) 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell.* 9 : 345-54.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K.H., Wang, S.X., Dunphy, W.G. (1998) The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of check point control in cell-free extracts. *J Cell Biol.* 142 : 1559-69.
- Kume, S., Yamamoto, A., Inoue, T., Muto, A., Okano, H., et Mikoshiba, K. (1997) Developmental expression of the inositol 1,4,5 triphosphate receptor and structural changes in the endoplasmic reticulum during oogenesis and meiotic maturation of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 182 : 228-239.
- Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J.V., et Hershko, A. (1995) Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 : 9303-7.
- Lamb, J.R., Michaud, W.A., Sikorski, R.S., et Hieter, P.A. (1994) Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* 13 : 4321-8.
- Larabell, C., Nuccitelli, R. (1992) Inositol lipid hydrolysis contributes to the Ca²⁺ wave in the activating egg of *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 153 : 347-55.
- Laurent, A., Basset, M., Doree, M., Le Peuch, C.J. (1988) Involvement of a calcium-phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* 226 : 324-30.

- Leal, C.L., et Liu, L. (1998) Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. *Anim Reprod Sci.* 52 : 51-61.
- Lechleiter, J.D., Clapham, D.E. (1992) Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes. *Cell.* 69 : 283-94.
- Lee, S.C., Steinhardt, R.A. (1981) pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 85 : 358-69.
- Lee, M.S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L.L., Donoghue, D.J., Maller, J.L., Piwnica-Worms, H. (1992) *cdc25+* encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol Biol Cell.* 3 : 73-84.
- Lenormand, J.L., Dellinger, R.W., Knudsen, K.E., Subramani, S., Donoghue, D.J. (1999) *Speedy* : a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO J.* 18 : 1869-77.
- Lewis, T., Groom, L.A., Sneddon, A.A., Smythe, C., Keyse, S.M. (1995) XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from : its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development. *J Cell Sci.* 108 : 2885-96.
- Li, R. et Murray, A.W. (1991) Feed-back control of mitosis in budding yeast. *Cell.* 66 : 519-531.
- Li, Y. et Benezra, R. (1996) Identification of a human mitotic checkpoint gene : *hsMAD2*. *Science.* 274 : 246-248.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., et Benezra, R. (1997) *Mad2* associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 12431-12436.
- Liu, Z., Patino, R. (1993) High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes : characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod.* 49 : 980-8.
- Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. (1997) The human *Myt1* kinase preferentially phosphorylates *Cdc2* on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol.* 17 : 571-83.
- Liu, L., Ju, J.C., et Yang, X. (1998) Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev.* 49 : 298-307.
- Liu, L. et Yang, X. (1999) Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod.* 61 : 1-7.
- Lohka, M.J., Hayes, M.K., Maller, J.L. (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 : 3009-13.
- Lorca, T., Galas, S., Fesquet, D., Devault, A., Cavadore, J.C., Doree, M. (1991) Degradation of the proto-oncogene product *p39mos* is not necessary for cyclin proteolysis and exit from

meiotic metaphase : requirement for a Ca(2+)-calmodulin dependent event. EMBO J. 10 : 2087-93.

Lorca, T., Fesquet, D., Zindy, F., Le Bouffant, F., Cerruti, M., Brechot, C., Devauchelle, G., Doree, M. (1991) An okadaic acid-sensitive phosphatase negatively controls the cyclin degradation pathway in amphibian eggs. Mol Cell Biol. 11 : 1171-5.

Lorca, T., Labbé, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.-P., Cavadore, J.-C., Le Bouffant, F., and Dorée, M. (1992) Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. EMBO J. 11 : 2381-2390.

Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.-C., Méry, J., Means, A., and Dorée, M. (1993) Calmodulin-dependent kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. Nature 366 : 270-273.

Lorca, T., Castro, A., Martinez, A.M., Vigneron, S., Morin, N., Sigrist, S., Lehner, C., Doree, M., Labbe, J.C. (1998) Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts. EMBO J. 17 : 3565-75.

Luca, F., and Ruderman, J. (1989) Control of programmed cyclin destruction in a cell-free system. J. Cell Biol. 109 : 1895-1909.

McGarry, T.J., et Kirschner, M.W. (1998) Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. Cell. 93 : 1043-53.

McGowan, C.H., Russell, P. (1995) Cell cycle regulation of human WEE1. EMBO J. 14(10) : 2166-75.

Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J., Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. Nature. 371 : 254-7.

Maller, J.L., Wu, M. & Gerhart, J.C. (1977) Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. Dev. Biol. 58 : 295-312.

Maller, J.L., Krebs, E.G. (1977) Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. J Biol Chem. 252 : 1712-8.

Maller, J.L., Butcher, F.R., Krebs, E.G. (1979) Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem. 254 : 579-82.

Maller, J.L., Krebs, E.G. (1980) Regulation of oocyte maturation. Current topics in cellular regulation 16 : 271-310.

Maller, J.L. (1987) Mitogenic signalling and protein phosphorylation in *Xenopus* oocytes. J. Cyclic Nuc. Prot. Phod. Res. 11 : 543-555.

Maller, J.L. (1998) Recurring themes in oocyte maturation. Biol Cell. 90 : 453-60.

- Maro, B., Johnson, M.H., Webb, M., et Flach, G. (1986) Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte : an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol.* 92 : 11-32.
- Martinez, A.M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J.C., Labbe, J.C., Doree, M. (1997) Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7 : its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 16 : 343-54.
- Masui, Y. (1967) Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool.* 166 : 365-75.
- Masui, Y., Markert, C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129-146
- Masui, Y. (1974) A cytostatic factor in amphibian oocytes : its extraction and partial characterization. *J. Exp. Zool.* 187 : 141-147.
- Masui, Y., Clarke, H.J. (1979) Oocyte maturation. *Int Rev Cytol.* 57 : 185-282.
- Matic, G., Trajkovic, D. (1986) The effect of alkaline phosphatase on the activation of glucocorticoid-receptor complexes in rat liver cytosol. *Int J Biochem.* 18 : 841-5.
- Matten, W., Daar, I., Vande Woude, G.F. (1994) Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* 14 : 4419-26.
- Matten, W.T., Copeland, T.D., Ahn, N.G., and Vande Woude, G.F. (1996) Positive feedback between MAP kinase and mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev. Biol.* 179 : 485-492.
- Mayes, M.A., Stogsdill, P.L., et Prather, R.S. (1995) Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. *Biol Reprod.* 53 : 270-5.
- Meijer, L., Azzi, L., Wang, J.Y. (1991) Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 10 : 1545-54.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P.J., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P. (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 243 : 527-536.
- Mendez, R., Hake, L.E., Andresson, T., Littlepage, L.E., Ruderman, J.V., Richter, J.D. (2000) Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mosmRNA. *Nature.* 404 : 302-7.
- Meyer, C., Schmid, R., Scriba, P.C. (1996) Wehling M. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem.* 239 : 726-31.
- Meyerhof, P.G., Masui, Y. (1977) Ca and Mg control of cytoplasmic factors from *Rana pipiens* eggs which cause metaphase and cleavage arrest *Dev. Biol.* 61 : 214-229.

- Meyerhof, P.G., Masui, Y. (1979) Chromosome condensation activity in *Rana pipiens* eggs matured in vivo and in blastomeres arrested by cytostatic factor (CSF). *Exp Cell Res.* 123 : 345-53.
- Meyerhof, P.G., Masui, Y. (1979) Properties of a cytostatic factor from *Xenopus laevis* eggs. *Dev Biol.* 72 : 182-7.
- Miake-Lye, R., Newport, J. et Kirschner, M.W. (1983) Maturation-promoting factor induces nuclear envelope breakdown in cycloheximide arrested embryos of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc.* 215 : 491-497.
- Millar, J.B., Russell, P. (1992) The *cdc25* M-phase inducer : an unconventional protein phosphatase. *Cell.* 68 : 407-10.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J.V., Wu, M., Hunt, T. (1989) The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl.* 12 : 77-97.
- Minshull, J., Golsteyn, R., Hill, C.S., Hunt, T. (1990) The A- and B-type cyclin associated *cdc2* kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J.* 9 : 2865-75.
- Minshull, J., Murray, A., Colman, A., et Hunt, T. (1991) *Xenopus* oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol.* 114 : 767-72.
- Minshull, J., Sun, H., Tonks, N.K., Murray, A.W. (1994) A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 79 : 475-86.
- Miyazaki, S. (1988) Inositol 1,4,5 triphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell Biol.* 106 : 345-353.
- Mohri, T., et Hamaguchi, Y. (1991) Propagation of transient Ca^{2+} increase in sea urchin eggs upon fertilization and its regulation by microinjecting EGTA solution. *Cell Struct Funct.* 2 : 157-65.
- Moreno, S., Hayles, J., et Nurse, P. (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell.* 58 : 361-72.
- Morill, G.A., Kostellow, A.B., Mahajan, S. et Gupka, R.K. (1984) Role of calcium in regulating intracellular pH following the stepwise release of the metabolic block at first meiotic and second meiotic metaphase in amphibian oocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 804 : 107-117.
- Moore, G.D., Kopf, G.S. et Schultz R.M. (1995) Differential effect of activators of protein kinase C on cytoskeletal changes in mouse and hamster eggs. *Dev Biol.* 170 : 519-30.
- Morrison, T., Waggoner, L., Whitworth-Langley, L., et Stith, B.J. (2000) Nongenomic action of progesterone : activation of *Xenopus* oocyte phospholipase C through a plasma membrane-associated tyrosine kinase. *Endocrinology.* 141 : 2145-52.

