

Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1)

U.F.R. de Biologie

Numéro national

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé Lille1-Lille2

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le 29 novembre 2004 par

Monsieur BAERT Frédéric

En vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille1

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Fonctions de la voie $p39^{Mos}$ - $Xp42^{Mpk1}$ dans la reprise de la méiose, la morphogenèse du fuseau et la phosphorylation de Raf induites par la progestérone ou l'insuline dans les ovocytes de xénope.

En présence du jury constitué par :

Monsieur Joël MAZURIER,	Président
Madame Catherine JESSUS,	Rapporteur
Monsieur Stéphane FLAMENT,	Rapporteur
Monsieur Luc BUEE,	Examineur
Monsieur Jean-François BODART,	Examineur
Monsieur Jean-Pierre VILAIN,	Directeur de Thèse

Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1)

U.F.R. de Biologie

Numéro national

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé Lille1-Lille2

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le 29 novembre 2004 par

Monsieur BAERT Frédéric

En vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille 1

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Fonctions de la voie $p39^{Mos}$ - $Xp42^{Mpk1}$ dans la reprise de la méiose, la morphogenèse du fuseau et la phosphorylation de Raf induites par la progestérone ou l'insuline dans les ovocytes de xénope.

En présence du jury constitué par :

Monsieur Joël MAZURIER,	Président
Madame Catherine JESSUS,	Rapporteur
Monsieur Stéphane FLAMENT,	Rapporteur
Monsieur Luc BUEE,	Examineur
Monsieur Jean-François BODART,	Examineur
Monsieur Jean-Pierre VILAIN,	Directeur de Thèse

Remerciements

Au risque d'être long, au moins je serai sincère et nul ne me reprochera, je l'espère, d'être ingrat.

Je remercie monsieur J. Mazurier d'avoir accepté de présider le jury lors de ma soutenance.

Je remercie madame C. Jessus d'avoir bien voulu consacrer une partie de son temps à examiner ce travail en tant que rapporteur.

Merci Stéphane d'avoir accepté d'être rapporteur dans mon jury de thèse. Tu as été le premier à me faire confiance lorsque tu étais au laboratoire de Biologie du Développement de Lille et que tu m'avais accepté en tant que D.E.A.

Je remercie monsieur L. Buée d'avoir accepté de siéger dans ce jury en qualité d'examineur.

Je remercie monsieur H. Hondermarck et monsieur X. Desbiens de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biologie du Développement de l'USTL.

Je tiens à remercier monsieur J.P. Vilain de m'avoir accepté en DEA puis en thèse dans son équipe de Régulation Ionique et Moléculaire du Cycle Cellulaire. Les cinq années que j'ai passées au sein de votre équipe m'ont apporté plus qu'une formation à la recherche.

Je remercie monsieur N. Duesbery pour sa collaboration, ses bons conseils et ses judicieuses remarques concernant mon travail. Je le remercie également pour la simplicité dont il a fait preuve à mon égard lors du colloque MAP kinases de Paris en 2001.

Je remercie A. Nebreda, G. Vande Woude et N.G. Ahn pour leur précieuse collaboration à mon travail.

Mes remerciements vont également à monsieur Alain Leprêtre, dit « Vauban », pour sa précieuse collaboration en matière d'analyse statistique et sa patience lorsqu'il fallait me l'expliquer.

Merci à Edith, Katia et Marc pour le cadre de travail agréable. Je vous prie un peu tard, de m'excuser de tant jurer quand je m'énerve à la paillasse ou à l'ordinateur.

Merci Anne-Frédérique d'avoir toujours eu du temps pour m'écouter et me conseiller.

Merci Béa de m'avoir aidé lorsque j'étais en première année. Dommage que les résultats n'aient pas été à la hauteur des espérances. Tu m'as permis de me faire quelques petites armes en Bio. Mol.

Merci Sylvianne pour ton humanité, ta gentillesse. Mais aussi pour ta rigueur.

Merci Valérie pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Merci Chantal (B.) pour ton sourire et ta patience quand la photocopieuse et l'agrafeuse me manifestaient leur hostilité.

Merci Annie, Mathilde, Régine, Johann, pour vos conseils, vos connaissances techniques et de m'avoir souvent dépanné.

Merci à Chantal et Vanessa, bon courage et bonne chance pour la suite.

Merci à Juliette. Le D.E.A. aurait été plus pénible si j'avais été seul étudiant.

Je remercie l'association pour la recherche contre le cancer d'avoir financé ma dernière année de thèse.

Merci Jean-François. Merci de n'avoir jamais douté quand même moi je n'y croyais plus. Merci d'avoir su me guider même si parfois ce fut avec dureté. Merci de m'avoir tant appris. Tu as été plus pour moi que le co-encadrant : tu as été le grand frère dont j'avais besoin.

Merci Arlette. Simplement merci car les motifs de gratitude sont si nombreux que je ne peux les énumérer sans en oublier. Merci de m'avoir tant aidé dans mes manips malgré le peu de temps que tu avais pour le faire. Merci surtout de m'avoir si souvent, trop souvent, remonté le moral et de m'avoir aidé à me relever à chaque fois. Sans Jean-François et toi, ce travail n'aurait jamais vu le jour !

Merci à Nico, Guigui, Vince, Nico, Ririe, Toto, Katouze, Maxou, Denis, Bâton, Guillaume, Bebelle, Vince, Christophe, Cédric, Cédric, Olive, Céline, Greg, Steph, Seb, -Xavier, Jean-Pierre, André, Gérard, Jean-Luc, Philou, Nat, Loulou, Stick, l'Harmonie et les autres. Ne pas pouvoir citer tout le monde me crève le cœur ! Merci d'être mes amis. D'accepter avec indulgence mes défauts, mes erreurs, mes c..., mes gaffes, mon sale caractère (surtout pendant la rédaction). Merci d'avoir fait semblant et même d'avoir essayé d'être intéressés, ce n'était pas si simple j'en ai conscience.

Merci, Papa, Maman, de m'avoir aidé à réaliser ce rêve et les autres et de me pardonner mon caractère impossible ainsi que mon incapacité à vous montrer mon affection.

S.N. ; S.D. ; S.M.

A tous ceux qui y ont cru

Table des matières

Résumé	14
Summary	15
Historique	16
Chapitre I : Introduction	17
I Le cycle cellulaire	17
II Cas particulier : la reprise méiotique des ovocytes	17
Chapitre II : La maturation de l'ovocyte de xénope : modèle d'étude de la régulation de la transition G2/M	19
I L'ovocyte immature	19
II Evénements cytologiques	20
1. GVBD et formation du fuseau	20
2. Structure moléculaire du fuseau	21
2.1. Microtubules et protéines associées	21
2.1.1. Les protéines de stabilisation des microtubules : les MAPs	22
2.1.2. Les protéines de déstabilisation des microtubules	22
2.2. Assemblage du fuseau méiotique acentriolaire	23
III Stimuli inducteurs de la reprise de la méiose	25
1. Les hormones stéroïdes	25
1.1. La progestérone	25
1.2. Les autres stéroïdes	27
2. Les facteurs de croissance	27
2.1. L'insuline et l'IGF1	27
2.2. Autres facteurs de croissance	28
Chapitre III : Evénements biochimiques précoces de la reprise méiotique	29
I Stimulation par la progestérone	29
1. Diminution de l'AMP cyclique et inhibition de la Protéine Kinase A	29
2. Le métabolisme des phosphoinositides et l'activation de la Protéine Kinase C	31
II Stimulation par l'insuline ou l'IGF1	34

1. Rappel des voies de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les cellules somatiques	34
2. La voie de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les ovocytes de xénope ...	36
III Transcription et synthèse protéique au cours de la méiose.....	38
IV Différences entre les voies de transduction de la progestérone et de l'Insuline/IGF1	40
Chapitre IV : Le MPF et les complexes Cycline/CDK.....	42
I Mise en évidence.....	42
II Purification et identification	42
1. p34 ^{Cdc2}	42
2. La cycline B.....	43
III Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la maturation ...	44
1. Variations de l'activité MPF	44
2. La CAK et la cycline B.....	44
3. Myt1 et Wee1.....	46
4. Cdc25.....	47
5. Synthèse et dégradation de la cycline B	49
6. Protéines associées au MPF.....	51
III Cibles du MPF	52
Chapitre V : Les voies des MAP kinases	54
I Généralités	54
II Voies MAP kinases et reprise méiotique.....	55
1. Les modules identifiés dans l'ovocyte.....	55
1.1. Module MAPKKK.....	55
1.1.1. p39 ^{Mos}	55
1.1.2. Raf.....	58
1.2. Les voies MAP Kinases.....	60
1.2.1. La voie Mek1-Xp42 ^{Mpk1}	60
1.2.2. La voie JNK	61
1.2.3. La voie MKK6/p38 ^{MAPK}	61
1.3. Le module MAPKAP kinase.....	62
1.4. Les MK phosphatases	62

2. Rôle des voies MAP kinases dans la reprise méiotique	63
Résultats	73
Objectifs généraux	74
Premiers résultats : Effets de la geldanamycine et de l'injection d'ARN messagers codant la phosphatase Mkp3.	77
Introduction	78
Résultats et discussion	79
1. Effets de la geldanamycine sur la maturation induite par la progestérone	
79	
2. Effets de l'injection d'ARNm codant Mkp3 sur la maturation induite par la progestérone	81
Publication 1 : Differential roles of p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in <i>Xenopus</i> oocytes.	84
Introduction	85
Résultats et discussion	86
Publication 2 : Xp42^{Mpk1} activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated <i>Xenopus</i> oocytes.	90
Introduction	91
Résultats et discussion	92
Conclusions et perspectives	94
Rôle des voies MAP kinases dans la reprise méiotique des ovocytes de xénope	95
Activation de la voie Mek1-Xp42 ^{Mpk1} : rôle de p39 ^{Mos} et de Raf	96
La voie p39 ^{Mos} -Mek1-Xp42 ^{Mpk1} -p90 ^{Rsk} et la morphogenèse du fuseau dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	98
Annexes	101
Modulation of O-GlcNAc glycosylation during <i>Xenopus</i> oocyte maturation	102
Introduction	103
Résultats et Discussion	104

Listes des illustrations

Figure 1 : Le cycle cellulaire	p.17
Figure 2 : Maturation ovocytaire et cycle cellulaire	p.18
Figure 3 : Stades de la vitellogenèse	p.19
Figure 4 : Ovocytes mature et immature	p.19
Figure 5 : Schéma de coupe d'un ovocyte immature en prophase I	p.19
Figure 6 : Analyse cytologique de la maturation des ovocytes de xénope	p.20
Figure 7 : Déroulement de la maturation des ovocytes de xénope	p.21
Figure 8 : Modèles de morphogenèse du fuseau	p.23
Figure 9 : Protéines impliquées dans la morphogenèse du fuseau <i>in vitro</i> autour de billes de chromatine	p.24
Figure 10 : Etapes précoces de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone : AMPc et PKA	p.29
Figure 11 : Etapes précoces de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone : Métabolisme des phosphoinositides et PI3-K	p.31
Figure 12 : Voie de signalisation déclenchée dans les ovocytes de xénope par l'insuline/IGF1	p.36
Figure 13 : Polyadénylation des ARNm et synthèse protéique	p.38
Figure 14 : Mise en évidence du MPF et de son autoamplification	p.42
Figure 15 : Complexes Cycline/CDK et régulation du cycle cellulaire	p.43
Figure 16 : Activation du MPF dans l'ovocyte de xénope	p.44
Figure 17 : Les voies des MAP kinases	p.54
Figure 18 : Raf-1 de xénope et les Raf humaines	p.59
Figure 19 : Les voies MAP kinase lors d'une stimulation de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone	p.64
Figure 20 : Stratégies mises en œuvre pour étudier la voie MAP kinase lors d'une stimulation par la progestérone	p.74
Figure 21 : Stratégies mises en œuvre pour étudier la voie MAP kinase lors d'une stimulation par l'insuline	p.74
Figure 22 : Effets de doses croissantes de geldanamycine sur l'activation de la voie p39Mos-Xp42Mpk1 lors d'une stimulation par la progestérone	p.79

Figure 23 : Effets de doses croissantes de geldanamycine sur la cinétique de la maturation induite par la progestérone	p.79
Figure 24 : Aspect des taches de maturation lors d'un traitement par la geldanamycine	p.80
Figure 25 : Influence de doses croissantes de geldanamycine sur la morphogenèse du fuseau	p.80
Figure 26 : Effets de l'injection d'ARN messagers codant MKP3 sur la phosphorylation de Xp42Mpk1 lors d'une stimulation par la progestérone	p.81
Figure 27 : Effets de l'injection d'ARN messagers codant MKP3 sur la cinétique de la maturation induite par la progestérone	p.81
Figure 28 : Effets de l'injection d'ARN messagers codant MKP3 sur la phosphorylation de Xp42Mpk1 et de p90Rsk lors d'une stimulation par injection de Cdc25	p.82
Figure 29 : Structures de nos différents types d'oligonucléotides	p.85
Figure 30 : Effets de l'injection d'oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39Mos (p39Mos-PSAS) sur l'activation de la voie p39Mos-Mek1-Xp42Mpk1-p90Rsk par l'insuline	p.92
Figure 31 : Schéma d'activation de la voie MEK1-Xp42Mpk1-p90Rsk dans les ovocytes de xénope	p.98
Figure 32 : Modifications d'un résidu sérine et d'un résidu thréonine par O-N-acétylglucosaminylation	p.103