- Moses, R.M., et Masui, Y. (1990) Cytostatic factor (CSF) activity in cytosols extracted from *Xenopus laevis* eggs. *Exp Cell Res.* 186 : 66-73.
- Moses, R.M. & Masui, Y. (1994) Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J.Exp. Zool.* 270 : 211-218.
- Moses, R.M., Kline, D. & Masui, Y. (1995) Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium- and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. *Dev. Biol.* 167 : 329-337.
- Moses, R.M., Kline, D. (1995) Release of mouse eggs from metaphase arrest by protein synthesis inhibition in the absence of a calcium signal or microtubule assembly. *Mol Reprod Dev.* 41 : 264-73.
- Moses, R.M., et Masui, Y. (1995) Metaphase arrest in newly matured or microtubule-depleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zygote.* 3 : 1-8.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., et Dunphy, W.G. (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science.* 270 : 86-90.
- Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Cormier, P., Labbe, J.C., Doree, M., et Belle, R.(1989) Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *FEBS Lett.* 251 : 219-24.
- Murakami, M., and Vande Woude, G.F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *mos*. *Development* 125 : 237-248.
- Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339 : 280-286.
- Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339 : 275-280.
- Nagai, T. (1987) Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res.* 16 : 243-9.
- Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K., Sagata, N. (2000) Absence of *Wee1* ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* 14 : 328-38.
- Néant, I., et Guerrier, P. (1988a) Meiosis reinitiation in the mollusc *Patella vulgata*. Regulation of MPF, CSF and chromosome condensation activity by intracellular pH, protein synthesis and phosphorylation. *Development.* 102 : 502-516.
- Néant, I., Guerrier, P. (1988b). 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* 176 : 68-79.

- Néant, I., Dufresne, L., Morasse, J., Gicquaud, C., Guerrier, P., Dube, F. (1994) The release from metaphase arrest in blue mussel oocytes. *Int J Dev Biol.* 38 : 513-23.
- Néant, I., Dube, F. (1996) DNA replication initiation by 6-DMAP treatment in maturing oocytes and dividing embryos from marine invertebrates. *Mol Reprod Dev.* 44 : 443-51.
- Nebreda, A.R., Hunt, T. (1993) The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 12 : 1979-86.
- Nebreda, A.R., Porras, A., Santos, E. (1993) p21ras-induced meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in the absence of protein synthesis : MPF activation is preceded by activation of MAP and S6 kinases. *Oncogene.* 8 : 467-77.
- Nebreda, A.R., Gannon, J.V., Hunt, T. (1995) Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 14 : 5597-607.
- Nielsen, P.J., Thomas, G., Maller, J.L. (1982) Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79 : 2937-41.
- Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases : key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 17 : 471-80.
- Nilsson, I., et Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res.* 4 : 107-14.
- 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 : 2433-46.
- Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y., Sagata, N. (1993) Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro²)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs : possible significance of natural selection for Pro² in Mos. *EMBO J.* 12 : 4021-4027.
- Norbury, C., Blow, J., et Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* 10 : 3321-9.
- Norbury, C., Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 61 : 441-70.
- Nuccitelli, R., Kline, D., Busa, W.B., Talevi, R., Campanella, C.A. (1988) Highly localized activation current yet widespread intracellular calcium increase in the egg of the frog, *Discoglossus pictus*. *Dev Biol.* 130 : 120-32.
- Nuccitelli, R., Yim, D.L., Smart, T. (1993) The sperm-induced Ca²⁺ wave following fertilization of the *Xenopus* egg requires the production of Ins(1, 4, 5)P₃. *Dev Biol.* 158 : 200-12.

- O'Connor, C.M. et Smith, L.D. (1976) Inhibition of oocyte maturation by theophylline : possible mechanism of action. *Dev. Biol.* 52 : 3183-22.
- O'Keefe, S.J., Wolfes, H., Kiessling, A. et Cooper, G.M. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 7038-7042.
- Okhura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T., et Yanagida, M. (1989) The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one or two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*. 57 : 997-1007.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., Kishimoto, T. (1992) Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J.* 11 : 1763-72.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J.C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T.J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K., Kishimoto, T. (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol.* 128 : 849-62.
- Ozil, J.P. (1990) The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*. 109 : 117-27.
- Swann, K., et Ozil, J.P. (1994) Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. 152 : 183-222.
- Ozil, J.P., Swann, K. (1995) Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J. Physiol.* 483 : 331-46.
- Ozon, R., Belle, R. (1973) Progesterone receptor associated with the "melanosome" fraction of *Pleurodeles waltlii* oocytes (Urodela amphibian). *Biochim Biophys Acta.* 320 : 588-93.
- Palmer, A., Gavin, A.C., Nebreda, A.R. (1998) A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation : p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17 : 5037-47.
- Paris, J., et Philippe, M. (1990) Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early *Xenopus* development. *Dev Biol.* 140 : 221-4.
- Paris, J., Le Guellec, R., Couturier, A., Le Guellec, K., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill, S., et Philippe, M. (1991) Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 : 1039-43.
- Parker, I., Ivorra, I. (1991) Inositol tetrakis phosphate liberates stored Ca²⁺ in *Xenopus* oocytes and facilitates responses to inositol trisphosphate. *J Physiol.* 433 : 207-27.
- Parker, L.L., et Piwnicka-Worms, H. (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science.* 257 : 1955-7.

Parrington, J., Jones, K.T., Lai, A., Swann, K. (1999) The soluble sperm factor that causes Ca²⁺ release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca²⁺ oscillations after injection into mouse eggs. *Biochem J.* 341 : 1-4.

Parys, J.B., Sernett, S.W., DeLisle, S., Snyder, P.M., Welsh, M.J., Campbell, K.P. (1992) Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem.* 267 : 18776-82.

Patra, D., et Dunphy, W.G. (1996) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* 10 : 1503-15.

Patra, D., and Dunphy, W.G. (1998) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* 12 : 2549-2559.

Paules, R.S., Buccione, R., Moschel, R.C., Vande Woude, G.F. et Epig J.J. (1989) Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 5395-5399.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., Nigg, E.A. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* 61 : 591-602.

Peter, M., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Nigg, E.A. (1992) Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *Eur J Biochem.* 205 : 287-94.

Peters, J.M. (1994) Proteasomes : protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* 19 : 377-382.

Peters, J.M., King, R.W., Hoog, C., Kirschner, M.W. (1996) Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science.* 274 : 1199-201.

Peters, J.M., King, R.W., et Deshaies, R.J. (1998) Cell cycle control by ubiquitin-dependent proteolysis. In "ubiquitin and the biology of the cell" (J.M. Peters, J.R. Harris and D. Finley, Eds.) pp. 345-387, Plenum, New York.

Peters, J.M. (1998) SCF and APC : the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol.* 10 : 759-68.

Peters, J.M. (1999) Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res.* 248 : 339-49.

Pham, C.D., Vuyyuru, V.B., Yang, Y., Bai, W., Singh B. (1999) Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene* 18 : 4287-4294.

Picard, A., Giraud, F., Le Bouffant, F., Sladeczek, F., Le Peuch, C., Doree, M. (1985) Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection triggers activation, but not meiotic maturation in amphibian and starfish oocytes. *FEBS Lett.* 182 : 446-50.

- Picard, A., Capony, J.P., Brautigan, D.L., Doree, M. (1989) Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase-promoting factor activity in starfish. *J Cell Biol.* 109 : 3347-54.
- Picard, A., Galas, S., Peaucellier, G., Dorée, M. (1996) Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *EMBO J.* 15 : 390-3598.
- Pines, J., Hunter, T. (1989) Isolation of a human cyclin cDNA : evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell.* 58 : 833-46.
- Pines, J., Hunter, T. (1990) p34cdc2 : the S and M kinase? *New Biol.* 2 : 389-401.
- Pines, J., Hunter, T. (1994) The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 13 : 3772-81.
- Poon, R.Y., Yamashita, K., Adamczewski, J.P., Hunt, T., Shuttleworth, J. (1993) The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J.* 12 : 3123-32.
- Posada, J., Sanghera, J., Pelech, S., Aebersold, R., Cooper, J.A. (1991) Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 11 : 2517-28.
- Posada, J., Cooper, J.A. (1992) Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* 255 : 212-5.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N.G., Vande Woude, G.F., Cooper, J.A. (1993) Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol.* 13 : 2546-53.
- Prather, R.S., Mayes, M.A., et Murphy, C.N. (1997) Parthenogenetic activation of pig eggs by exposure to protein kinase inhibitors. *Reprod Fertil Dev.* 9 : 539-44.
- Presicce, G.A., et Yang, X. (1994) Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev.* 38 : 380-5.
- Pringle, J., Hartwell, L. (1981) The *saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In "the Molecular biology of the yeast *saccharomyces cerevisiae* : life cycle and inheritance" (J. N. Strathern, E.W. Jones, et J.R. Broach, Eds.) pp97-142, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Prinz, S., Hwang, E.S., Visintin, R., et Amon, A. (1998) The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol.* 8 : 750-60.
- Qian, Y.W., Erikson, E., Li, C., Maller, J.L. (1998) Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol.* 18 : 4262-71.
- Qian, Y.W., Erikson, E., Maller, J.L. (1998) Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science.* 282 : 1701-4.