Listes des Tableaux

Tableau 1 : Effets des MAPs sur la dynamique des microtubules	p.22
Tableau 2 : Stimuli induisant la maturation <i>in vitro</i> des ovocytes de xénope	p.25
Tableau 3 : Effets de différents inhibiteurs des voies MAP kinase sur la reprise méiotique des ovocytes de xénope	p.65 p.95
Tableau 4 : Influence de doses croissantes de geldanamycine sur la morphogenèse du fuseau	p.80
Tableau 5 : Effets des oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39Mos sur la reprise méiotique déclenchée par l'insuline	p.93
Tableau 6 : Importance des membres de la voie p39Mos-MEK1-Xp42Mpk1-p90Rsk dans la morphogenèse du fuseau méiotique des ovocytes de xénope	p.99

Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclase	MKP : MAPK phosphatase (Phosphatase de MAPK)
APC : Anaphase promoting complex (complexe de promotion de l'anaphase)	MPF : M phase / Maturation promoting factor (facteur de promotion de la phase M/ de la maturation)
ARNm : ARN messenger	MTOC : Microtubule organizing center (centre organisateur de microtubule)
CaMKII : Calcium dependent calmoduline kinase II (Calmoduline kinase calcium dépendante II)	Mu-Mos : protéine Mos murine purifiée
CA-Rsk : protéine Rsk purifiée constitutivement active	O-GlcNAc : O-N-Acétylglucosaminylation
Cdc : Cell division cycle (cycle de division cellulaire)	O-GlcNAcase : O-N-Acétylglucosaminidase
CDK : Cyclin dependent kinase (kinase dépendante des cyclines)	OGT : O-N-Acétylglucosaminyl transférase
CPE : Cytoplasmic polyadenylation element (élément de polyadénylation cytoplasmique)	p39^{Mos}-AS : Oligonucléotides antisens contre la synthèse de p39 ^{Mos}
CPEB : Cytoplasmic polyadenylation element binding protein (protéine de liaison à CPE)	p39^{Mos}-MAS : Oligonucléotides Morpholinos antisens contre la synthèse de p39 ^{Mos}
CSF : Cytostatic factor (facteur cytostatique)	p39^{Mos}-MS : Oligonucléotides Morpholinos sens de p39 ^{Mos}
DMSO : Diméthyl sulfoxyde	p39^{Mos}-POAS : Oligonucléotides phosphodiester antisens contre la synthèse de p39 ^{Mos}
ERK : Extracellular regulated protein kinase (protéine kinase régulée par les signaux extérieurs)	p39^{Mos}-POS : Oligonucléotides phosphodiester sens de p39 ^{Mos}
FGF : Fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblastes)	p39^{Mos}-PSAS : Oligonucléotides phosphorothioates antisens contre la synthèse de p39 ^{Mos}
FGFR : FGF receptor (Récepteur du FGF)	p39^{Mos}-PSS : Oligonucléotides phosphorothioates sens de p39 ^{Mos}
GSK3 : Glycogène synthase kinase 3	PDE : Phosphodiesterase
GVBD : Germinal vesicle breakdown (rupture de l'enveloppe nucléaire)	PI3-Kinase : Phosphoinositide 3-kinase
HGF/SF : Hepatocyt growth factor / scattor factor	PKA, B ou C : Protéine kinase A, B ou C
HSP90 : Heat shock protein 90 (Protéine de choc thermique de 90 kDa)	PL A, B, C ou D : Phospholipase A, B, C ou D
IGF : Insulin-like growth factor (facteur de croissance de type insuline)	PTPase : Protein tyrosin phosphatase
IGF1R : Insulin-like growth factor 1 receptor (récepteur de l'IGF1)	Rsk : Ribosomal S6 subunit protein kinase (protein kinase de la sous-unité S6 du ribosome)
JNK : Jun N-terminal protein kinase (protéine kinase de l'extrémité N-terminale de Jun)	RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase
LF : Lethal factor (facteur létal de la toxine de l'anthrax)	SAPK ou SAP kinase : Stress-activated protein kinase (protéine kinase activée par le stress)
LH : Luteinizing hormon (hormone lutéotrope)	SH 2 ou 3 : Src homology domain 2 ou 3 (domaine d'homologie à Src 2 ou 3)
MAP : Microtubule associated protein (protéine associée au microtubule)	TMA : Transient microtubule array (réseau microtubulaire transitoire)
MAPK ou Mpk ou MAP kinase : Mitogen-activated / Microtubule associated protein kinase	TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acetate
MAPKAPK : MAPK activated protein kinase (protéine kinase activée par les MAPK)	VG ; vésicule germinative
MAPKK ou MK ou MAPK kinase : Mitogen-activated protein kinase kinase	WGA : Wheat germ agglutinin
MAPKKK ou MAPKK kinase : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	WS : White spot (Tache de maturation)
MEK : MAPK / Erk protein kinase	xAR : Xenopus androsterone receptor (Récepteur des androstérones de xénope)
MEKK : MEK kinase	XIRS1 : xenopus insulin response element 1 (élément de réponse à l'insuline 1 de xénope)
	xPR : Xenopus progesterone receptor (Récepteur de la progestérone de xénope)
	acorps : Anticorps

Résumé

La reprise méiotique des ovocytes de Xénope est stimulée par la progestérone ou l'insuline. Les ovocytes subissent la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et la formation du fuseau méiotique. Durant la méiose, le MPF (Facteur de promotion de la phase M) et la voie MAP kinase p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} sont activés simultanément. L'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} au moyen d'oligonucléotides antisens Morpholino ou l'inhibition de l'activité de Mek1 par U0126 bloque la voie MAP kinase mais retarde seulement la GVBD induite par la progestérone.

Plusieurs stratégies d'inhibition bloquant la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} ont été utilisées : des oligonucléotides antisens Morpholino ou phosphorothioates, la geldanamycine, U0126 et la MAP kinase phosphatase Mkp3. Nous avons observé que p39^{Mos} est l'enzyme clef dans l'activation de la cascade Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk}, même lors d'une stimulation Ras-dépendante. De plus, la phosphorylation complète de Raf est sous le contrôle de l'activation de Mek1 et Xp42^{Mpk1}. Enfin, l'inhibition de la voie MAP kinase conduit à la formation de structures de type aster dans le cytoplasme. Nous avons déterminé que p39^{Mos} et p90^{Rsk} sont toutes deux requises pour la formation du fuseau bipolaire.

Summary

Meiotic resumption of *Xenopus* oocytes is stimulated either by progesterone or by insulin. Oocytes undergo Germinal vesicle breakdown, chromosomes condensation and spindle morphogenesis. During meiosis resumption, Maturation Promoting Factor (MPF) and the p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} MAP kinase pathway are simultaneously activated. Inhibition of p39^{Mos} synthesis using antisense Morpholino oligonucleotides or inhibition of Mek1 activity using U0126 block the MAP kinase pathway but only delay progesterone-induced GVBD.

Several inhibition strategies to block the p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} pathway were used : Morpholino and phosphorothioates antisense oligonucleotides, geldanamycin, U0126 and MAPK phosphatase Mkp3. We observed that p39^{Mos} is the key enzyme to Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} cascade activation, even though it is stimulated through Ras-dependent pathway. Moreover, Raf complete phosphorylation appeared to be dependent upon Mek1 and Xp42^{Mpk1} activation. Last, MAP kinase pathway inhibition lead to formation of aster-like structure in cytoplasm. We determined that both p39^{Mos} and p90^{Rsk} are required for bipolar spindle formation.

Historique

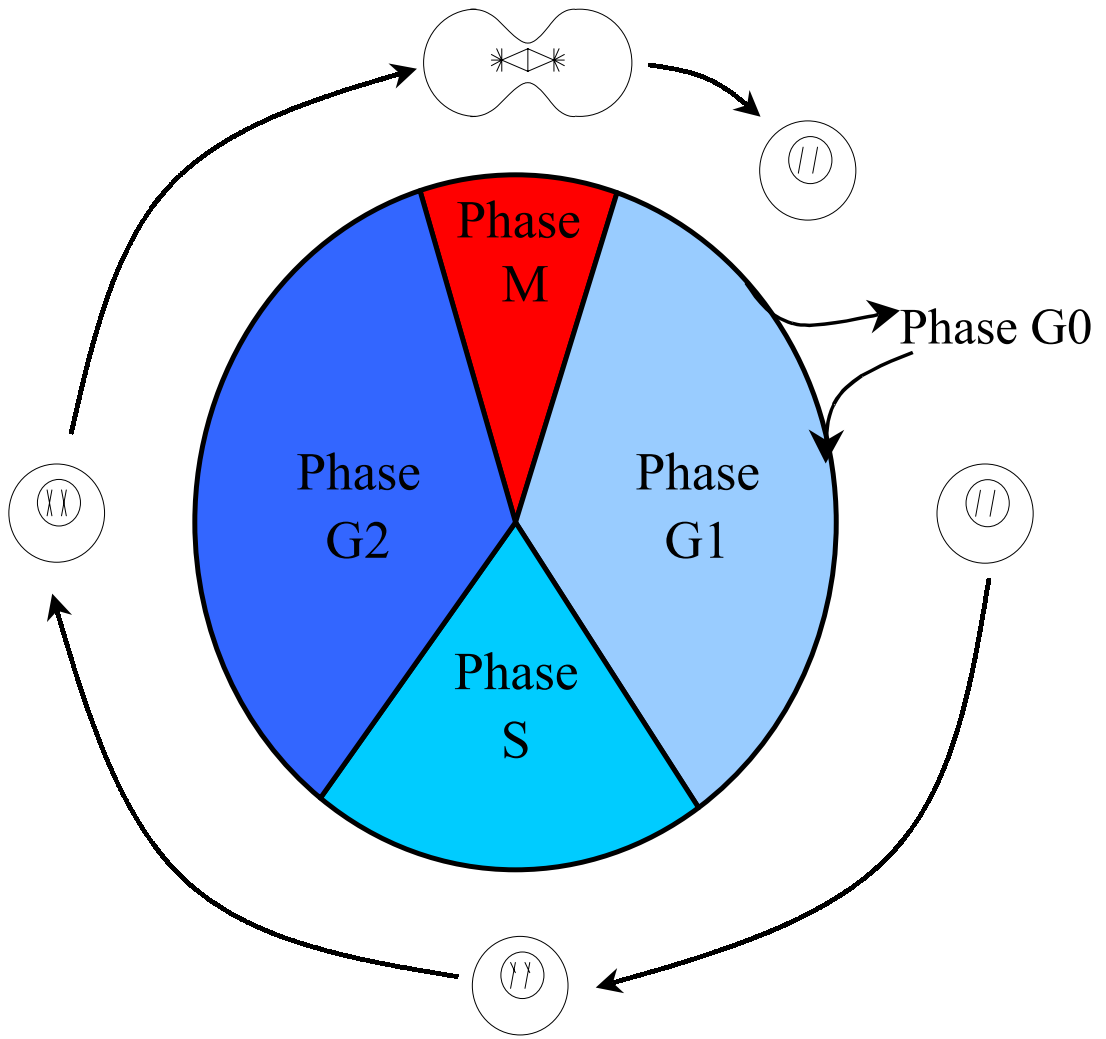


Figure 1 : Le cycle cellulaire

Chapitre I : Introduction

I Le cycle cellulaire

La théorie cellulaire énonce que tous les êtres vivants sont constitués de cellules : d'une seule pour les êtres unicellulaires, de quelques-unes à un très grand nombre pour les pluricellulaires. Dans ce dernier cas, toutes les cellules proviennent d'une cellule initiale par divisions successives. La première description du cycle cellulaire discriminait une phase de division ou mitose (méiose dans le cas particulier de la production des gamètes) et une phase de croissance cellulaire ou interphase. Au début de la deuxième moitié du XXème siècle, des expériences d'incorporation de thymidine tritiée ont montré que la réplication de l'ADN se fait au cours de l'interphase. Le cycle cellulaire est désormais défini comme l'ensemble des étapes de la vie de la cellule entre une division cellulaire et la suivante. Une phase G1 (gap phase 1) précède la phase S de synthèse de l'ADN. Cette dernière est suivie par une phase G2 qui prépare la phase M de division (Fig. 1). Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase, et M la phase de division (mitotique ou méiotique). La progression dans le cycle cellulaire est régulée par le franchissement de points de contrôle en G1/S et G2/M. Seules les cellules peu ou non différenciées se divisent. La différenciation cellulaire se fait par la sortie de cycle des cellules, en une phase appelée G0.

II Cas particulier : la reprise méiotique des ovocytes

La méiose constitue un processus particulier de division cellulaire. Elle conduit à la formation de quatre cellules filles recevant chacune un lot haploïde de chromosomes. La méiose est organisée en deux divisions correspondant à la succession de deux phases M qui ne sont séparées ni par une interphase, ni par une phase de synthèse d'ADN (Fig. 2). Pour les ovocytes hétérolécithes et télolécithes de

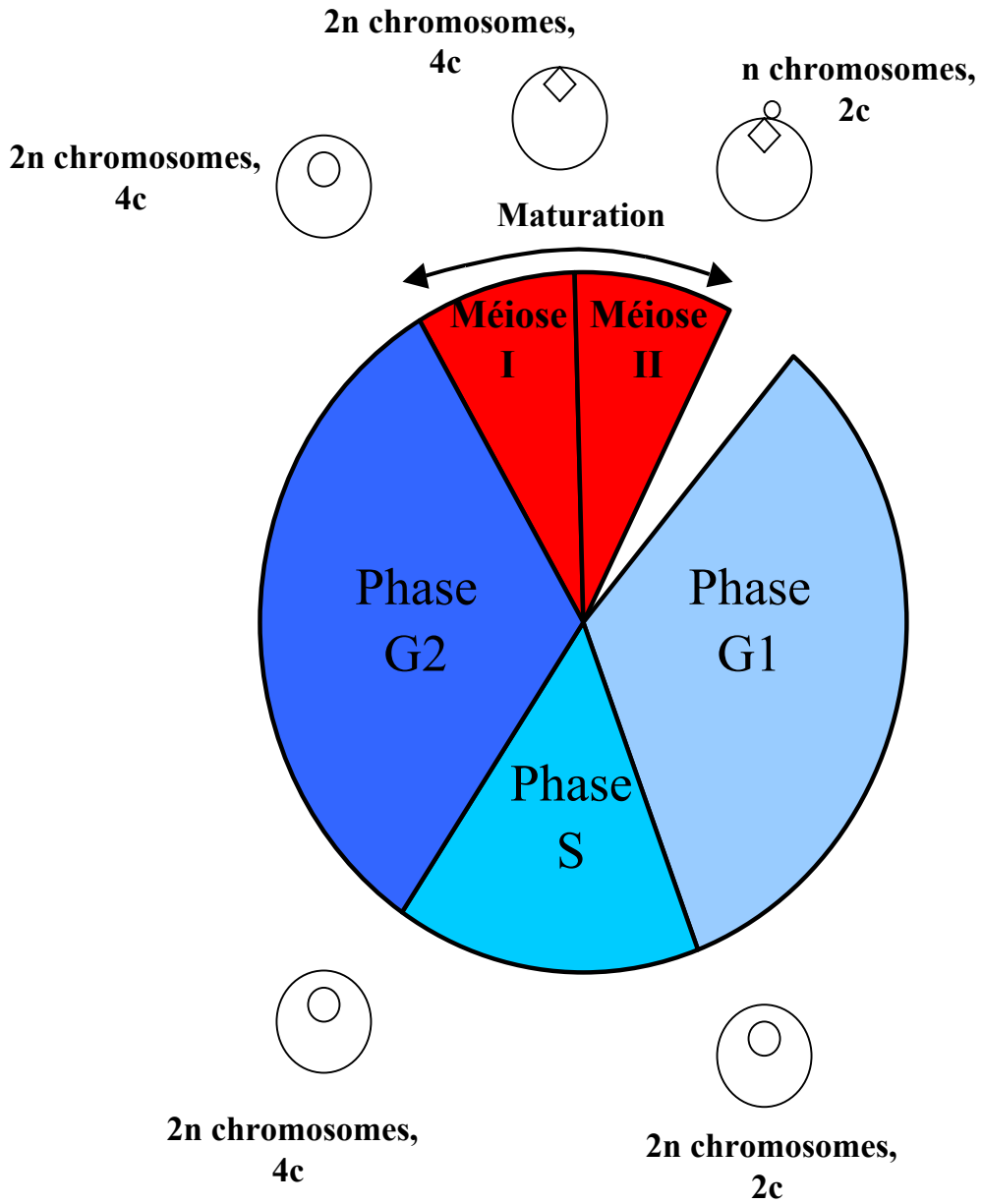


Figure 2 : Maturation ovocytaire et cycle cellulaire

vertébrés, la première étape de l'ovogenèse correspond à l'accumulation de réserves protéiques sous forme de vitellus et d'ARN maternels. La reprise méiotique, ou maturation, est l'étape de l'ovogenèse qui couvre les événements depuis la levée du blocage en prophase I jusqu'à un nouvel arrêt en métaphase II. Lors de la fécondation, le spermatozoïde lève ce blocage métaphasique et conduit à la formation d'un zygote diploïde.

Après les étapes de croissance de l'ovocyte (vitellogenèse), la maturation correspond à la dernière étape de l'ovogenèse et participe à la préparation du gamète à la fécondation. **La maturation méiotique est l'unique exemple de division cellulaire pendant laquelle se succèdent deux phases M sans phase S intermédiaire.**

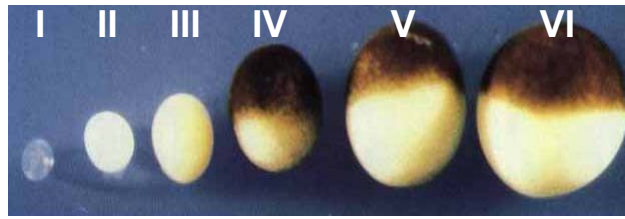


Figure 3 : Stades de la vitellogenèse
(d'après www.nd.edu/~huberlab/home.html)

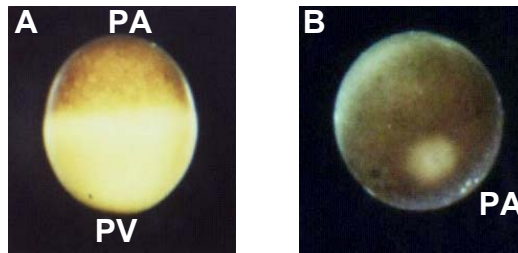


Figure 4 :
A ovocyte immature (prophase)
B ovocyte mature (métaphase II)

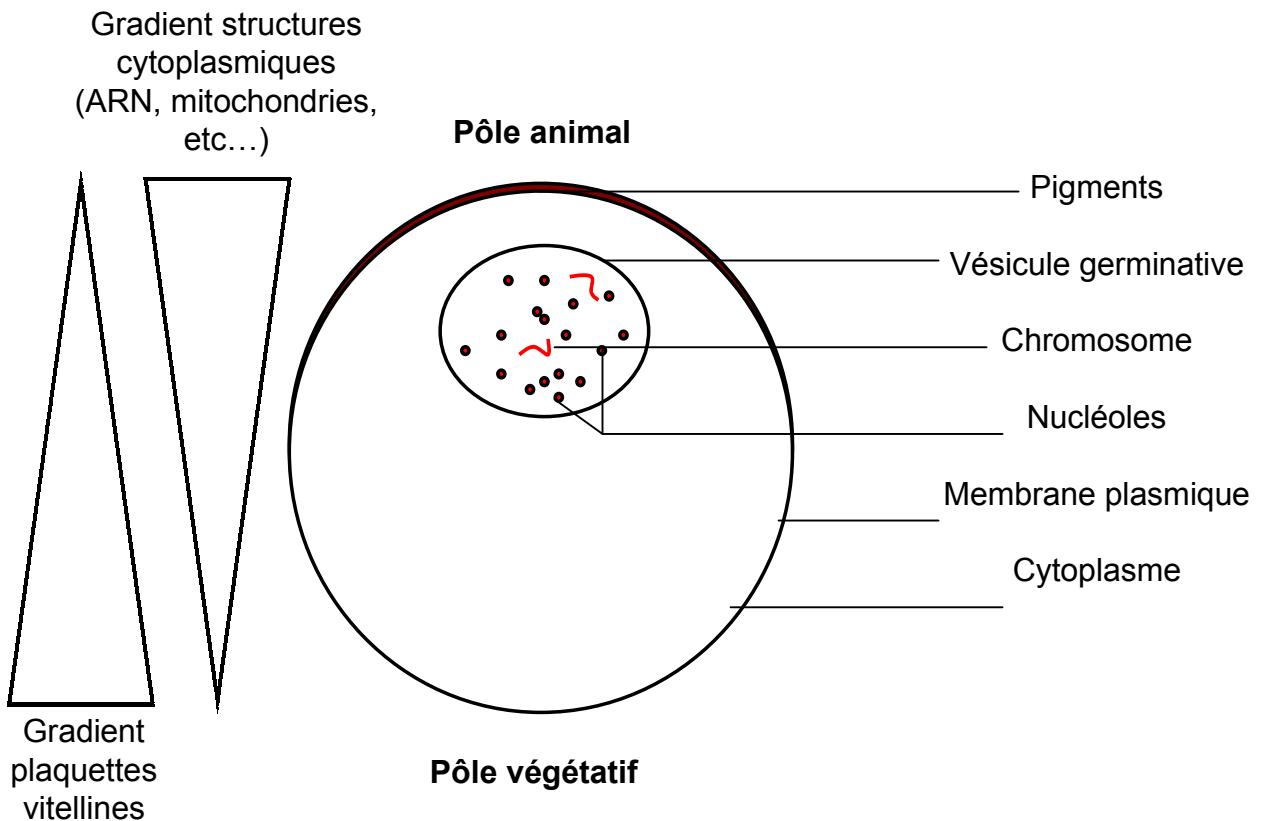


Figure 5 : schéma de coupe d'un ovocyte immature en prophase I

Chapitre II : La maturation de l'ovocyte de xénope : modèle d'étude de la régulation de la transition G2/M

I L'ovocyte immature

L'ovogenèse débute lorsque l'ovogonie entre en phase S de pré-méiose puis en prophase de première division méiotique. Celle-ci s'arrête dès le stade diplotène : l'ovocyte subit un premier blocage de division où l'accumulation des réserves vitellines entraîne une augmentation conséquente de son diamètre (jusqu'à environ 1,2mm). Cette phase d'accroissement a été subdivisée en six classes selon la taille des ovocytes (classification de Dumont : Fig. 3). Les ovocytes de stade V et VI sont les seuls compétents à subir la maturation en présence d'hormones (Dumont, 1972). L'ovocyte de xénope est de type hétérolécithe ; la quantité et la densité des réserves vitellines sont plus importantes au pôle végétatif qu'au pôle animal. La plupart des composés cytoplasmiques (ARN, ribosomes, etc.), le noyau (ou vésicule germinative) et l'ensemble des autres organites sont distribués préférentiellement dans l'hémisphère animal selon un gradient inverse au gradient vitellin (Fig. 5). Dans un ovocyte de stade VI, le diamètre de la vésicule germinative est d'environ 400 μm soit 40 à 50 fois la taille du noyau d'une cellule somatique et 10^5 fois son volume (Fig. 5 et 6A). Cette vésicule germinative contient environ 1500 nucléoles qui correspondent à des copies des gènes codant les ARN ribosomiaux devenues extrachromosomiques et répliquées de manière indépendante. Les nucléoles sont transcriptionnellement actifs durant la majeure partie de l'ovogenèse. La vésicule germinative contient 18 paires de chromosomes ($n=18$, génome allotétraploïde), déjà partiellement condensés (Fig. 5 et 6B) même si certains présentent une structure en écouvillon (lampbrush chromosomes). Dans ce cas, des segments décondensés,

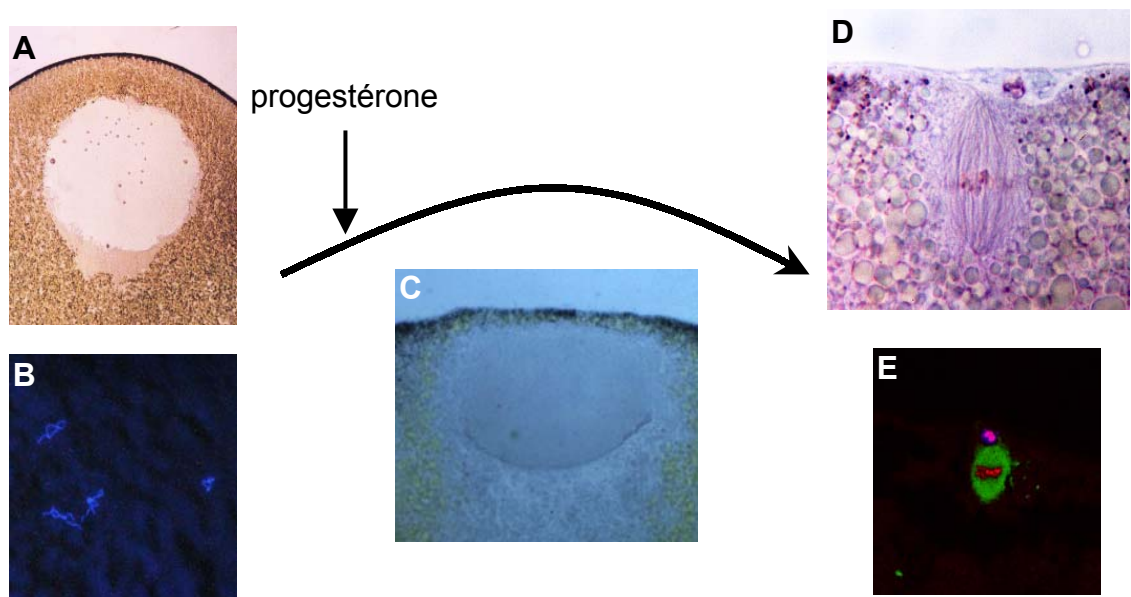


Figure 6 : Analyse cytologique de la maturation des ovocytes de xénope

- A** Vésicule germinative d'ovocyte en prophase I
- B** chromosomes d'ovocyte en prophase I
- C** GVBD et formation du TMA
- D** Fuseau de métaphase II
- E** Fuseau de métaphase II (immunofluorescence)

lieux de synthèse importante d'ARN de transfert, alternent avec des segments condensés, inaptés à la transcription (pour revue, Gall et coll., 2004). Enfin, l'ovocyte est une cellule dont les pigments sont concentrés dans la zone corticale de l'hémisphère animal, déterminant un axe pôle animal-pôle végétatif (Fig. 4 et 5).