- Ray, L.B., Sturgill, T.W. (1988) Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 263 : 12721-7.
- Rempel, R.E., Sleight, S.B., Maller, J.L. (1995) Maternal *Xenopus* Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *J Biol Chem.* 270 : 6843-55.
- Reynhout, J.K., Smith, L.D. (1974) Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol.* 38 : 394-400.
- Rezai, K., Kulisz, A., Wasserman, W.J. (1994) Protooncogene product, c-mos kinase, is involved in upregulating Na⁺/H⁺ antiporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol.* 267 : C1717-22.
- Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D., Beach, D. (1989) The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell.* 57 : 393-401.
- Richter, J.D. (1996) Dynamics of poly(A) addition and removal during development p481-503 In J. Hershey, M. Mathews et Sonenberg N. eds. *Translational control.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plain View, N.Y.
- Richter, J.D. (1999) Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63 : 446-56.
- Rime, H., Néant, I., Guerrier, P., Ozon, R. (1989) 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev Biol.* 13 : 169-79.
- Rime, H., Huchon, D., De Smedt, V., Thibier, C., Galaktionov, K., Jesus, C., Ozon, R. (1994) Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol Cell.* 82 : 11-22.
- Rodeau, J.L. et Vilain, J.P. (1987) Changes in membrane potential, membrane resistance, and intracellular H⁺, K⁺, Na⁺ and Cl⁻ activities during the progesterone-induced maturation of urodele amphibian oocytes. *Dev. Biol.* 120 : 481-493.
- Roy, L.M., Singh, B., Gautier, J., Arlinghaus, R.B., Nordeen, S.K., Maller, J.L. (1990) *Cell,* 61, 825-831.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.P., Schaeffer, L., Nigg, E.A., Hoeijmakers, J.H., et Egly, J.M. (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell.* 79 : 1093-101.
- Roy, L.M., Haccard, O., Izumi, T., Lattes, B.G., Lewellyn, A.L., Maller, J.L. (1996) Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus* *Oncogene* 12 : 2203-2211.

Runft, L.L., Watras, J., Jaffe, L.A. (1999) Calcium release at fertilization of *Xenopus* eggs requires type I IP(3)receptors, but not SH2 domain-mediated activation of PLC gamma or G(q)-mediated activation of PLCbeta. *Dev Biol.* 214 : 399-411.

Ryazanov, A.G., et Spirin, A.S. (1990) Phosphorylation of elongation factor 2 : a key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *New Biol.* 2 : 843-50.

Sadler, S.E., Maller, J.L. (1981) Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem.* 256 : 6368-73.

Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., Vande Woude, G.F. (1988) Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335, 519-525.

Sagata, N., Daar, I., Oskarson, M., Showalter, S.D., Vande Woude, G.F. (1989) The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science.* 245 : 643-6.

Sagata, N. The role of Mos in oocyte maturation : prevention of parthenogenetic activation. (1995) *Cell Technology* 14 : 51-59

Sagata, N. (1996) Meiotic metaphase arrest in animal oocytes : its mechanisms and biological significance. *Trends in Cell Biol.* 6 : 22-28.

Sagata, N. (1997) What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays.* 19 : 13-21.

Sahara, S.K., Sato, M., Aoto, T., Ohnishi, H., Kaise, H., Koide, K., Ogita, et Fukami, Y. (1992) Characterization of protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 : 105-114.

Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., Elledge, S.J. (1997) Conservation of the Chk1 check point pathway in mammals : linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science.* 277 : 1497-501.

Santella, L. (1998) The role of calcium in the cell cycle : facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun.* 244 : 317-24.

Sarcevic, B., Erikson, E., Maller, J.L. (1993) Purification and characterization of a mitogen-activated protein kinase tyrosine phosphatase from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem.* 268 : 25075-83.

Sato, K., Iwasaki, T., Tamaki, I., Aoto, M., Tokmakov, A.A., Fukami, Y. (1998) Involvement of protein-tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in sperm-induced *Xenopus* egg activation. *FEBS Lett.* 424 : 113-8.

Sato, K., Iwao, Y., Fujimura, T., Tamaki, I., Ogawa, K., Iwasaki, T., Tokmakov, A.A., Hatano, O., Fukami, Y. (1999) Evidence for the involvement of a Src-related tyrosine kinase in *Xenopus* egg activation. *Dev Biol.* 209 : 308-20.

Schatten, G., Simerly, C., et Schatten, H. (1985) Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 : 4152-6.

Schatten, H., Simerly, C., Maul, G., et Schatten, G. (1989) Microtubule assembly is required for the formation of the pronuclei, nuclear lamin acquisition, and DNA synthesis during mouse, but not sea urchin, fertilization. *Gamete Res.* 23 : 309-22.

Schorderet-Slatkine, S., Drury, K.C. (1973) Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differ.* 2 : 247-54.

Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M., Boquet, P., Godeau, F., Baulieu, E.E. (1978) Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes : a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level. *Cell.* 15 : 1269-75.

Schuetz, A.W. (1967) Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J Exp Zool.* 166 : 347-54.

Schultz, R.M., et Kopf, G.S. (1995) Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol.* 30 : 21-62.

Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Sausville, E.A., Meijer, L., Kunick, C. (1999) Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors : synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro anti tumor activity. *J Med Chem.* 42 : 2909-19.

Schwab, M., Lutum, A.S., Seufert, W. (1997) Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell.* 90 : 683-93.

Seydoux, G. (1996) Mechanisms of translational control in early development. *Curr Opin Genet Dev.* 6 : 555-61.

Sheets, M.D., Wu, M., Wickens, M. (1995) Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature.* 374 : 511-6.

Shen, S.S. (1995) Mechanisms of calcium regulation in sea urchin eggs and their activities during fertilization. *Curr Top Dev Biol.* 30 : 63-101.

Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., Lu, K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 12 : 706-20.

Shen, S.S., Kinsey, W.H., Lee, S.J. (1999) Protein tyrosine kinase-dependent release of intracellular calcium in the sea urchin egg. *Dev Growth Differ* 41 : 345-55.

Shibuya, E.K., Masui, Y. (1988) Stabilization and enhancement of primary cytosolic factor (CSF) by ATP and NaF in amphibian eggs cytosol. *Dev. Biol.* 129 : 253-264.

Shibuya, E.K., Masui, Y. (1989) Molecular characteristics of cytostatic factors in amphibian egg cytosols. *Development*. 106 : 799-808.

Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., Nasmyth, K. (1998) The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 17 : 1336-49.

Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., Deshaies, R.J. (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*. 97 : 233-44.

Shteinberg, M., Protopopov, Y., Listovsky, T., Brandeis, M., Hershko, A. (1999) Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. *Biochem Biophys Res Commun*. 260 : 193-8.

Shteinberg, M., Hershko, A. (1999) Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem Biophys Res Commun*. 257 : 12-8.

Sigrist, S.J., Lehner, C.F. (1997) *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell*. 90 : 671-81.

Simanis, V. et Nurse, P. (1986) The cell cycle control gene *cdc2* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*. 45 : 261-268.

Simili, M., Pellerano, P., Pigullo, S., Tavosanis, G., Ottaggio, L., de Saint-Georges, L., Bonatti, S. (1997) 6-DMAP inhibition of early cell cycle events and induction of mitotic abnormalities. *Mutagenesis*. 12 : 313-9.

Singh, B., et Arlinghaus, R.B. (1992) The *mos* proto-oncogene product : its role in oocyte maturation, metaphase arrest, and neoplastic transformation. *Mol Carcinog*. 6 : 182-9.

Singh, B., Arlinghaus, R.B. (1997) *Mos* and the cell cycle. *Progress in Cell Cycle* 3, 251-259, Plenum Press, New York, USA.

Siracusa, G., Whittingham, D.G., Molinaro, M., Vivarelli, E. (1978) Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of proteinsynthesis. *J Embryol Exp Morphol*. 43 : 157-66.

Smith, L.D., Ecker, R.E. et Suhtelney, S. (1966) the initiation of protein synthesis in eggs of *Rana pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 : 1724-1728.

Smith, L.D., Ecker, R.E., Subtelny, S. (1968) In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Dev Biol*. 17 : 627-43.

Smith, L.D., Ecker, R.E. (1969) Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Dev Biol*. 19 : 281-309.

Smith, L.D., Ecker, R.E. (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*. 25 : 232-47.

Snow, P. (1996) Fertilization stimulates an increase in inositol 1,4,5 triphosphate and inositol lipid levels in *Xenopus* eggs. *Dev. Biol.* 180 : 108-118.

Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., et Kirschner, M.W. (1990) Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63 : 1013-24.

Solomon, M.J., Gautier, J., Lee, T., Kirschner, M.W. (1991) Control of p34cdc2 activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 56 : 427-35.

Solomon, M.J., Lee, T., Kirschner, M.W. (1992) Role of phosphorylation in p34cdc2 activation : identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell.* 3 : 13-27.

Solomon, M.J. (1993) Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 180-186.

Solomon, M.J. (1994) The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem Sci.* 19 : 496-500.

Speaker, M.G., Butcher, F.R. (1977) Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature.* 267 : 848-50.

Stebbins-Boaz, B., Hake, L.E., Richter, J.D. (1996) CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* 15 : 2582-92.

Steinhardt, R.A., Epel, D., Carroll, E.J. Jr., Yanagimachi, R. (1974) Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature.* 252 : 41-3.

Stith, B.J., et Maller, J.L. (1985) Increased intracellular pH is not necessary for ribosomal protein s6 phosphorylation, increased protein synthesis, or germinal vesicle breakdown in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol.* 107 : 460-9.

Stith, B.J., Jaynes, C., Goalstone, M., et Silva, S. (1992) Insulin and progesterone increase ³²P₀₄-labeling of phospholipids and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium.* 13 : 341-52.

Stith, B.J., Goalstone, M., Silva, S., et Jaynes, C. (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate mass changes from fertilization through first cleavage in *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell.* 4 : 435-43.

Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., et Doree, M. (1991) Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature.* 351 : 242-5.

Strausfeld, U.P., Fernandez, A., Capony, J.-P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbé, J.-C., and Lamb, N.J. (1994). Activation of p34^{cdc2} protein kinase by microinjection of human Cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of Cdc25C by p34^{cdc2} on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* 269 : 5989-6000.

Stricker, S.A. (1997) Intracellular injections of a soluble sperm factor trigger calcium oscillations and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev Biol.* 186 (2) : 185-201.

Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E., et Maller, J.L. (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature.* 334 : 715-8.

Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., et Hershko, A. (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell.* 6 : 185-197.

Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B., et Nasmyth, K. (1993) Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* 12 : 1969-78.

Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Schutzkus, V., First, N.L. (1994) Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol.* 166 : 729-39.

Swann, K. et Whitacker, M. (1986) the part played by inositol triphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 103 : 2333-2342.

Swann, K., et Ozil, J.P. (1994) Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol.* 152 : 183-222.

Swann, K., et Parrington, J. (1999) Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. *J Exp Zool.* 285 : 267-75.

Swenson, K.I., Farrell K.M., Ruderman J.V. (1986) The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47 : 861-70.

Szöllösi, M.S., Kubiak, J.Z., Debey, P., De Pennart, H., Szöllösi, D. & Maro, B. (1993) Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 104 : 861-72.

Tachibana, K., Machida, T., Nomura, Y., Kishimoto, T. (1997) MAPKinase links the fertilization signal transduction pathway to the G1/S transition in starfish eggs. *EMBO J.* 16 : 4333-4339.

Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J., Nigg, E.A. (1994) Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol.* 127 : 467-78.

Taylor, G.S., Liu, Y., Baskerville, C., Charbonneau, H. (1997) The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *J Biol Chem.* 272 : 24054-63.

Taylor, S.S., et McKeon, F. (1997) Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell.* 89 : 727-35.

- Taylor, S.S., Ha, E., McKeon, F. (1998) The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol.* 142 : 1-11.
- Tchou-su et Wang, Y.L. (1958) Etudes comparatives sur l'ovulation et la maturation in vivo et in vitro chez le crapaud asiatique *Bufo bufo asiaticus*. *Acta Biol. Exp. Sin.* 6 :129-130.
- Tomkowiak, M., Guerrier, P., Krantic, S. (1997) Meiosis reinitiation of mussel oocytes involves L-type voltage-gated calcium channel. *J Cell Biochem.* 64 : 152-60.
- Tournier, F., Joly, A., Bornens, M. (1994). Parthenogenetic production of partial blastulas in *Xenopus*. *C. R.Acad. Sci.* 317, 405-410.
- Townsley, F.M., Ruderman J.V. (1998) Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol.* 8 : 238-44.
- Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W., Hieter, P. (1995) CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell.* 81 : 261-8.
- Van Beveren, C. Van Straaten, F., Galleshaw, J.A. et Verma, I.M. (1981) Nucleotide sequence of the genome of a murine sarcoma virus. *Cell.* 27 : 97-108.
- Van der Velden, H.M., Lohka, M.J. (1993) Mitotic arrest caused by the amino terminus of *Xenopus* cyclin B2. *Mol Cell Biol.* 13 : 1480-8.
- Vandré, D.D. et Wills, V.L. (1992) Inhibition of mitosis by okadaic acid : possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *J. Cell Sci.* 101 : 79-91.
- Verde, F., Labbe, J.C., Doree, M., Karsenti, E. (1990) Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature.* 343(6255) : 233-8.
- Verde, F., Dogterom, M., Stelzer, E., Karsenti, E., Leibler, S. (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol.* 118 : 1097-108.
- Verlhac, M.H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M.H., Clarke, H.J. (1993) MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 158 : 330-40.
- Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W.H., Evans, M.J, Maro, B. (1996) Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development.* 122 : 815-22.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J. Y., Detivaud, L., Leclerc, S., Meijer, L. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 224 : 771-786.

Vilain, J.P. (1977) Maturation in vitro des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michach (Amphibien urodèle). Mém. Soc. Zool. France Symp. L. Gallien. In "Progrès récents en Biologie du développement des amphibiens" pp93-102.

Visintin, R., Prinz, S., Amon, A. (1997) CDC20 and CDH1 : a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science*. 278 : 460-3.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., Amon, A. (1998) The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*. 2 : 709-18.

Visintin, R., Hwang, E.S., et Amon, A. (1999) Cfl1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398 : 818-23.

Vitullo, A.D., Ozil, J.P. (1992) Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol*. 151 : 128-36.

Vorlaufer, E., Peters, J.M. (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 9, 1817-1831.

Walter, S.A., Guadagno, T.M., et Ferrell, J.E. Jr. (1997) Induction of a G2-phase arrest in *Xenopus* egg extracts by activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell*. 8 : 2157-69.

Walte, S.A., Guadagno, S.N., et Ferrell, J.E. Jr (2000) Activation of Wee1 by p42MAPK *in vitro* and in cycling *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell*. 11 : 887-896.

Ware, C.B., Barnes, F.L., Maiki-Laurila, M., et First, N.L. (1989) Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res*. 22 : 265-75.

Wasserman, W.J., et Masui, Y. (1975) Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J Exp Zool*. 193 : 369-75.

Wasserman, W.J., et Masui, Y. (1975) Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res*. 91 : 381-8.

Wasserman, W.J., et Houle, J.G. (1984) The regulation of ribosomal protein S-6 phosphorylation in *Xenopus* oocytes : a potential role for intracellular pH. *Dev Biol*. 101 : 436-45.

Watanabe, N., Vande Woude, G.F., Ikawa, Y., Sagata, N. (1989) Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 342 : 505-11.

Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y., and Sagata, N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 352, 247-248.

Watanabe, N., Broome, M., et Hunter, T. (1995) Regulation of the human WEE1 Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J*. 14 : 1878-91.

- Webb, et D.J., Nuccitelli, R. (1981) Direct measurement of intracellular pH changes in *Xenopus* eggs at fertilization and cleavage. *J Cell Biol.* 91 : 562-7.
- Weber, M., Kubiak, J.Z., Arlinghaus, R.B., Pines, J., et Maro, B. (1991) c-mos proto-oncogene product is partly degraded after release from meiotic arrest and persists during interphase in mouse zygotes. *Dev Biol.* 148 : 393-7.
- Weiss, E., et Winey, M. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol.* 132 : 111-23.
- Wells, W.A., et Murray A.W. (1996) Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol.* 133 : 75-84.
- Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., et Hunter, T. (1999) The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci.* 112 : 3361-71.
- Westendorf, J.M., Swenson, K.I., et Ruderman, J.V. (1989) The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol.* 108 : 1431-44.
- Whitaker, M. et Irvine, F. (1984) Inositol 1,4,5 triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. *Nature* : 312 : 636-639.
- Whitaker, M. et Swann, K. (1993) Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117 : 1-12.
- Whitaker, M. (1995) Regulation of the cell division cycle by inositol trisphosphate and the calcium signaling pathway. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 30 : 299-310.
- Wickens, M., Anderson, P., et Jackson, R.J. (1997) Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev.* 7 : 220-32.
- Wolf, D.P. (1974) The cortical response in *Xenopus laevis* ova. *Dev. Biol.* 40 : 102-115.
- Wu, M., et Gerhart, J.C. (1980) Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 79 : 465-77.
- Wu, G.J., Simerly, C., Zoran, S.S., Funte, L.R., and Schatten, G. (1996). Microtubule and chromatin dynamics during fertilization and early development in rhesus monkeys, and regulation by intracellular calcium ions. *Biol. Reprod.* 55, 260-270.
- Wu, B., Ignatz, G., Currie, W.B., et Yang, X. (1997) Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation *in vitro*. *Biol Reprod.* 56 : 260-5.
- Xu, W., Ladner, K.J., et Smith, L.D. (1992) Evidence that Mos protein may not act directly on cyclin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 : 4573-7.
- Yamamoto, A., Guacci, V., et Koshland, D. (1996) Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol.* 133 : 99-110.

Yang, X., Jiang, S., et Foote, R.H. (1991) Nuclear transfer in rabbit and cattle by electric pulse-induced fusion of blastomeres to enucleated oocytes. *Theriogenology* 35 : 298.

Yang, Y., Herrmann, C.H., Arlinghaus, R.B., et Singh, B. (1996) Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 16 : 800-9.

Ye, X.S., Fincher, R.R., Tang, A., Osmani, A.H., et Osmani, S.A. (1998) Regulation of the anaphase-promoting complex/cyclosome by bimAAPC3 and proteolysis of NIMA. *Mol Biol Cell.* 9 : 3019-30.

Yew, N., Mellini, M.L., et Vande Woude, G.F. (1992) Meiotic initiation by the mos protein kinase in *Xenopus*. *Nature*, 355 : 649-652.

Yim, D.L., Opresko, L.K., Wiley, H.S., et Nuccitelli, R. (1994) Highly polarized EGF receptor tyrosine kinase activity initiates egg activation in *Xenopus*. *Dev Biol.* 162 : 41-55.

Zachariae, W., et Nasmyth, K. (1996) TPR proteins required for anaphase progression mediate ubiquitination of mitotic B-type cyclins in yeast. *Mol Biol Cell.* 7 : 791-801.

Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., et Seufert, W. (1998) Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science.* 282 : 1721-4.

Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A.M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., et Sausville, E.A. (1999) Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* 59 : 2566-9.

Zampetti-Bosseler, F., Huez, G., et Brachet, J. (1973) Effects of several inhibitors of macromolecule synthesis upon maturation of marine invertebrate oocytes. *Exp Cell Res.* 78 : 383-93.

Zhang, S.C., and Masui, Y. (1992) Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J. Exp. Zool.* 263 : 317-329.

Zhao, X., Singh, B. et Arlinghaus, R.B. (1991) Inhibition of c-mos protein kinase blocks mouse zygotes at pronuclei stage. *Oncogene.* 6 : 1423-1426.

Zucker, R.S., et Steinhardt, R.A. (1978) Prevention of the cortical reaction in fertilized sea urchin eggs by injection of calcium-chelating ligands. *Biochim Biophys Acta.* 541 : 459-66.