II Événements cytologiques

1. GVBD et formation du fuseau

La reprise méiotique est déclenchée par une hormone libérée par les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte et qui sont elles-mêmes sous le contrôle de la LH, hormone gonadotrope produite par l'hypophyse. Dans les premières heures qui suivent la stimulation hormonale, la vésicule germinative migre vers l'apex de l'ovocyte. Au cours de cette migration, l'enveloppe nucléaire se rompt (GVBD). L'ascension de la vésicule germinative provoque une dispersion des pigments qui conduit à l'apparition d'une zone dépigmentée : la tache de maturation (WS), signe morphologique externe le plus évident de la GVBD et de la progression de la méiose.

La rupture de l'enveloppe nucléaire commence à la base, ou face végétative, de la vésicule germinative (Brachet et coll., 1970; Huchon et coll., 1981). Simultanément, un réseau microtubulaire transitoire (TMA) s'assemble à la base du noyau à partir d'un centre organisateur microtubulaire (MTOC : Fig 6C et 7). Le TMA migre rapidement vers le pôle animal alors qu'apparaît la tache de maturation (Huchon et coll., 1981; Gard, 1992). Un agrégat compact de microtubules dérive du TMA et prend une forme cylindrique. Le fuseau de métaphase I s'organise et s'oriente d'abord perpendiculairement à l'axe pôle animal-pôle végétatif. Il pivote ensuite et se place perpendiculairement à la membrane plasmique (Gard, 1992). Pendant la morphogénèse du fuseau, les chromosomes se condensent progressivement. Ils sont d'abord observés dans les régions basales du complexe TMA-MTOC. La condensation des chromosomes est complète lorsque les microtubules sont organisés en structures de type aster ou fuseau. Lorsque le fuseau est

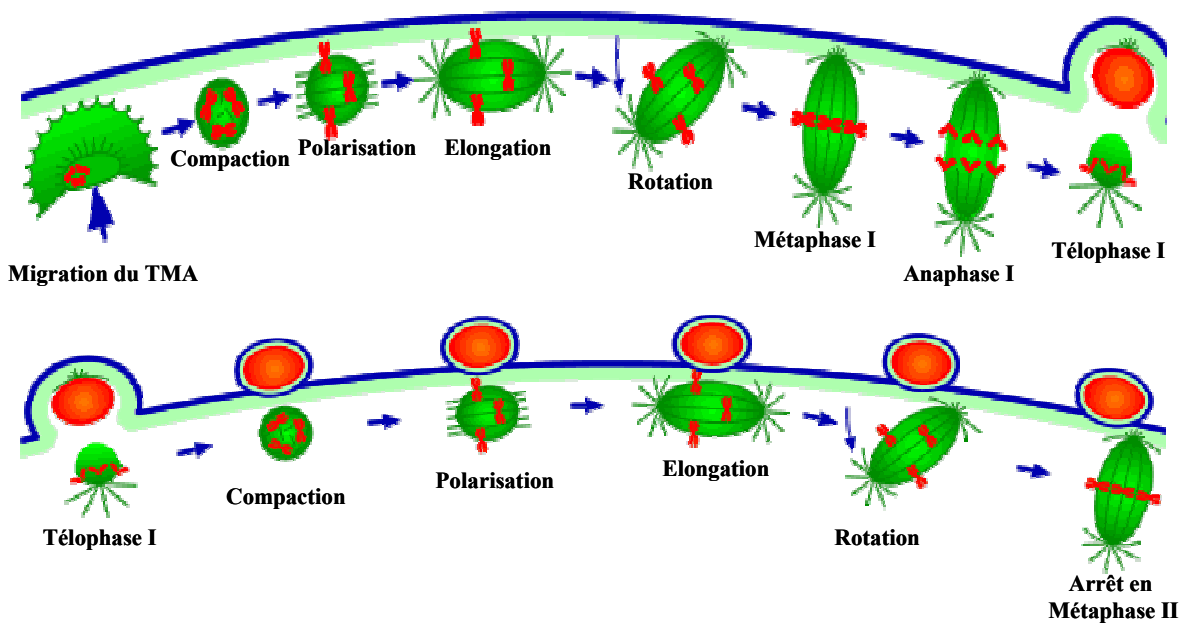


Figure 7 : Déroulement de la maturation des ovocytes de xénope (D'après le site de D. Gard :

http://froglab.biology.utah.edu/Oogenesis/Mature_egg/mature_egg.html).

perpendiculaire à la membrane, les chromosomes sont répartis en une plaque métaphasique (Gard, 1992).

L'anaphase, puis la télophase conduisent à l'expulsion du premier globule polaire. Aucune structure nucléaire ne se reforme : l'ovocyte entre directement en deuxième division de méiose. Un agrégat microtubulaire en forme de disque (compaction et polarisation) s'allonge pour organiser le fuseau bipolaire de métaphase II (élongation : Fig. 7). Ce fuseau s'oriente ensuite perpendiculairement à la membrane plasmique à laquelle il s'ancre par l'un de ses pôles. La division s'arrête en métaphase II, et reste bloquée jusqu'à la fécondation (Fig. 6D et E et 7). Les chromosomes restent toujours bien individualisés pendant toutes ces étapes (Gard, 1992).

2. Structure moléculaire du fuseau

La structure moléculaire et l'organisation du fuseau sont essentielles à la distribution du matériel génétique au cours de la division cellulaire dans les gamètes ou dans les cellules somatiques. La structure du fuseau commence à peine à être élucidée : il s'agit d'un réseau microtubulaire organisé autour des chromosomes et accompagné d'un ensemble protéique complexe.

2.1. Microtubules et protéines associées

Les microtubules sont des assemblages non covalent d'hétérodimères d' α - β tubuline. Selon le modèle d'instabilité dynamique, la polymérisation des microtubules est caractérisée par leur vitesse de croissance (« growth rate » : V_g) et leur dépolymérisation par leur vitesse de rétraction (« shrinkage rate » : V_s). La transition de la croissance vers la rétraction, désignée par le terme « catastrophe » et la transition inverse, de la rétraction vers la croissance (le « sauvetage ») sont caractérisées par leurs fréquences (« catastrophe frequency » : F_{cat} et « rescue frequency » : F_{res}). Les variations de ces quatre paramètres expliqueraient la régulation de la polymérisation des microtubules dans la cellule. La fréquence de

Conditions	Vg ($\mu\text{m}/\text{min}$)	Vs ($\mu\text{m}/\text{min}$)	Fcat (min^{-1})	Fres (min^{-1})	références
Tubuline pure (8 μM)	0,5	15-30	0,5	0	Chrétien et coll., 1995
Tubuline pure (20 μM)	3,5	15-30	0	0	Chrétien et coll., 1995
MAPs interphase	4,5	0	0	0	Andersen, 1998
MAPs mitose	2,1	0	0	0	Andersen, 1998
XMAP 230 (8 μM)	2	2	0	0	Vasquez et coll., 1994 Vasquez et coll., 1999
XMAP310 (14 μM)	1,5	10	0,1	1,2/(0,2)	Andersen et Karsenti, 1997
XMAP215 (10 μM)	8	50	1	$\ll 1$	Vasquez et coll., 1994

Tableau 1 : Effets des MAP sur la dynamique des microtubules (modifié d'après Andersen, 2000)

nucléation constitue un cinquième paramètre (Andersen, 1999). La nucléation est le processus de formation *de novo* d'un microtubule. Elle a lieu au niveau de centres organisateurs de microtubules (MTOC) dont les plus caractérisés sont les centrosomes constitués d'une paire de centrioles. On connaît à présent un certain nombre de protéines associées aux microtubules dont le rôle est de les stabiliser ou de les déstabiliser. Ces protéines agissent sur un ou plusieurs des quatre facteurs décrits précédemment.

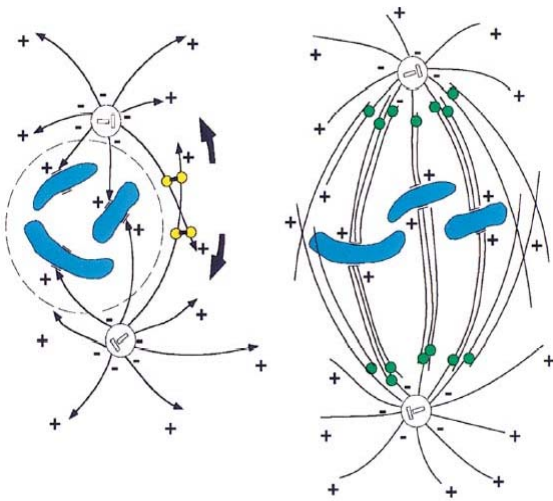
2.1.1. Les protéines de stabilisation des microtubules : les MAPs



Les facteurs stabilisateurs des microtubules connus à l'heure actuelle font partie d'une même famille protéique : les MAP (Microtubule associated proteins). 3 MAP sont actuellement décrites chez le xénope : XMap230 (encore appelée XMap4 en raison de son homologie avec la protéine humaine Map4), XMap215 et XMap310. Si leur effet global sur la stabilisation des microtubules est identique, leur mode d'action est cependant différent (Tableau 1). XMap230/XMap4 stabilise les microtubules en prévenant le phénomène de catastrophe et en ralentissant la vitesse de rétraction (Vasquez et coll., 1994; 1999). XMap310 stabilise les microtubules en augmentant principalement la fréquence de sauvetage (Andersen et Karsenti, 1997). Par contre, XMap215 inhibe le phénomène de sauvetage et ne supprime pas le phénomène de catastrophe *in vitro*. Elle améliore cependant la croissance et la rétraction à l'extrémité (+) des microtubules (Vasquez et coll., 1994). Tous ces effets confèrent à XMap215 un rôle essentiellement promoteur de la dynamique microtubulaire (pour revue, Andersen, 2000).

2.1.2. Les protéines de déstabilisation des microtubules

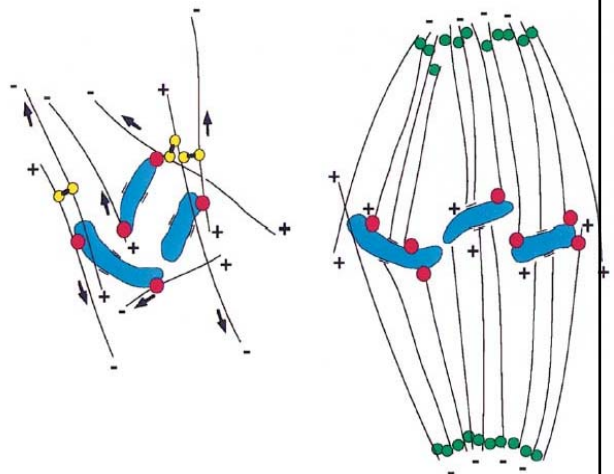
L'identification de protéines de déstabilisation des microtubules est très récente. Les principaux facteurs impliqués sont la stathmine (encore appelée Op18 : oncoprotéine de 18 kDa), les membres de la famille KinI des kinésines, la katanine et Kar3p. La stathmine est une protéine cytoplasmique surexprimée dans certains cancers comme les carcinomes mammaires (Lawler, 1998; Curmi et coll., 2000). Son

A : Modèle centriolaire de formation du fuseau.



-  Moteurs microtubulaires dirigés vers les extrémités +
-  Complexes NuMa/dynéine/dynactine

B : Modèle acentriolaire de formation du fuseau.






-  Moteurs microtubulaires dirigés vers les extrémités + liés à la chromatine
-  Moteurs microtubulaires dirigés vers les extrémités + Complexes
-  NuMa/dynéine/dynactine

Figure 8 : Modèles de morphogenèse du fuseau

(d'après Merdes et coll., 1997)

A : dans les cellules somatiques

B : dans les ovocytes

mécanisme d'action semble varier en fonction du pH intracellulaire (Andersen, 2000). dans les ovocytes de xénope, XKcm1 est la kinésine de type KinI la mieux caractérisée.

2.2. Assemblage du fuseau méiotique acentriolaire

La majeure partie des études a été réalisée dans des extraits d'œufs de xénope dans lesquels les chromosomes sont remplacés par des billes de chromatine (Heald et coll., 1996; Walczak et coll., 1998). Durant l'interphase, la stabilité des microtubules est assurée par une activité accrue des MAP et par l'acétylation des microtubules. Pendant la mitose, les microtubules sont au contraire très dynamiques : la nucléation se produit à partir des centrioles / MTOC et les microtubules polymérisés sont capturés par les kinétochores des chromosomes (Merdes et Cleveland, 1997). Le système microtubulaire est alors concentré dans la zone de formation du fuseau (Andersen, 2000). L'activité des facteurs stabilisateurs varierait en fonction de phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire (Andersen, 2000). Map2, Map4 et Xmap215 sont phosphorylées par le MPF (Faruki et coll., 1992; Ookata et coll., 1995; Itoh et coll., 1997; Vasquez et coll., 1999). L'activité des facteurs déstabilisateurs des microtubules pourrait dépendre de leur localisation cellulaire. La stathmine est régulée négativement par phosphorylation (Marklund et coll., 1996). Dans des extraits interphasiques d'œufs de xénope, elle est phosphorylée à un niveau basal mais devient hyperphosphorylée en présence de chromatine mitotique (Andersen et coll., 1997; Budde et coll., 2001). Quant à XKcm1, elle est active pendant l'interphase et pendant la métaphase (Tournebize et coll., 2000).

Dans les cellules somatiques, le centrosome est dupliqué au moment de la phase S (Winey, 1999). Selon le modèle « recherche et capture », les deux centrosomes se séparent lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire et les microtubules émanant des centrioles pénètrent dans le noyau où certains s'attachent aux kinétochores (Kirschner et Mitchison, 1986). Ce modèle explique la formation du fuseau bipolaire mitotique (Merdes et Cleveland, 1997 ; Fig. 8).

**Etapes d'assemblage
du fuseau autour de
billes de chromatine**

Protéines requises

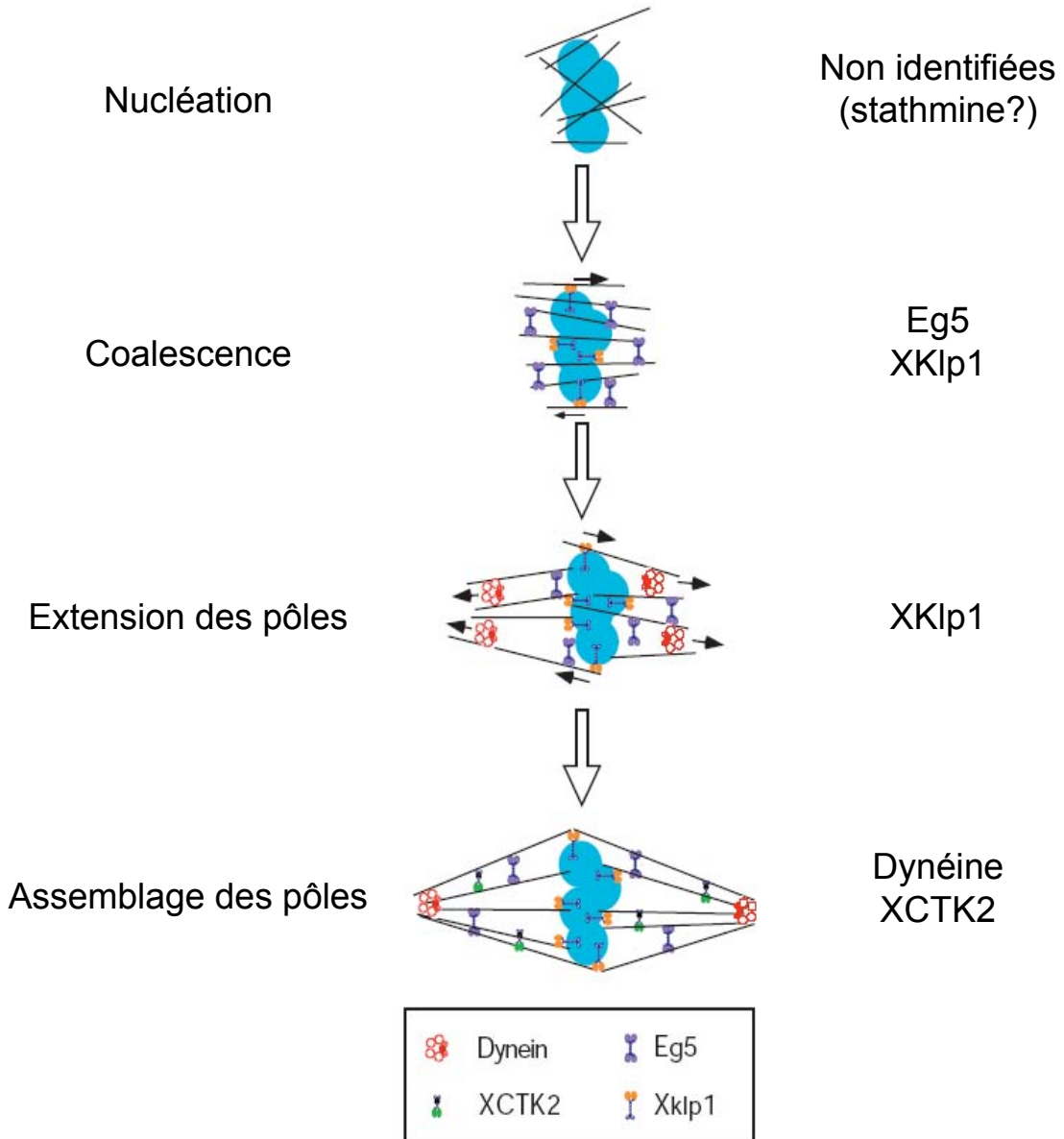


Figure 9 : Protéines impliquées dans la morphogénèse du fuseau *in vitro* autour de billes de chromatine (d'après Walczak et coll., 1998)

L'ovocyte de xénope constitue un modèle acentriolaire de morphogenèse du fuseau (Fig. 8) dans lequel les centrosomes et les kinétochores sont peu impliqués. En effet, un fuseau bipolaire peut s'organiser *in vitro* autour de billes de chromatine dans des extraits d'œufs de xénope où ces deux structures sont absentes (Heald et coll., 1996). De plus, les centrosomes sont inactifs dans les ovocytes de xénope (Gard et coll., 1995). Les chromosomes participeraient activement à la formation du fuseau en générant une activité de nucléation et/ou de stabilisation des microtubules (De Brabander et coll., 1981; Karsenti et coll., 1984). La forme active liée au GTP de la petite GTPase Ran favorise la polymérisation des microtubules (Kalab et coll., 1999; Wilde et Zheng, 1999). Dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope, le facteur d'échange du GDP de Ran, Rcc1, est associé à la chromatine et requis pour la polymérisation des microtubules (Carazo-Salas et coll., 1999; Ohba et coll., 1999). Rcc1 concentre Ran-GTP autour des chromosomes mitotiques et permet localement l'assemblage des microtubules (Carazo-Salas et coll., 1999). Ensuite, un réseau antiparallèle de microtubules se met en place afin que les extrémités (+) soient dirigées vers les chromosomes et que les extrémités (-) s'assemblent en pôles du fuseau. Les membres des familles des kinésines jouent un rôle important dans ce processus (Fig. 9). Des moteurs moléculaires qui se dirigent vers les extrémités (+) des microtubules seraient impliqués dans l'assemblage du réseau microtubulaire du fuseau. C'est le cas de la protéine Eg5 qui est un membre de la famille de BimC des kinésines bipolaires (Kashina et coll., 1996). XKlp1 (*Xenopus* kinesin-like protein 1) interviendrait dans les relations entre microtubules et chromatine, mais aussi dans l'extension des microtubules vers les pôles du fuseau ou force d'éjection polaire. Les moteurs moléculaires qui se dirigent vers les extrémités (-) des microtubules semblent impliqués dans le regroupement de ces extrémités en pôles du fuseau. C'est le cas de XCtx2 (*Xenopus* carboxy terminal kinesin 2, kinésine de la famille KinC) et de la dynéine qui fonctionne en association avec d'autres composants centrosomaux incluant NuMA (protéine nucléaire s'associant à l'appareil mitotique), la dynactine, la péricentrine et la γ tubuline (Walczak et coll., 1998).

inducteur	famille	activité	récepteur	Références
Progestérone	Stéroïde	Baisse du taux d'AMPc	Membranaire non identifié	Masui, 1967 Maller, 2001 Zhu et coll., 2003b
Testostérone	Stéroïde	?	Récepteur d'androgène classique (XAR)	Lutz et coll., 2001
Androstènedione	Stéroïde	?	Récepteur d'androgène classique (XAR)	Lutz et coll., 2001
Insuline/IGF1	Facteur de croissance	Tyrosine kinase	IGF1R	El-Etr et coll., 1971 Maller et Koontz, 1981 Chuang et coll., 1993a Zhu et coll., 1998
FGF	Facteur de croissance	Tyrosine kinase	FGF1R	Browaeys-Poly et coll., 2000
EGF	Facteur de croissance	Tyrosine kinase	h-EGFR	Opresko et Wiley, 1990
NGF	Facteur de croissance	Tyrosine kinase	p140 ^{prototrk}	Nebreda et coll., 1991

Tableau 2 : Stimuli induisant la maturation *in vitro* des ovocytes de xénope

Certaines molécules associées au fuseau *in ovo* sont maintenant identifiées. XMap215 est associée aux microtubules de l'ensemble du fuseau (Becker et coll., 2003). La dynéine est localisée aux pôles du fuseau et aux kinétochores durant la mitose (Pfarr et coll., 1990; Steuer et coll., 1990; Desai et coll., 1997). Dans des extraits cellulaires ou dans des cellules en culture, NuMA, localisée aux pôles des fuseaux mitotiques (Zeng, 2000), est associée au complexe dynéine/dynactine (Merdes et coll., 1996; Merdes et coll., 2000). Dans les ovocytes de xénope, elle est localisée aux pôles du fuseau méiotique (Becker et coll., 2003).

III Stimuli inducteurs de la reprise de la méiose (Tableau 2)

1. Les hormones stéroïdes

1.1. La progestérone

Chez tous les amphibiens étudiés, la production de l'hormone gonadotrope (LH) par l'hypophyse stimule la synthèse et la sécrétion par les cellules folliculaires d'hormones stéroïdes, dont la progestérone (pour revue, Jesus et Ozon, 2004). L'incubation *in vitro* des ovocytes en présence de progestérone déclenche la maturation des ovocytes d'anoures (Masui, 1967; Schuetz, 1967; Smith et coll., 1968; Brachet et coll., 1970) et d'urodèles (Vilain, 1977).

Dans les cellules somatiques, la progestérone exerce le plus souvent une action génomique en interagissant avec un récepteur nucléaire. Au contraire, dans l'ovocyte, de nombreuses expériences suggèrent que la progestérone agit par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. L'injection de progestérone ne permet pas la maturation des ovocytes de *Rana pipiens* (Smith et Ecker, 1969; Masui et Markert, 1971; Smith et Ecker, 1971) ou de *Xenopus laevis* (Jacobelli et coll., 1974; Drury et Schorderet-Slatkine, 1975). En outre, la progestérone, couplée avec des billes de haut poids moléculaire non perméables à la membrane, déclenche la maturation (Baulieu et coll., 1978; Godeau et coll., 1978; Bandyopadhyay et coll., 1998). L'identification de ce récepteur membranaire demeure problématique (Maller,

2001). Récemment, un récepteur nucléaire classique de la progestérone, xPR, a été isolé et cloné dans les ovocytes de xénope grâce à son homologie avec le récepteur humain (Bayaa et coll., 2000; Tian et coll., 2000). L'injection des ARN messagers de xPR accélère la maturation induite par la progestérone et augmente la sensibilité des ovocytes à l'hormone (Bayaa et coll., 2000; Tian et coll., 2000). De plus, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm endogène du récepteur bloque la maturation, blocage qui peut être levé par l'injection du récepteur purifié (Tian et coll., 2000). Cependant, ce récepteur est principalement cytoplasmique même si une fraction significative (5%) est associée à la membrane plasmique (Bagowski et coll., 2001a). Dans ces conditions, les effets membranaires de la progestérone pourraient être engendrés par d'autres récepteurs aux stéroïdes. Chez plusieurs poissons téléostéens, la maturation est déclenchée par des hormones stéroïdes rassemblées sous le terme générique MIH (Maturation inducing hormone) qui agissent également par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire (Nagahama, 1997). L'ADN complémentaire codant le récepteur membranaire de ces stéroïdes a été cloné chez la truite. Son ARNm n'est détecté qu'au niveau du cerveau et des tissus reproducteurs. Sa modélisation informatique indique qu'il s'agit d'un récepteur à sept hélices transmembranaires. La protéine recombinante produite chez *Escherichia Coli* possède un site unique, de haute affinité et saturable pour les progestines. L'expression de ce récepteur dans des cellules mammaliennes entraîne l'activation de la voie MAP kinase et l'inhibition de l'adénylate cyclase en réponse aux progestines. L'injection d'oligonucléotides antisens contre les ARNm de ce récepteur inhibe la maturation des ovocytes déclenchée par la progestine (Zhu et coll., 2003b). Des orthologues de ce gène ont été clonés chez plusieurs vertébrés (xénope, souris, homme). Ces orthologues appartiennent à une famille encore inconnue. L'analyse structurale montre que ces gènes codent une protéine à sept domaines transmembranaires. La protéine recombinante humaine produite chez *E. coli* lie la progestérone avec une haute affinité ($K_d=20-30$ nM) et de manière saturable. Ces récepteurs ne possèdent aucune homologie avec les récepteurs nucléaires des stéroïdes (Zhu et coll., 2003a).