ANNEXES

Procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor

Stéphane Flament¹, Jean-François Bodart¹, Edith Browaeys¹, Marc Bertout¹, Arlette Rousseau¹, Julian Gannon² and Jean-Pierre Vilain¹

¹Centre de Biologie Cellulaire, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

²Imperial Cancer Research Fund Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, UK

Date submitted: 18.9.96. Date accepted: 8.10.96

Summary

We have recently shown that the incubation of *Xenopus laevis* oocytes in procaine-containing solutions induced germinal vesicle breakdown without white spot formation and, in some cases, with the appearance of spindle and chromosomes in the cytoplasm. The present study was performed to determine whether M-phase promoting factor was involved in this unusual maturation. Procaine failed to induce maturation in the presence of 6-dimethylamino purine or roscovitine, which are both known to inhibit p34^{cdc2} kinase. Histone H1 kinase activity was detected in procaine-treated oocytes but it was always lower than in progesterone-treated controls. A shift in p34^{cdc2} was observed in oocytes that had been exposed to procaine for 16 h, but it was not detected in those exposed for 24 h. Finally, cytoplasm transfer experiments demonstrated that the maturation promoting activity that occurred in oocytes incubated in procaine for 16 h could induce maturation of recipient stage VI oocytes. This transferable activity was weaker than that from progesterone-treated controls since only 30% of the recipients underwent germinal vesicle breakdown and only a few spindles were observed, which were not always correctly located. Taken together these results demonstrate that M-phase promoting factor is involved in the procaine maturing effect despite some differences compared with progesterone-treated oocytes which might explain the particular type of maturation induced by this substance. The discovery of the mechanisms by which procaine is able to activate M-phase promoting factor might now help in the understanding of some steps in progesterone-induced maturation that have still to be elucidated.

Keywords: Intracellular pH, Maturation, MPF, Procaine, *Xenopus* oocyte

Introduction

In response to progesterone, prophase-I-arrested oocytes of *Xenopus laevis* undergo maturation. The germinal vesicle first moves towards the animal pole, thus creating the classical white spot. This is followed by germinal vesicle breakdown (GVBD) and then spindle and chromosomes appear close to the plasma membrane. The formation of the first polar body signifies completion of meiosis I and the cell arrest at metaphase of meiosis II (Hausen & Riebesell, 1991).

One of the changes induced by progesterone stimulation is the activation of M-phase promoting factor (MPF), which has been extensively studied (King *et al.*, 1994). MPF is a complex of p34^{cdc2} (catalytic subunit) and cyclin B (regulatory subunit) (Masui, 1992). MPF is regulated by p34^{cdc2} which is activated by phosphorylation of Thr161 and dephosphorylation of Thr14/Tyr15 (Solomon, 1993). Dephosphorylation produces a shift in the electrophoretic mobility of p34^{cdc2} that allows the discrimination between inactive and active forms on western blots (Nebreda & Hunt, 1993; Atherton-Fessler *et al.*, 1994). It is the phosphorylation of several targets by activated MPF that initiates the cytological events of meiosis. For instance, phosphorylation of lamins allows GVBD to occur, phosphorylation of microtubule-associated proteins is

All correspondence to: Stéphane Flament, Centre de Biologie Cellulaire, Unité de Dynamique des cellules embryonnaires et cancéreuses, Laboratoire de Biologie du Développement, EA DRED 1033, Université de Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Telephone: +33 20-43-68-67. Fax: +33 20-43-40-38. e-mail: jean-pierre.vilain@univ-lille1.fr.

involved in cytoskeleton reorganisation, while the phosphorylation of histone H1 may participate in chromosome condensation (Kishimoto, 1994). Among the targets of MPF, histone H1 has been chosen to demonstrate and quantify MPF activity.

However, MPF activation is a late event in the time course of oocyte maturation. Indeed, it occurs at 0.4 GVBD₅₀ (40% of the time required for half the responding oocytes to undergo GVBD; Stith & Maller, 1984). Among early events, a transient increase in intracellular pH (pH_i) has been described (Lee & Steinhardt, 1981). Maturing oocytes alkalinise by an average 0.2–0.4 pH unit at 0.2 GVBD₅₀, then pH_i decreases again close to its original value just before GVBD. This is probably the result of an up-regulation of the Na⁺/H⁺ antiporter in which the p39^{mos} kinase seems to be involved (Rezai *et al.*, 1994).

Using a systematic cytological study of buffer-injected *Xenopus* oocytes incubated with or without progesterone, we have recently shown that although the increase in pH_i was not able to induce maturation, it was involved in the migration of the germinal vesicle towards the animal pole (Flament *et al.*, 1996). We also demonstrated that procaine, a local anaesthetic which has been shown to alkalinise oocyte cytoplasm (Houle & Wasserman, 1983), induced not only GVBD but also spindle formation and chromosome condensation (Flament *et al.*, 1996). However, spindles were always ectopic since they were always located far from the plasma membrane.

The present study was performed to determine the mechanism by which procaine induces this particular type of maturation. We were especially interested in the relationship between procaine and MPF. This question was addressed by the use of MPF inhibitors as well as H1 kinase assays and immunoblotting with anti-p34^{cdc2} antibodies. Moreover, cytoplasm injection experiments were performed to specify the transferable property of the maturing effect of procaine. Our results show that a transient MPF activation is involved in the unusual maturation induced by procaine.

Materials and methods

Handling of oocytes

Adult *Xenopus laevis* females were purchased from CRBM (CNRS, Montpellier, France). They were not primed with any gonadotrophins. After anaesthesia with 1 g/l MS222 (Sandoz), 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). Full-grown stage VI oocytes (Dumont, 1972) were obtained by defolliculation using 1 h incubation in 1 mg/ml collagenase A (Boehringer

Mannheim). Oocytes were stored at 12°C in ND96 medium.

Experimental conditions

Oocytes were incubated at 20°C in test or control media. Test solutions were prepared in ND96 medium by substituting 10 mM NaCl with 10 mM procaine-HCl (Sigma) (no progesterone was added during procaine incubations). We chose to work with procaine solutions of pH 8.5 since procaine action is higher at this pH than at pH 7.5 (Flament *et al.*, 1996). Analyses were performed after 8, 16 and 24 h of incubation because these times had been used in our previous cytological studies (Flament *et al.*, 1996). Control solutions consisted of ND96 pH 8.5 (negative control), or ND96 containing 10 µM progesterone (Sigma) (positive control).

Oocytes were also incubated in ND96 containing either roscovitine (1/1000 from a stock solution at 50 mM in dimethyl sulphoxide (DMSO)) or 6-dimethylamino purine (6-DMAP) (Sigma) (which was diluted at 1 mM from a 100 mM stock solution in ND96). After 1 h the oocytes were incubated in procaine 10 mM pH 8.5 containing the same concentration of either roscovitine or 6-DMAP. Control oocytes were also treated with DMSO (1/1000).

Cytoplasm taken from donor oocytes treated with procaine for various periods of time was microinjected into immature recipient oocytes at a constant volume of 30 nl per oocyte by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo).

Maturation analysis

Maturation analysis was performed by white spot detection and by microscopical examination after dissection of boiled oocytes (100°C, 3 min).

For cytoplasm injection experiments, donors and recipients were cytologically analysed. Oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (7 µm thickness) were stained with nuclear red for detecting nuclei and chromosomes, and with picroindigo carmine to reveal cytoplasmic structures.

Purification by chromatography on p9^{CKShs1}-sepharose beads

Batches of 20 oocytes were homogenised on ice in 200 µl of homogenisation buffer (containing protease and phosphatase inhibitors), prepared as described by Azzi *et al.* (1994). Homogenates were centrifuged at 13 000 rpm (10 000 g) at 4°C for 10 min. Supernatants free of yolk platelets were collected (180 µl per batch). Five microlitres was kept for H1 kinase assays and counted as described later, while 150 µl was transferred to Eppendorf tubes containing 10 µl of p9^{CKShs1}.

sepharose beads along with 400 μ l of bead buffer and 220 μ l of buffer C (Azzi *et al.*, 1994). The tubes were kept under constant rotation at 4 °C for 30 min. After a brief centrifugation at 13 000 rpm and removal of the supernatant, the beads were washed three times with bead buffer (Azzi *et al.*, 1994) and used either for immunoblotting analysis or for autoradiography following kinase assay.

Protein kinase assays

Oocytes homogenate supernatant (5 μ l) was incubated for 10 min at 30 °C with 15 μ M [γ - 32 P]ATP (4500 mCi/mmol; 10 μ Ci/ μ l) in the presence of histone H1 (5 mg/ml in buffer C) in a final volume of 30 μ l. Assays were terminated by cooling the tubes on ice and 25 μ l aliquots of supernatant were spotted onto Whatman P-81 phosphocellulose paper. After five washes in 1% phosphoric acid, the wet filters were transferred into plastic scintillation vials containing 4 ml of scintillation fluid (Aquasafe 300 plus, Zinsser analytic). Counting was performed in a LKB counter. Kinase activities were expressed in picomoles of phosphate incorporated in histone H1 per 5 μ l of supernatant per 10 min.

Kinase assays were also performed with 10 μ l of packed p9^{CKShs1}-sepharose beads loaded with oocyte homogenate supernatants. After 10 min at 30 °C, 30 μ l of 2 \times Laemmli sample buffer was added and the solution boiled for 10 min. [32 P]phosphate incorporation was estimated by autoradiography after SDS-PAGE.