1.2. Les autres stéroïdes

La progestérone est le principal stimulus de la maturation utilisé *in vitro* mais son rôle physiologique n'est toujours pas démontré *in vivo*. La testostérone et la déoxycorticostérone constitueraient de meilleurs inducteurs *in vitro* de la GVBD (Blondeau et Baulieu, 1984). Les quantités de testostérone produites par les cellules folliculaires sont plus importantes que celles de progestérone (Fortune et coll., 1975). Les androstérones induisent la maturation des ovocytes à des concentrations identiques à celle de la progestérone pour l'androstènedione, voire plus faibles pour la testostérone (Lutz et coll., 2001). Après traitement des femelles par injection de gonadotropines, les concentrations sérique et ovarienne en testostérone et en androstènedione sont 10 fois supérieures à celles en progestérone. L'ovocyte métabolise la progestérone en androstènedione lorsqu'elle est appliquée ou microinjectée *in vitro* (Lutz et coll., 2001). Dans l'ovocyte, un récepteur nucléaire aux androgènes a été cloné (xAR). Cependant, la flutamide, inhibiteur spécifique de ce récepteur, n'empêche pas la maturation, même si elle augmente la valeur d'IC₅₀ de la testostérone et de l'androstènedione. De plus, le ketoconazole, inhibiteur de Cyp17, protéine responsable de la transformation de la progestérone en androstènedione, ne bloque pas la maturation induite par la progestérone (Lutz et coll., 2001). Le mécanisme d'action des hormones stéroïdes sur les ovocytes d'amphibiens reste donc controversé.

2. Les facteurs de croissance

2.1. L'insuline et l'IGF1

En plus des stéroïdes, certains facteurs de croissance, tels que l'insuline et l'IGF1, stimulent la reprise méiotique des ovocytes *in vitro*, même si leurs effets s'exercent selon une cinétique plus lente en comparaison avec ceux de la progestérone (El-Etr et coll., 1979; Maller et Koontz, 1981). Dans ces conditions, la reprise de la méiose est déclenchée par l'activation d'un récepteur membranaire à l'IGF1 qui reconnaît IGF1 et l'insuline (Hainaut et coll., 1991; Janicot et coll., 1991; Zhu et coll., 1998). Ce

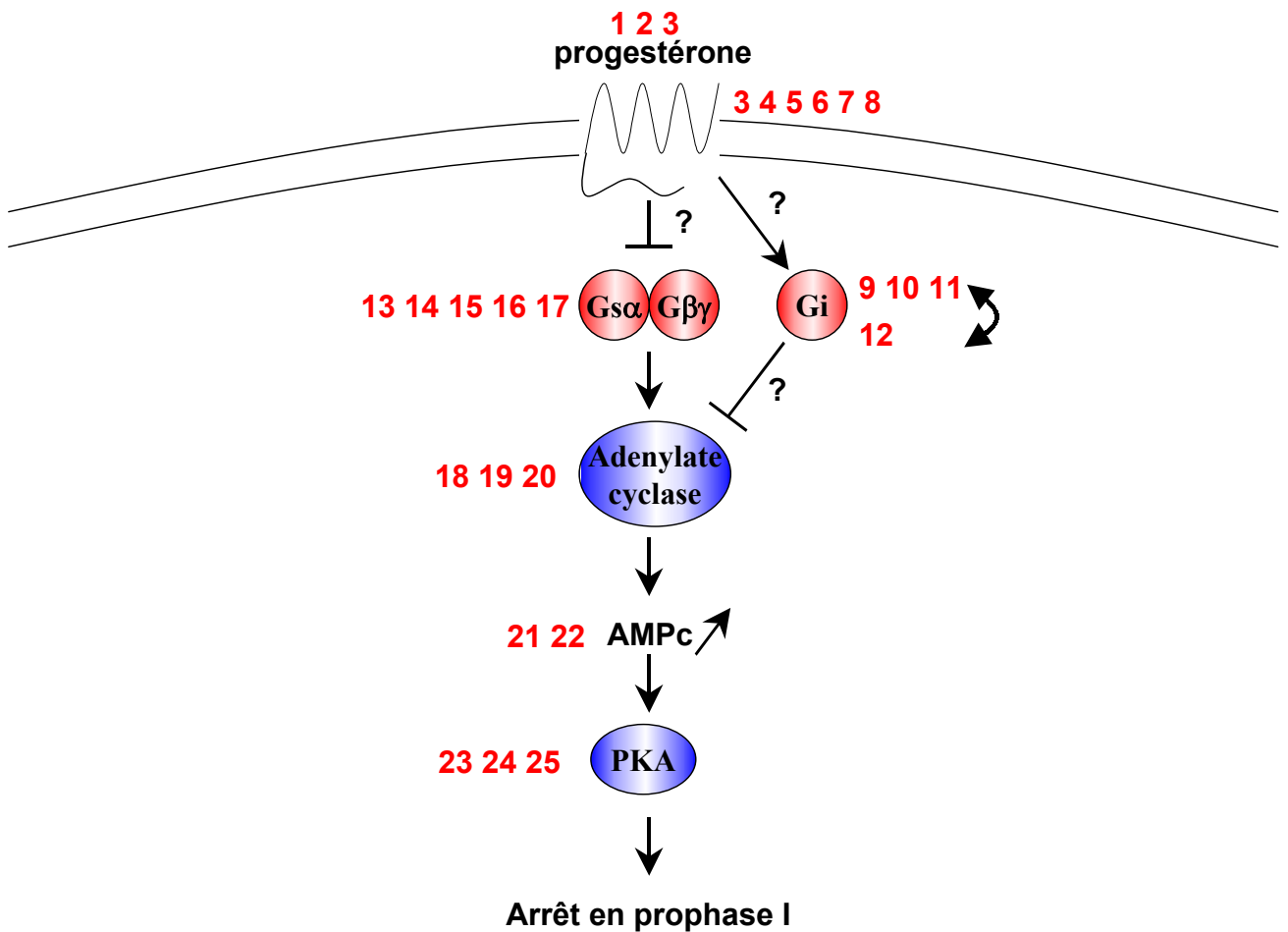
récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) est le seul fonctionnel dans l'ovocyte de xénope.

Contrairement à la progestérone, la reprise méiotique déclenchée par l'insuline est dépendante de l'activité de la petite protéine G monomérique p21^{Ras} (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). L'injection d'une forme oncogénique constitutivement active de p21^{Ras} stimule la reprise de la méiose en absence d'autre stimulation hormonale (Birchmeier et coll., 1985).

2.2. Autres facteurs de croissance

La stimulation de la méiose par d'autres facteurs de croissance nécessite l'expression préalable des ARNm de leurs récepteurs spécifiques. C'est ainsi que la maturation peut être stimulée par le Fibroblast growth factor (Browaeys-Poly et coll., 2000), l'Epidermal growth factor humain (Opresko et Wiley, 1990) ou encore par le Nerve growth factor humain (Nebreda et coll., 1991). La reprise méiotique peut aussi être déclenchée par l'expression de Tpr-met, récepteur constitutivement actif du « Hepatocyte growth factor / Scattor factor » (Daar et coll., 1991).

Même si ces récepteurs ne sont pas endogènes, leurs voies de signalisation sont fonctionnelles dans l'ovocyte de xénope. Ce dernier constitue donc un bon modèle d'étude de leurs mécanismes de transduction (Browaeys-Poly et coll., 2001).



- | | |
|---|--|
| 1 Schuetz, 1967 | 14 Lutz et coll., 2000 |
| 2 Brachet et coll., 1970 | 15 Sherg et coll., 2001 |
| 3 Jacobelli, 1974 | 16 Guzman et coll., 2004 |
| 4 Drury et Schorderet-Slatkine, 1975 | 17 Sheng et coll., 2004 |
| 5 Baulieu et coll., 1978 | 18 Sadler et Maller, 1981 |
| 6 Godeau et coll., 1978 | 19 Finidori-Lepicard et coll., 1981 |
| 7 Maller, 2001 | 20 O'Connor et Smith, 1985 |
| 8 Zhu et coll., 2003b | 21 Speaker et Butcher, 1977 |
| 9 Goodhardt et coll., 1984 | 22 Schorderet-Slatkine et coll., 1978 |
| 10 Olate et coll., 1984 | 23 Maller et Krebs, 1977 |
| 11 Sadler et coll., 1984 | 24 Schmitt et nebreda, 2002 |
| 12 Pellaz et Schorderet-Slatkine, 1989 | 25 Wang et Liu, 2004 |
| 13 Gallo et coll., 1995 | |

Figure 10 : Etapes précoces de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone : AMPc et PKA

Signale que les références indiquées montrent des résultats contradictoires

Chapitre III : Evénements biochimiques précoces de la reprise méiotique

Les hormones stéroïdes et les facteurs de croissance provoquent la reprise de la méiose en activant le MPF (maturation promoting factor) et les MAP kinases (Mitogen activated protein kinases). Avant de décrire ces effecteurs majeurs de la progression méiotique, nous présenterons les événements précoces qui entraînent leur activation par la mise en jeu de voies de signalisation Ras-indépendante (progestérone) ou Ras-dépendante (facteurs de croissance).

I Stimulation par la progestérone

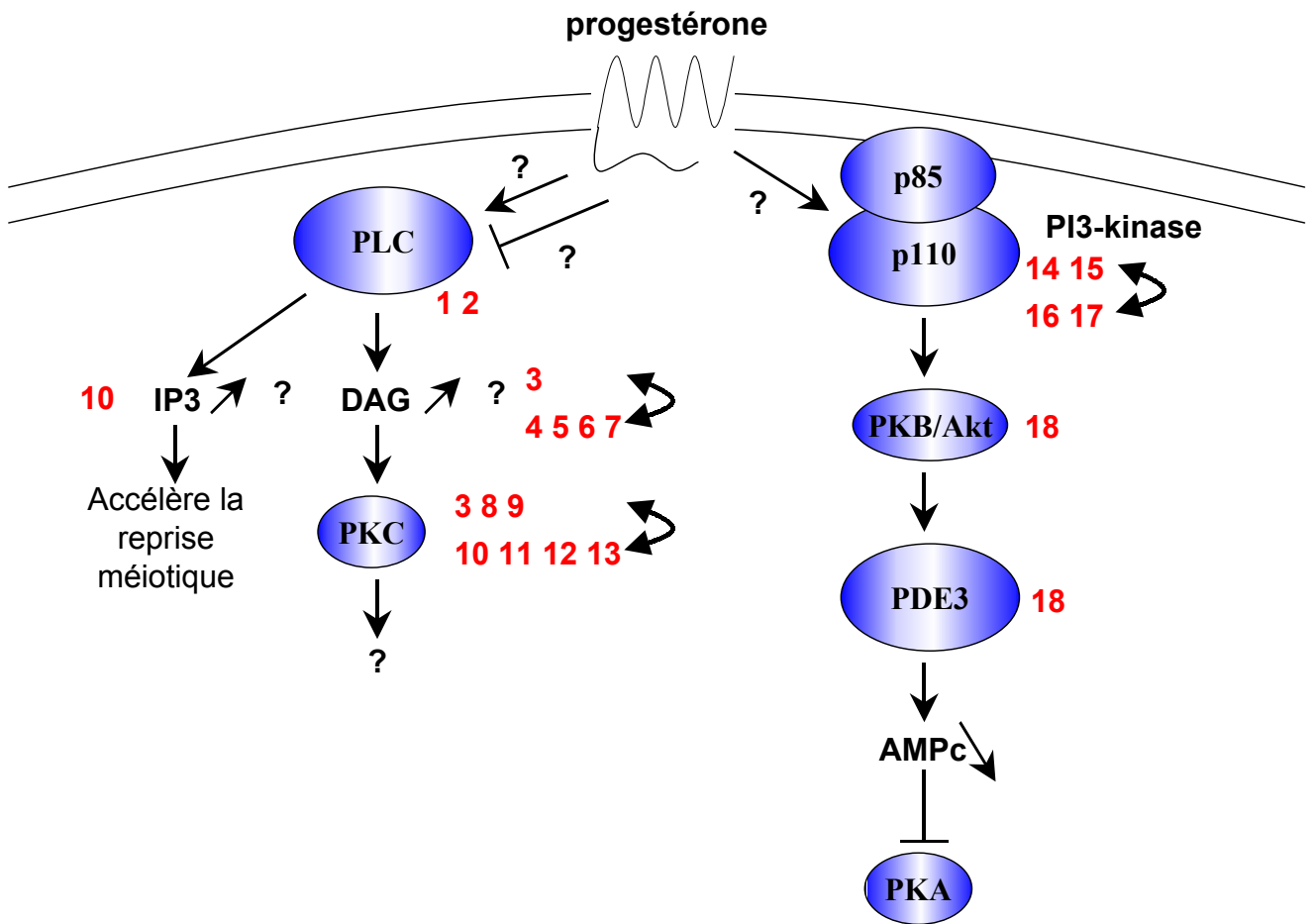
1. Diminution de l'AMP cyclique et inhibition de la Protéine Kinase A (Fig. 10)

L'incubation des ovocytes en progestérone est immédiatement suivie par une diminution de 20 à 80 % du taux intracellulaire d'AMP cyclique (AMPc : Speaker et Butcher, 1977; Bravo et coll., 1978; Schorderet-Slatkine et coll., 1978; Maller et coll., 1979; Cicirelli et Smith, 1985). La synthèse de l'AMPc est catalysée par une enzyme membranaire, l'adénylate cyclase, qui est sous le contrôle de protéines G, complexes hétérotrimériques ($\alpha\beta\gamma$) activés par leur liaison au GTP. Dans les cellules somatiques, ces protéines G inhibent l'adénylate cyclase (protéines G_i : Katada et coll., 1986) ou l'activent (protéines G_s : Northup et coll., 1983). La dégradation de l'AMPc est due à l'activité de phosphodiésterases.