Electrophoresis and western blotting

Once purified on p9^{CKShs1}-sepharose beads and treated with the 2 \times Laemmli solution, samples were loaded onto 10% polyacrylamide gels and allowed to run overnight. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell) using a semi-dry apparatus. After staining with Ponceau S (Sigma), nitrocellulose sheets were incubated for 1 h in 5% lowfat milk in TNT (Tris 15 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.05%, pH 8). The sheets were then washed with TNT and incubated for 2 h with anti-p34^{cdc2} monoclonal antibody A17 at a concentration of 10 μ g/ml in TNT (Goodger *et al.*, 1996). After three washes in TNT, horseradish-peroxidase-coupled rabbit anti-mouse IgG antiserum was added for 1 h (1/200 in TNT). Horseradish peroxidase was detected with either chemoluminescence (ECL, Amersham Corp.) or 4-chloro-1-naphthol (Sigma) after three washes in TNT and TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5).

Statistics

The results are expressed as the mean \pm SD. The significance of the difference between means of groups

was tested using Student's *t*-test. Observed counts were compared using the chi-squared analysis of contingency tables or the Fisher exact test.

Results

p34^{cdc2} inhibitors

6-DMAP has been shown to inhibit p34^{cdc2} kinase (Meijer & Pondaven, 1988) and, at a concentration of 1 mM, totally inhibits progesterone-induced oocyte maturation (Jesus *et al.*, 1991). In our hands, 6-DMAP (1 mM) gave similar results on progesterone-induced maturation (not shown). When *Xenopus* oocytes were incubated in ND96 containing 1 mM 6-DMAP for 1 h prior to incubation in procaine 10 mM pH 8.5 containing the same concentration of 6-DMAP, we failed to observe GVBD, even after 24 h of incubation (Table 1). The results obtained with procaine-treated control oocytes (Table 1) were similar to those described previously (Flament *et al.*, 1996).

We also used roscovitine, a much more specific inhibitor of cdc2 than 6-DMAP (L. Meijer *et al.*, unpublished results; W.F. Azevedo *et al.*, unpublished results). Roscovitine at various concentrations 0–50 μ M was added to ND96 1 h prior to progesterone addition. When the progesterone was added, we observed a decrease in the rate of GVBD when the concentration of inhibitor was higher than 10 μ M (Fig. 1). The concentration that inhibited 50% of GVBD was 19 μ M roscovitine. We chose 50 μ M to assess the effect of roscovitine on procaine-induced maturation because, at this concentration, roscovitine strongly inhibited procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes (Table 1). Inhibition by 6-DMAP was stronger than

Table 1 Effect of 6-DMAP and roscovitine on procaine-incubated oocytes

Procaine 10 mM pH 8.5 incubation medium	16 h		24 h	
	Total	GVBD	Total	GVBD
+ND96	60	25	60	44
+6-DMAP 1 mM	60	0	60	0
+DMSO	60	29	60	39
+Roscovitine 50 μ M	60	3	60	5

Pooled numbers of oocytes from three animals each batch containing 20 oocytes. Oocytes were exposed for 1 h to ND96 containing either 1 mM 6-DMAP or 50 μ M roscovitine and then oocytes were transferred into procaine solution with the same amount of added inhibitor for 16 h or 24 h. ND96 and DMSO were used as controls since they were respectively the vehicle of 6-DMAP and roscovitine. GVBD was assessed by dissection of the oocytes after boiling.

that produced by roscovitine (after 24 h, 0 oocytes showed GVBD in the presence of 6-DMAP vs 8.3% with roscovitine). The percentage of oocytes showing GVBD was not significantly different between control oocytes exposed to procaine with DMSO and procaine-treated ones (48.3 ± 20.2 and 41.7 ± 10.6 , respectively, after 16 h; 65 ± 11.1 and 73.3 ± 19.9 , respectively, after 24 h). Control oocytes incubated in ND96 alone did not show spontaneous maturation; oocytes exposed overnight to $10 \mu\text{M}$ progesterone without inhibitor always underwent GVBD (not shown).

H1 kinase assays and western blot analysis of p34^{cdc2}

When procaine-exposed oocytes were assayed for kinase activity, we observed that H1 kinase activity increased (Fig. 2). After an 8 h incubation in procaine 10 mM pH 8.5, [³²P]phosphate incorporation was not significantly different from that found in control oocytes (1.4 ± 0.2 vs 1.4 ± 0.7). After a 16 h incubation, kinase activity was increased by a factor of 1.6 (2.2 ± 0.5) compared with control oocytes. In oocytes exposed for 24 h to procaine, kinase activity was increased by a factor 2.9 (4 ± 1). This increase in kinase activity was lower than that usually observed following progesterone treatment: 12.5 ± 1.5 . When we compared the rate of phosphate incorporation with the percentage of oocytes that had reached GVBD in the sample, there was significant difference between the procaine- and progesterone-treated oocytes. Indeed, while $88.5 \pm 16.3\%$ of them had reached GVBD after 24 h of exposure to procaine, kinase activity was only 2.9 times higher than in control samples. In progesterone-exposed oocytes GVBD reached 100%, which is not significantly greater than in the previous case (88.5%), but kinase activity had increased 9.2-fold.

The results obtained by autoradiography following SDS-PAGE are shown in Fig. 3. Histone H1 was phosphorylated not only in samples of progesterone-treated oocytes but also in procaine-treated oocytes provided that exposure was longer than 8 h – that is to say in samples where at least a few oocytes were at the GVBD stage. The weaker kinase activity of procaine-treated samples described earlier was confirmed by autoradiography.

When oocyte homogenates were immunostained with anti-p34^{cdc2} A17 antibody, the protein was detected as two bands in the control samples incubated in ND96 whereas in progesterone-treated samples only one isoform of p34^{cdc2} was detected which comigrated with the faster migrating protein present in the controls (Fig. 4). We failed to detect a similar shift of p34^{cdc2} in p9^{CKShs1}-purified homogenates of oocytes that had been exposed for 8 h to procaine 10 mM pH 8.5 (four such samples were analysed).

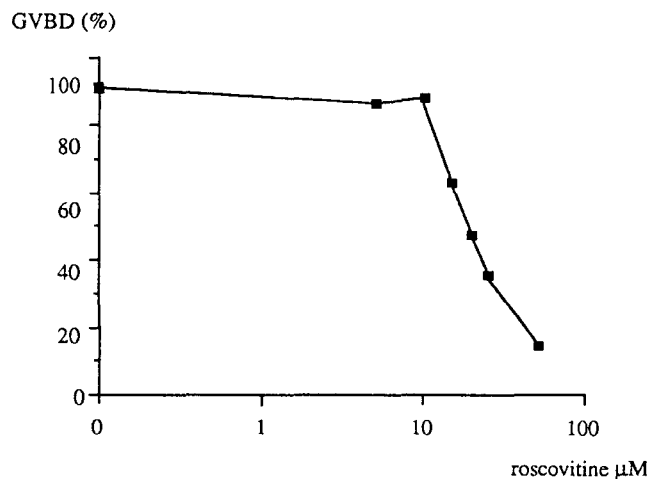


Figure 1 Effect of roscovitine on progesterone-exposed oocytes. Maturation was inhibited when roscovitine concentrations were higher than $10 \mu\text{M}$. The IC_{50} value was $19 \mu\text{M}$. Nevertheless, at $50 \mu\text{M}$ roscovitine GVBD was not totally inhibited. The percentage of GVBD in control oocytes exposed to progesterone plus DMSO ($1/1000$) was not significantly different from that observed in oocytes exposed only to progesterone. Data are the means of experiments performed in triplicate, with batches of 20 oocytes per roscovitine concentration.

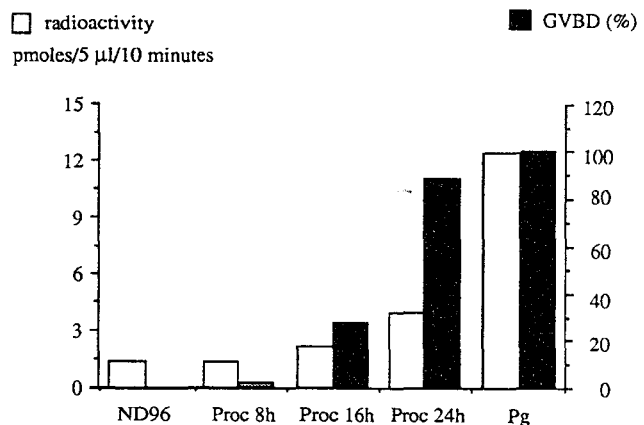


Figure 2 Effect of procaine on [γ -³²P]phosphate incorporation and GVBD in *Xenopus* oocytes. In each case, results are expressed as the mean of two experiments performed with oocytes from two different females. When oocytes were incubated for at least 16 h in procaine-containing medium (Proc 16 h), H1 kinase activity was higher than in control oocytes but lower than in progesterone-treated ones. After a 24 h exposure to procaine (Proc 24 h), H1 kinase activity was weak although the percentage of GVBD was high (compared with progesterone-treated (Pg) samples).

In homogenates prepared from oocytes exposed for 16 h to procaine, a shift of p34^{cdc2}, similar to that usually observed with progesterone-treated oocytes, was revealed (Fig. 4). However, such a shift was present only in four of eight experiments. Among the

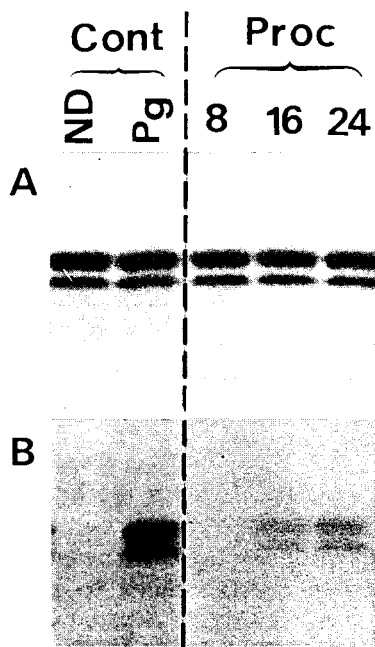


Figure 3 H1 kinase assay of *Xenopus* oocytes exposed to procaine. (A) Coomassie blue staining of p9^{CKShs1}-sepharose purified oocytes homogenates after incubation with histone H1 and [γ -³²P]ATP as described in Materials and Methods. Histone H1, which is the unique protein stained on the polyacrylamide gel, was present in equal amounts in each sample. (B) The same gel as in (A) after autoradiography. No histone H1 phosphorylation was observed in control oocytes incubated in ND96 (ND). [γ -³²P] was highly incorporated in histone H1 in progesterone-treated oocytes (Pg). Histone H1 was also stained in oocytes exposed to procaine 10 mM pH8.5 for 16 h (Proc 16) or 24 h (Proc 24), but the staining was weaker than in progesterone-treated samples.