Lors de la reprise méiotique, l'inhibition de l'adénylate cyclase membranaire est responsable de la diminution du taux d'AMPc dans les ovocytes de xénope (Finidori-Lepicard et coll., 1981; Sadler et Maller, 1981). Au contraire, les effets de la progestérone sur la phosphodiésterase restent peu connus (Maller et Krebs, 1980;

Ferrell, 1999). La chute du taux d'AMPc joue un rôle important dans la maturation induite par la progestérone : des activateurs de l'adénylate cyclase tels que la méthylxanthine (O'Connor et Smith, 1976) ou des inhibiteurs de phosphodiesterase comme la théophylline ou la papavérine (O'Connor et Smith, 1976; Bravo et coll., 1978) bloquent la maturation. L'utilisation de la toxine pertussique, qui inhibe l'activité de la protéine Gi, a donné des résultats contradictoires. Des premiers travaux n'ont pas révélé d'effet de la toxine pertussique sur la GVBD (Goodhardt et coll., 1984; Olate et coll., 1984). Au contraire, l'injection du protomère A de la toxine pertussique avant que le MPF ne soit actif inhibe la maturation (Pellaz et Schorderet-Slatkine, 1989). Les sous-unités G α et G $\beta\gamma$ joueraient un rôle crucial dans le maintien de l'arrêt en prophase des ovocytes. L'injection d'un anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminale de la sous-unité α de la protéine Gs entraîne la reprise de la méiose en absence de stimulation hormonale (Gallo et coll., 1995). La surexpression de la sous-unité G β 1 seule ou associée à la sous-unité G γ 2 bloque la maturation stimulée par la progestérone (Lutz et coll., 2000; Sheng et coll., 2001). Au contraire, l'injection d'ARNm codant la sous-unité α de la transducine bovine (Gt α), qui piège les sous-unités G $\beta\gamma$, permet de déclencher la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale (Sheng et coll., 2001). Une adénylate cyclase proche de AC7 humaine a été clonée dans les ovocytes de stade VI et nommée xAC7 par deux équipes indépendantes (Guzman et coll., 2004; Sheng et coll., 2004). Les sous-unités G α et G $\beta\gamma$ coopéreraient pour activer cette adénylate cyclase (Guzman et coll., 2004; Sheng et coll., 2004).

Le taux d'AMPc contrôle l'activité de la protéine kinase A (PKA) : une diminution du taux d'AMPc entraîne une chute de l'activité de la kinase. Très récemment, il a été démontré que la progestérone entraîne une diminution de l'activité de la PKA dans les ovocytes de xénope (Wang et Liu, 2004). La microinjection d'inhibiteurs de la PKA déclenche la maturation sans stimulation hormonale (Maller et Krebs, 1977). Les premiers travaux ont montré que l'injection d'une sous-unité catalytique constitutivement active de PKA empêche la maturation alors que l'injection de la sous-unité régulatrice déclenche la reprise méiotique en absence de stimulation



1 Carnero et Lacal, 1993
 2 Garcia de Herreros et coll., 1999
 3 Varnold et Smith, 1990
 4 Wasserman et coll., 1990
 5 Han et coll., 1992
 6 Stith et coll., 1992
 7 Wasserman, 1992
 8 Laurent et coll., 1988
 9 Stith et coll., 1992

10 Stith et Maller, 1987
 11 Pan et Cooper, 1987
 12 Berra et coll., 1993
 13 Carnero et coll., 1995
 14 Liu et coll., 1995
 15 Lopez-Hernandez et Santos, 1999
 16 Muslin et coll., 1993
 17 Hehl et coll., 2001
 18 Andersen et coll., 1998

Figure 11 : Etapes précoces de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone : Métabolisme des phosphoinositides et PI3-K

↻ Signale que les références indiquées montrent des résultats contradictoires

hormonale (Maller et Krebs, 1977). Cependant, l'injection d'une sous-unité catalytique inactive de PKA inhibe également la maturation ce qui suggère que la PKA n'exercerait pas son activité inhibitrice de la maturation via la phosphorylation de protéines cibles, mais par une activité de séquestration (Schmitt et Nebreda, 2002). En conclusion, un taux élevé d'AMPc et l'activité de la PKA maintiennent l'arrêt en prophase I des ovocytes de xénope.

2. Le métabolisme des phosphoinositides et l'activation de la Protéine Kinase C (Fig. 11)

Dans les cellules somatiques, les récepteurs couplés aux protéines G agissent également sur le métabolisme des phosphoinositides. Les protéines Gq activent la phospholipase C- β qui clive le phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ conduit à la libération des stocks intracellulaires de calcium en se liant à un récepteur spécifique sur la membrane du réticulum endoplasmique. Le DAG a pour principal rôle d'activer la Protéine Kinase C. La présence d'une PKC activable par un analogue du DAG, le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), a été observée dans les ovocytes de xénope dès 1988 (Laurent et coll., 1988). Les ovocytes immatures contiennent les isoformes PKC α , β , γ et ζ mais ne contiennent pas les formes δ et ϵ (Dominguez et coll., 1992).

La sous-unité α des protéines Gq ne semble pas nécessaire à la maturation induite par la progestérone même si son injection provoque la GVBD dans des proportions allant de 0 à 100% suivant les lots d'ovocytes (Guttridge et coll., 1995). La microinjection des phospholipases A₂, C et D stimule la reprise méiotique des ovocytes de xénope (Carnero et Lacal, 1993). L'effet est relayé par les seconds messagers générés par ces enzymes : l'acide arachidonique, le DAG et les acides phosphatidiques. La stimulation de la GVBD par injection de PLC est dépendante de l'activité de la PKC (Carnero et Lacal, 1993). Un anticorps dirigé contre la PLC bloque la maturation déclenchée par l'insuline ou par p21^{Ras} mais n'influence pas la progestérone (Garcia de Herreros et coll., 1991). D'autres études démontrent que l'injection de p21^{Ras} déclenche la GVBD indépendamment de la phospholipase C et

de la PKC (Carnero et coll., 1994) ; seule la PLD semble impliquée. La progestérone active donc la maturation par une voie indépendante de $p21^{\text{Ras}}$ (Birchmeier et coll., 1985; Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987) et de la phospholipase C (Stith et coll., 1992b).

Le métabolisme des phosphoinositides au cours de la maturation est un sujet d'étude controversé. Certains auteurs montrent que la quantité de DAG ovocytaire diminue au cours des cinq premières minutes qui suivent la stimulation par la progestérone (Varnold et Smith, 1990). L'activité de PKC est plus faible dans des extraits d'ovocytes en métaphase II que dans des extraits d'ovocytes en prophase I (Laurent et coll., 1988). La sphingosine ou la staurosporine, inhibiteurs de PKC, induisent la reprise méiotique alors que la microinjection de PKC retarde, voire inhibe, la GVBD stimulée par la progestérone (Varnold et Smith, 1990). D'autres études mettent en évidence une augmentation des niveaux d'IP3 et de DAG pendant la maturation (Wasserman et coll., 1990; Han et coll., 1992; Stith et coll., 1992b). La diminution observée du taux de DAG (Varnold et Smith, 1990) serait un artefact en réponse à l'éthanol dans lequel la progestérone est solubilisée (Wasserman, 1992). L'injection de l'oncoprotéine H-Ras entraîne une stimulation rapide de la production de DAG (Lacal et coll., 1987). La microinjection de PKC β ou d'esters de phorbol induit la reprise méiotique des ovocytes. Le CGP 41251, un analogue de la staurosporine, bloque complètement la maturation stimulée par injection de $p21^{\text{Ras}}$ (Chung et coll., 1992). L'injection d'un analogue du DAG, le TPA induit également la méiose (Stith et Maller, 1987; Pan et Cooper, 1990). PKC ζ est requise lorsque la GVBD est induite, soit par l'insuline, soit par les injections de $p21^{\text{Ras}}$ ou de PLC (Dominguez et coll., 1992). L'injection de PKC ζ déclenche la reprise méiotique des ovocytes et l'activation des voies MPF et MAP kinase de manière dépendante de la synthèse protéique (Berra et coll., 1993; Carnero et coll., 1995). Les domaines C1b des protéines PKC sont responsables de la liaison des esters de phorbol et du DAG. L'injection du domaine C1b de PKC δ induit la GVBD. Ce domaine potentialise la stimulation par l'insuline et non par la progestérone. Il agit en synergie avec $p21^{\text{Ras}}$ (Aroca et coll., 2000). Au contraire, le domaine C1b de PKC γ inhibe la

maturation après stimulation par l'insuline mais pas par la progestérone (Pawelczyk et coll., 1998). Enfin, la microinjection d'IP3 accélère la maturation qu'elle soit induite par l'insuline ou par la progestérone (Stith et Maller, 1987). La néomycine, qui lie spécifiquement les phosphoinositides et inhibe leur métabolisme, bloque la reprise méiotique induite par l'insuline ou par injection de p21^{Ras} mais pas par la progestérone ou par le TPA (Pan et Cooper, 1990).

L'injection de la phospholipase C augmente la production de DAG et inhibe la méiose stimulée par l'insuline ou par la progestérone. Cependant, injectée 1,6 heure après la progestérone, l'enzyme en accélère les effets. La microinjection d'un peptide inhibiteur de PKC a peu d'effets sur l'action de la progestérone mais accélère la reprise méiotique en présence d'insuline. La GVBD est inhibée quand ce même peptide est injecté deux heures après la stimulation par l'insuline. De même, la staurosporine stimule l'action de la progestérone et de l'insuline mais, ajoutée deux heures après l'ajout de l'insuline, elle inhibe son action. La PKC aurait donc d'abord un effet inhibiteur sur la division méiotique, puis aurait une action synergique, en particulier sur la voie de l'insuline (Stith et coll., 1992a).

Les PI3-kinases sont une famille d'enzymes qui catalysent la phosphorylation des phosphoinositides en position D3 de l'inositol. *In vivo*, leur produit majeur est le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). En plus de leur activité lipide kinase, les quatre types de PI3-kinase (α , β , γ et δ) possèdent une activité protéine kinase au moins *in vitro* (Bondeva et coll., 1998; Roche et coll., 1998; Vanhaesebroeck et coll., 1999; Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999). Des inhibiteurs de PI3-kinase comme la wortmannine ou le LY294002 bloquent la reprise méiotique stimulée exclusivement par l'insuline (Liu et coll., 1995a; Lopez-Hernandez et Santos, 1999). D'autres travaux montrent des résultats inverses : la wortmannine déclenche la GVBD en absence de stimulation hormonale en activant les voies MPF et MAP kinase. Cet effet serait indépendant de l'action de la wortmannine sur la PI3-kinase (Carnero et Lacal, 1998). L'autre inhibiteur de PI3-kinase, LY294002, retarderait la GVBD par l'insuline mais aussi par la progestérone (Hehl et coll., 2001). L'injection du domaine SH2 de la sous-unité de 85 kDa de la PI3-K inhibe l'activation de l'enzyme endogène

et bloque la maturation lors d'une stimulation par la progestérone (Muslin et coll., 1993a). L'expression de PI3-Ky provoque la GVBD ainsi que la phosphorylation de MAP kinase et de PKB/Akt. Cette action est dépendante de son activité lipide kinase (Hehl et coll., 2001). L'injection de PKB/Akt est capable, seule, d'entraîner la reprise de la méiose en activant PDE3 (Andersen et coll., 1998).