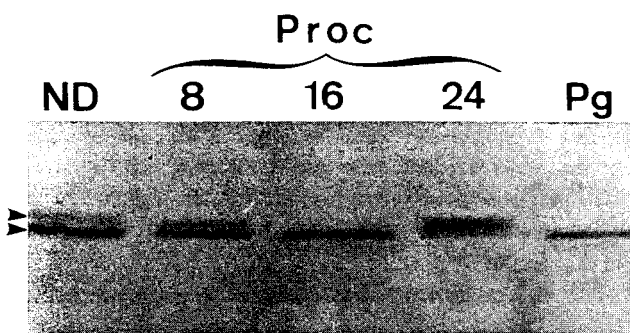


Figure 4 Immunostaining with the anti-p34^{cdc2} monoclonal antibody A17.1. The usual increase in p34^{cdc2} electrophoretic mobility was observed in progesterone-treated samples (Pg) as compared with ND96 control oocytes (ND). Two p34 isoforms were found in oocytes exposed for 8 h to procaine 10 mM pH8.5 (Proc 8), but we detected only the fastest band after a 16 h incubation (Proc 16). In homogenates of oocytes incubated for 24 h in procaine 10 mM pH8.5 (Proc 24) the antibody often revealed two bands, and in one case only the upper band was present.

four samples where p34^{cdc2} did shift to a faster migrating form, although the upper band was not detected by our antibodies, the percentage of oocytes that were at GVBD stage did not always reach 100% (there were only 71% and 78% of GVBD in two of them). Also, although the shift of cdc2 to the faster migrating form was similar in both the treated and progesterone control samples, the H1 kinase activity was always weaker.

Surprisingly, when oocytes were incubated in procaine 10 mM pH8.5 for 24 h, we could not detect the shift of cdc2 that we observed in samples treated for only 16 h: two bands were detected on the immunoblots (seven of such samples were analysed). These two p34^{cdc2} isoforms were detected even in one sample where 100% of the oocytes had reached GVBD after a 24 h incubation in procaine. Nevertheless, H1 kinase activity was still present in the homogenates, at a level which was not significantly different from that measured after 16 h of exposure to procaine. In one sample of procaine-exposed oocytes (during 24 h), only the slowest migrating form of the kinase was present (Fig. 4). In samples of oocytes incubated in ND96 pH8.5, we observed neither an increase in H1 kinase activity nor a shift of p34^{cdc2} (not shown).

Cytoplasm injections

To determine whether the maturing activity of procaine-treated oocytes was transferable as is usually observed in progesterone-treated *Xenopus* oocytes, cytoplasm injection experiments were performed (Table 2). Such injections induced GVBD in only $2.5 \pm 2.5\%$ of the recipient oocytes (1 of 40) when the cytoplasm was taken from oocytes exposed for 8 h to procaine 10 mM pH8.5. A higher number of recipient oocytes underwent GVBD when they received the cytoplasm from oocytes exposed for 16 h to the procaine solution: $30 \pm 7.7\%$ (12 of 40). However, when we analysed cytologically the oocytes that underwent GVBD, only 41.6% of them showed a spindle; this spindle was ectopic in two of five cases. Most of our cytological studies were performed 18–24 h after injection, but GVBD could be detected as early as 6 h after injection. We did not observe differences in the number of oocytes that underwent GVBD following cytoplasm injection when the analysis was performed after 5–6 h or after 16 h. In our hands, when similar experiments of cytoplasm injection were performed with progesterone-treated oocytes (16 h incubation), 100% of the recipients underwent GVBD and spindle, chromosomes and first polar body were observed in most cases (not shown).

When the cytoplasm was taken from oocytes treated for 24 h with procaine, recipient oocytes were

Table 2 Appearance of maturation promoting activity in the cytoplasm of procaine-treated oocytes

Incubation time (h)	Donors		Recipients			
	Total	GVBD	Total	GVBD	Spindles	Ectopic spindles
8 h	40	2	40	1	0	0
16 h	40	26	40	12	5	2
24 h	40	40	40	0	0	0

Oocytes that had been incubated in procaine-containing medium for various periods of time were used as cytoplasm donors. Stage VI oocytes were fixed from 5 to 24 h after the injection and subjected to cytological analysis after staining with nuclear red and picroindigo carmine.

always in the prophase I stage at the end of the experiment.

Discussion

The aim of the present work was to determine the mechanisms by which procaine is able to induce *Xenopus* oocyte maturation. In our opinion, the discovery of these mechanisms might help in the understanding of some of the steps of normal progesterone-induced oocyte maturation that are not yet well understood. We addressed the question of the relationship between MPF and procaine's particular type of maturation in which GVBD occurs without the appearance of the white spot, sometimes accompanied by spindle formation and chromosomes condensation within the oocyte cytoplasm (Flament *et al.*, 1996). The results of our approach, which included the use of MPF inhibitors, H1 kinase assays, immunoblotting with anti-p34^{cdc2} antibodies and cytoplasm injection experiments, show that procaine activate MPF but that there are differences between this type of maturation and that seen with progesterone.

Procaine failed to induce maturation in the presence of 1 mM 6-DMAP. This result suggested that MPF could mediate the effects of procaine. Indeed, 6-DMAP was shown to reversibly inhibit meiotic maturation of *Patella*, starfish, mouse and *Xenopus* oocytes (Néant & Guerrier, 1988; Rime *et al.*, 1989; Jesus *et al.*, 1991). In *Xenopus* prophase I oocytes induced to mature by either progesterone incubation or cytoplasm injection, 6-DMAP has been shown to inhibit maturation by inhibition of p34^{cdc2} activation (Jesus *et al.*, 1991). However, since 6-DMAP is not a specific cdc2 kinase inhibitor, we used roscovitine (L. Meijer *et al.*, unpublished results, W.F. Azevedo *et al.*, unpublished results). This is a recently discovered competitive inhibitor for ATP. The IC₅₀ of roscovitine on progesterone-induced maturation was 19 µM. This value was better than those previously reported for 6-DMAP

(100 µM) (Jesus *et al.*, 1991) or olomoucine (100 µM) (Vesely *et al.*, 1994). Although roscovitine had a lower IC₅₀ than 6-DMAP, the highest concentration of roscovitine we used (50 µM) failed to inhibit progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes totally. Higher concentrations of roscovitine may totally inhibit oocyte maturation; we could not show this because we did not want to increase the concentration of DMSO above 0.1%. However, roscovitine at a concentration of 50 µM significantly inhibited procaine-induced maturation. This result was in agreement with those already obtained with 6-DMAP.

To ascertain the involvement of MPF in procaine-induced maturation, we performed H1 kinase assays. Our results show that H1 kinase activity is enhanced in *Xenopus* oocytes treated for at least 16 h with 10 mM procaine pH 8.5. However, when oocytes were exposed for 24 h to procaine, the H1 kinase was not greatly increased. This was surprising because most of the oocytes had reached GVBD at this time. When procaine-treated oocytes (for 24 h) were compared with progesterone-treated oocytes, although the percentages of oocytes that had undergone GVBD were rather similar, H1 kinase activity was approximately 3 times lower. The presence of low H1 kinase activity in procaine-treated oocytes might explain why spindles and chromosomes were not always found in oocytes in which the germinal vesicle had broken down (Flament *et al.*, 1996).

The H1 kinase activity did not appear soon after procaine exposure. This suggests that the activation of MPF requires protein synthesis. It has already been shown that protein synthesis is increased following incubation in procaine-containing medium (House & Wasserman, 1983). Nevertheless, following procaine treatment protein synthesis did not increase to the same level as in oocytes exposed to progesterone (Houle & Wasserman, 1983). This difference might also explain why H1 kinase activity did not reach the same level as in oocytes exposed to progesterone.

A clearer demonstration of the activation of MPF

was shown by the use of A17 anti-p34^{cdc2} monoclonal antibody, which revealed a shift of the kinase on immunoblots following procaine incubation, a feature also observed following progesterone stimulation (Nebreda & Hunt, 1993). The shift was not present in homogenates of oocytes exposed for 8 h to procaine; this is in agreement with the absence of H1 kinase activity at this time point.

Two types of results were obtained from homogenates performed 16 h after procaine incubation. In 50% of the samples we did not detect a clear shift. In these samples, the percentage of matured oocytes was not high and the shift present in some oocytes might have been masked by the failure to shift in others. In the other samples, only the fastest-migrating form of p34^{cdc2} was revealed by the antibody, but in two of the homogenates, although the shift appeared total, the percentage of GVBD did not reach 100%. Of course this result might be a misinterpretation since GVBD was measured on one batch of oocytes while the shift was analysed on another. We cannot ascertain that exactly the same percentage of GVBD was present in both samples, though analysis were performed at the same time. Another hypothesis might be that the MPF that is activated by procaine does not function optimally, some oocytes being still at the prophase I stage despite MPF activation. The fact that H1 kinase activity was not very high in these samples is in agreement with this hypothesis. The fact that procaine modifies pH_i (Houle & Wasserman, 1983; our unpublished results) might explain such a difference since the cdc2 kinase, like all enzymes, requires a range of pH values to function optimally.

Surprisingly, the shift that we detected in those oocytes which were incubated for 16 h was never detected in those incubated for 24 h. This might be explained by an inactivation of MPF in some oocytes. The presence of the active form of p34^{cdc2} in some oocytes could here again be masked by the two bands present in the other oocytes of the same sample. The fact that only the slowest-migrating p34^{cdc2} isoform was detected in one sample of oocytes that had been incubated for 24 h in procaine is in agreement with this analysis. Unfortunately, the H1 kinase assay was not performed on this sample. The analysis of H1 kinase activity in the other samples at this stage agrees with a partial inactivation of MPF since the rate of [³²P]phosphate incorporation did not increase significantly after 24 h in comparison with homogenates from oocytes treated for 16 h. However, the percentage of those in GVBD was higher.

In procaine-treated oocytes, the presence of a pH_i which does not favour an optimal action of MPF, as well as the inactivation of MPF itself, might explain why spindles and chromosomes were not always found in oocytes in which the germinal vesicle had

broken down (Flament *et al.*, 1996). Indeed, inhibition of MPF in progesterone-matured oocytes leads to chromosomes decondensation and spindle disappearance (Rime *et al.*, 1989). One might argue that procaine may non-specifically inhibit MPF to some degree. However, we favour the possibility that this inhibition is due to a reduction in the level of protein synthesis. Indeed, it has been shown that in the presence of protein synthesis inhibitors, GVBD can occur in *Xenopus* oocytes following MPF injection, though spindles do not form (Huchon *et al.*, 1993; our personal observations) – a situation similar to that induced by procaine (Flament *et al.*, 1996).

Although it has been reported that protein synthesis increases following procaine treatment (Houle & Wasserman, 1983), it is not known whether protein synthesis is needed for procaine action. It would be interesting to define more clearly the role of protein synthesis during procaine induction. Specifically, it might be focused on the appearance and destruction of cyclin B during the 16 and 24 h time point where we see activation and inactivation of p34^{cdc2}. This is work we aim to pursue in the future. We have already performed some experiments showing that, when protein synthesis is inhibited by cycloheximide, GVBD is greatly reduced following the incubation of *Xenopus* oocytes in procaine-containing medium (unpublished results).

The conclusions of these studies were reinforced by the results of cytoplasm injection experiments. On one hand, the cytoplasm taken from oocytes exposed for 8 h to procaine never induced GVBD in recipient oocytes. This result was consistent with H1 kinase measurements and western blot analysis. On the other hand, the cytoplasm of oocytes that had been incubated for 16 h in procaine-containing medium was able to induce GVBD in recipients. GVBD was observed soon after the injection and much faster than when oocytes were simply incubated in procaine solutions. This is consistent with a MPF-like activity, which always appears very early after the injection (Reynhout & Smith, 1974). However, the cytoplasm of such donors was not very efficient at inducing GVBD compared with progesterone-treated donors. Moreover, when recipients were at the GVBD stage, spindles and chromosomes were found in only a few cases and these structures were not always correctly located. When the cytoplasm was taken from oocytes that had been incubated for 24 h in procaine-containing medium, although H1 kinase activity had been detected in donors at this stage, we never observed GVBD in the recipient oocytes. We do not think that the maturation of recipient oocytes was the result of a residual procaine activity on the needle or in the injectate because: (1) recipients should have undergone GVBD not only with cytoplasm taken after 16 h

but also with cytoplasm taken after 8 or 24 h; (2) procaine injection does not induce GVBD in stage VI oocytes (our unpublished results).

These results suggest that differences exist between procaine- and progesterone-activated MPF. An unstable property of procaine-activated MPF is probably involved in the low efficiency of the cytoplasm injections that we observed. Indeed, at the end of a normal meiosis MPF is very stable, mainly due to the action of the cytostatic factor (Sagata, 1996). The MPF that is produced for entry into the first division of meiosis has to disappear at the metaphase/anaphase transition and is rather an unstable MPF (Gerhart *et al.*, 1984). Unfortunately, the effects of injections of this early MPF are unknown since no cytological studies have been performed following such an injection. Results have been obtained only from either white spot detection or dissection after boiling. We have begun injection experiments with cytoplasm taken a few hours after progesterone stimulation of the oocytes, just before GVBD, that will be analysed cytologically to determine the precise character of this MPF. If the induction of GVBD without spindle formation and chromosome condensation occurred, it could therefore be compared with the results obtained from procaine-exposed oocytes.

In conclusion, our various analyses, which are consistent with each other, show that a transient activation of MPF is responsible for the particular effects of procaine. We have now to discover the mechanisms that lead to MPF activation following procaine exposure. The knowledge of these mechanisms could be helpful for the understanding of some steps in progesterone-induced maturation that are still unclear.

Acknowledgements

This work is dedicated to Georges Declety. We thank Drs L. Meijer and T. Hunt for reading the manuscript and helpful comments. We would like to thank Dr L. Meijer for providing roscovitine as well as for helping us to measure H1 kinase activity. This study was supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale (DRED, EA no. 1033), the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Région Nord - Pas-de-Calais (Centre de Biologie Cellulaire).

References

- Atherton-Fessler, S., Liu, F., Gabrielli, B., Lee, M.S., Peng, C.-Y. & Piwnicka-Worms, H. (1994). Cell cycle regulation of the p34^{cdc2} inhibitory kinases. *Mol. Biol. Cell* **5**, 989–1001.
- Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A.C., Lew, J. & Wang, J.H. (1994). Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 13 279–88.
- Dumont, L.W. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153–80.
- Flament, S., Browaeys, E., Rodeau, J.L., Bertout, M. & Vilain, J.P. (1996). *Xenopus* oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 471–6.
- Gerhart, J., Wu, M. & Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**, 1247–55.
- Goodger, N., Gannon, J., Hunt, T. & Morgan, P.R. (1996). On the abundance and localisation of p34^{cdc2} in the cells of normal, hyperplastic and malignant human lymphoid and epithelial tissues. *J. Pathol.* **178**, 422–8.
- Hausen, P. & Riebesell, M. (1991). *The Early Development of Xenopus laevis: An Atlas of Histology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Houle, J.G. & Wasserman, W.J. (1983). Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **97**, 302–12.
- Huchon, D., Rime, H., Jessus, C. & Ozon, R. (1993). Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biol. Cell* **77**, 133–41.
- Jessus, C., Rime, H., Haccard, O., Van Lint, J., Goris, J., Merlevede, W. & Ozon, R. (1991). Tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte: antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* **111**, 813–20.
- King, R.W., Jackson, P.K. & Kirschner, M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563–71.
- Kishimoto, T. (1994). Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 185–91.
- Lee, S.C. & Steinhardt, R.A. (1981). pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **85**, 358–69.
- Masui, Y. (1992). Towards understanding the control of the division cycle in animal cells. *Biochem. Cell Biol.* **70**, 920–45.
- Meijer, L. & Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin mitotic divisions. *Exp. Cell Res.* **174**, 116–29.
- Néant, I. & Guerrier, P. (1988). Meiotic reinitiation in the mollusc *Patella vulgata*: regulation of MPF, CSF and chromosome condensation activity by intracellular pH, protein synthesis and phosphorylation. *Development* **102**, 505–16.
- Nebreda, A.R. & Hunt, T. (1993). The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* **12**, 1979–86.
- Reynhout, J.K. & Smith, L.D. (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev. Biol.* **38**, 394–400.
- Rezai, K., Kulisz, A. & Wasserman, W.J. (1994). Protooncogene product, *c-mos* kinase, is involved in upregulating Na⁺/H⁺ antiporter in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* **267**, C1717–22.
- Rime, H., Néant, I., Guerrier, P. & Ozon, R. (1989). 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* **13**, 169–79.

Sagata, N. (1996). Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* **6**, 22-8.

Solomon, M.J. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 180-6.

Stith, B.J. & Maller, J.L. (1984). The effect of insulin on intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **102**, 79-89.

Vesely, J., Havlicek, L., Strand, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J.Y., Detivaud, L., Leclerc, S. & Meijer, L. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771-86.

Abstract

Role of protein kinases and protein phosphatases in the metaphase II arrest of *Xenopus laevis* oocytes.

Xenopus oocytes are naturally blocked at the metaphase of the second division of meiosis until fertilization. This arrest is due to a cytostatic factor (CSF). Several kinases (c-mos, MAPK, p90^{Rsk}, cdk2) have been implicated in the CSF, that maintains a high level of MPF (cdk1/cyclin B) activity in the cell. These kinases are inactivated at the fertilization or by calcium increasing treatments. We have used protein kinases inhibitors and protein phosphatases inhibitors to study the metaphase II arrest and its release.

6-diméthylaminopurine (6-DMAP), a protein kinases inhibitor with a broad spectrum, activates metaphase II-arrested oocytes whereas olomoucine and roscovitine, two more specific inhibitors of cdk, do not. The effects of 6-DMAP have been compared to those of the calcium ionophore A23187. The formation of a pronucleus is observed in both cases. A23187 induces the inactivation of MAPK, the proteolysis of c-mos and cyclins B. In the 6-DMAP-treated eggs, the inactivation of MAPK occurs earlier and cyclins B are stable whereas c-mos is degraded. Even if 6-DMAP induces a transitory increase in calcium, the latter is not involved in the degradation of c-mos.

The injection of ammonium molybdate, a tyrosine phosphatase inhibitor, prevents the metaphase II release induced by A23187. Cortical granules undergo exocytosis but cdk1 and MAPK are not inactivated, c-mos and cyclins B are not degraded.

Our results suggest that c-mos proteolysis might be due to dephosphorylation related to the drop in MPF activity. Moreover, a tyrosine phosphatase seems to be involved downstream the calcium signal.