II Stimulation par l'insuline ou l'IGF1

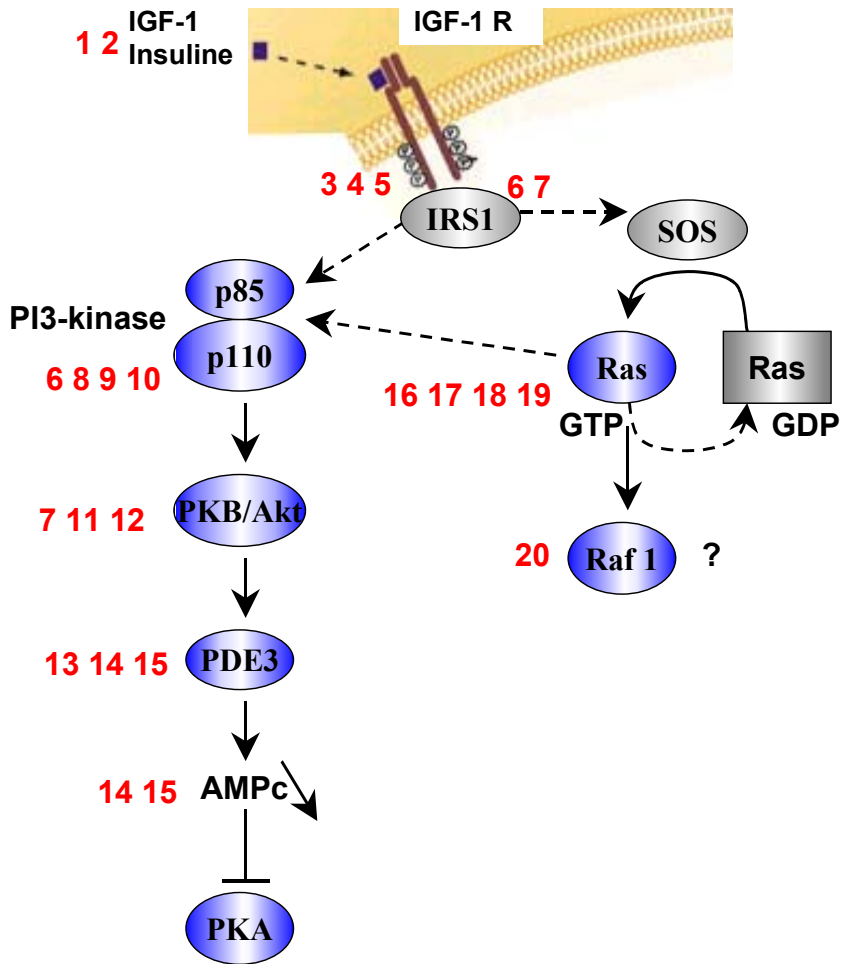
1. Rappel des voies de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les cellules somatiques

Les récepteurs à l'insuline et à l'IGF1 sont deux récepteurs qui présentent de fortes homologies. Ils sont groupés dans une même classe au sein de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (Ullrich et Schlessinger, 1990). Dans sa conformation native, le récepteur à l'insuline est constitué par l'assemblage covalent de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β intramembranaires et intracellulaires pour former un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ (Cheatham et Kahn, 1995). La liaison de l'insuline aux sous-unités α déclenche rapidement une cascade d'autophosphorylations sur des résidus tyrosine au sein des sous-unités β (Tornqvist et coll., 1987; White et coll., 1988). L'activité kinase du récepteur est capitale : des mutations du domaine de liaison de l'ATP qui entraînent une perte de l'activité tyrosine kinase, rendent le récepteur biologiquement inactif (Chou et coll., 1987; Ebina et coll., 1987; McClain et coll., 1987; Stumpo et Blackshear, 1991). Contrairement aux autres récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs à l'insuline et à l'IGF1 ne lient pas directement les protéines portant des domaines SH2 (Src homology 2). Des protéines intermédiaires, dites d'ancrage, relient le récepteur et les protéines en aval (Yenush et White, 1997). La principale protéine qui interagit avec le récepteur à l'insuline ou à l'IGF1 est le substrat de réponse à l'insuline 1 ou IRS1. Il s'agit d'une molécule d'environ 185 kDa, phosphorylée sur des résidus tyrosine par le récepteur à l'insuline (Shoelson et coll., 1992; Sun et coll., 1993), ou par le récepteur à l'IGF1 (Myers et coll., 1993). Dans le modèle de cellules

isolées, la phosphorylation d'IRS1 est nécessaire au relais des effets métaboliques et de croissance de l'insuline. En effet, ses sites de phosphorylation constituent des sites de liaison aux domaines SH2 portés par les protéines situées en aval. Ces dernières possèdent également des domaines SH3 qui les relient à leurs propres effecteurs (pour revue, Cheatham et Kahn, 1995).

IRS1 relaie la signalisation des récepteurs à l'insuline et à l'IGF1 à l'activation de la PI3-kinase. Cette enzyme est constituée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et d'une sous-unité à activité kinase de 110 kDa (p110). p85 possède deux domaines SH2 et un domaine SH3 et se lie aux résidus de tyrosine phosphorylés de IRS1 via ses domaines SH2. Cette liaison est nécessaire à l'activation de p110 par p85.

L'insuline ou IGF1 stimulent également l'oncoprotéine p21^{Ras} qui active la MEK kinase Raf et, en conséquence, la voie MAP kinase MEK-ERK (Kolch, 2000). p21^{Ras} appartient à une superfamille de petites protéines monomériques liant le GTP et possédant une activité GTPasique (Barbacid, 1987; Cantley et coll., 1991). p21^{Ras} nouvellement synthétisée est cytosolique. Sa liaison au GTP et son ancrage à la membrane la rendent active (Scolnick et coll., 1979; Shih et coll., 1980; Willumsen et coll., 1984; Hancock et coll., 1989). Son association à la membrane dépend de trois modifications post-traductionnelles : prénylation d'un résidu cystéine conservé en position 186, clivage protéolytique des 3 derniers résidus (187 à 189) de la protéine et carboxyl méthylation de l'extrémité C-terminale nouvellement formée (Gutierrez et coll., 1989). La prénylation de Ras est catalysée par une farnésyl-transférase qui lie un groupement farnésyl à la cystéine 186 par l'intermédiaire d'une liaison thio-ether (Casey et coll., 1989; Lowe et coll., 1990; Manne et coll., 1990; Schaber et coll., 1990). Certaines protéines Ras (Ha-Ras, N-Ras, Ras 2) sont en outre « lipidées » par palmitoylation sur un ou deux résidus cystéine proches de l'extrémité C-terminale farnésylée (Bhattacharya et coll., 1995; Hancock, 1995). Dans le cas d'une stimulation par l'insuline ou par l'IGF1, l'activation de la voie de signalisation de p21^{Ras} est relayée par Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) qui se lie à IRS1 via ses domaines SH2. Les domaines SH3 de Grb2 lui permettent ensuite



- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1 El-Etr et coll., 1979 | 11 Hehl et coll. 2001 |
| 2 Maller et Koontz, 1981 | 12 Andersen et coll., 2003 |
| 3 Hainaut et coll., 1991 | 13 Andersen et coll., 1998 |
| 4 Janicot et coll., 1991 | 14 Sadler et Maller, 1987 |
| 5 Zhu et coll., 1998 | 15 Sadler et Maller, 1989 |
| 6 Liu et coll., 1995 | 16 Deshpande et Kung, 1987 |
| 7 Chuang et coll., 1993 | 17 Korn et coll., 1987 |
| 8 Lopez-Hernandez et Santos, 1999 | 18 Davis et Sadler, 1992 |
| 9 Yamamoto-Honda et coll., 1996 | 19 Chuang et coll., 1994 |
| 10 Deuter-Reinhard et coll., 1997 | 20 Fabian et coll., 1993 |

Figure 12 : Voie de signalisation déclenchée dans les ovocytes de xénope par l'insuline/IGF1

d'activer la protéine SOS (Son of sevenless) dont l'activité catalytique permet l'échange sur p21^{Ras} d'un GDP contre un GTP. Une voie parallèle permet au récepteur de s'affranchir d'IRS1 : le récepteur à l'insuline phosphoryle directement la protéine Shc (Src homology 2 domain containing transforming protein) sur des résidus tyrosine permettant la liaison de Grb2 qui se lie elle-même à SOS pour former un complexe Shc-Grb2-SOS menant à l'activation de p21^{Ras} (Kovacina et Roth, 1993; Pronk et coll., 1993; Skolnik et coll., 1993a; Skolnik et coll., 1993b).

2. La voie de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les ovocytes de xénope (Fig. 12)

La micro-injection d'anticorps anti-phosphotyrosine ou de tyrosine phosphatase dans l'ovocyte de xénope bloque la maturation déclenchée par l'insuline ou l'IGF1 et suggère un rôle nécessaire de la phosphorylation de résidus tyrosine (Cicirelli et coll., 1990; Hainaut et coll., 1991). Le récepteur IGFR1 a été cloné et il est identique à 76% au récepteur humain de l'IGF1 et à 57% au récepteur humain de l'insuline. Cette identité est maximale dans le domaine tyrosine kinase (Zhu et coll., 1998). IRS1 relaie les effets de l'insuline et de IGF1 dans l'ovocyte de xénope (Chuang et coll., 1993a; Chuang et coll., 1993b). Elle a été clonée et présente 67% d'identité et 77% d'homologie avec IRS1 de rat (Liu et coll., 1995a).

Dans l'ovocyte de xénope, comme dans les cellules somatiques, deux voies prépondérantes sont mises en action par l'insuline/IGF1. La phosphorylation sur tyrosine de XIRS1 provoque sa liaison avec la PI3-kinase et l'activation de cette dernière (Chuang et coll., 1993a; Liu et coll., 1995a), activation nécessaire à la GVBD (Liu et coll., 1995a; Yamamoto-Honda et coll., 1996; Deuter-Reinhard et coll., 1997; Lopez-Hernandez et Santos, 1999). La stimulation des ovocytes par l'insuline/IGF1 ou par injection de PI3-Kinase active la PKB/Akt (Lopez-Hernandez et Santos, 1999; Hehl et coll., 2001). En présence d'insuline, l'activation de PKB/Akt est forte et rapide, alors qu'en présence de progestérone, l'activation est beaucoup plus modeste et plus lente (Andersen et coll., 2003). L'expression d'une forme constitutivement active de PKB/Akt est suffisante pour induire la reprise de méiose

des ovocytes (Andersen et coll., 1998). Si l'activation de PKB/Akt est indispensable à la GVBD induite par l'insuline, elle n'est pas requise dans le cas des ovocytes stimulés par la progestérone. En effet, un dominant négatif de PKB/Akt ou l'injection d'un anticorps anti-Akt bloque complètement la reprise méiotique par l'insuline mais partiellement (à environ 30%) la GVBD induite par la progestérone (Andersen et coll., 2003). L'action de PKB/Akt serait relayée par l'activation de la phosphodiesterase 3 (PDE3) qui conduit à la diminution du taux intracellulaire d'AMPc et à l'inhibition de la PKA (Andersen et coll., 2003). L'insuline et IGF1 diminuent la production d'AMPc en stimulant l'activité de la PDE et en inhibant l'activité de l'AC (Sadler et Maller, 1987). Les inhibiteurs de PDE, IBMX, théophylline et papavérine bloquent la maturation stimulée par l'insuline ou IGF1 à des concentrations 17 à 60 fois inférieures à celles nécessaires pour obtenir le même résultat en progestérone (Sadler et Maller, 1989). De même, l'injection d'une forme constitutivement active de Ras stimule la PDE. Cet effet peut être empêché par l'utilisation d'IBMX (Sadler et Maller, 1989).

La voie de signalisation activée par l'insuline/IGF1 conduit nécessairement à l'activation de $p21^{\text{Ras}}$ pour déclencher la GVBD. La micro-injection d'une forme dominant négatif de $p21^{\text{Ras}}$ bloque la GVBD (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). La micro-injection du domaine SH2 de Grb2 réduit la GVBD de 60% sans avoir d'effets sur l'activité de la PI3-Kinase (Chuang et coll., 1994). Dans les ovocytes, l'insuline/IGF1 stimule l'association de $p21^{\text{Ras}}$ endogène à la membrane (Davis et Sadler, 1992). Contrairement à la progestérone et de manière surprenante, l'insuline/IGF1 induit une diminution significative de l'activité farnésyl transférase (Goalstone et Sadler, 2000). Cependant, des inhibiteurs de farnésyl transférase ralentissent sans pour autant bloquer la maturation déclenchée par l'IGF1 (Goalstone et Sadler, 2000). La palmitoylation expliquerait ces résultats contradictoires : un mutant Ha-Ras farnésylé et méthylé, mais non palmitoylé, est incapable de translocation membranaire et ne peut induire la GVBD (Dudler et Gelb, 1996). Enfin, l'injection d'une forme oncogénique de Ras active le MPF et la voie MAP kinase en absence de synthèse de la MAPKK kinase $p39^{\text{Mos}}$ et provoque la

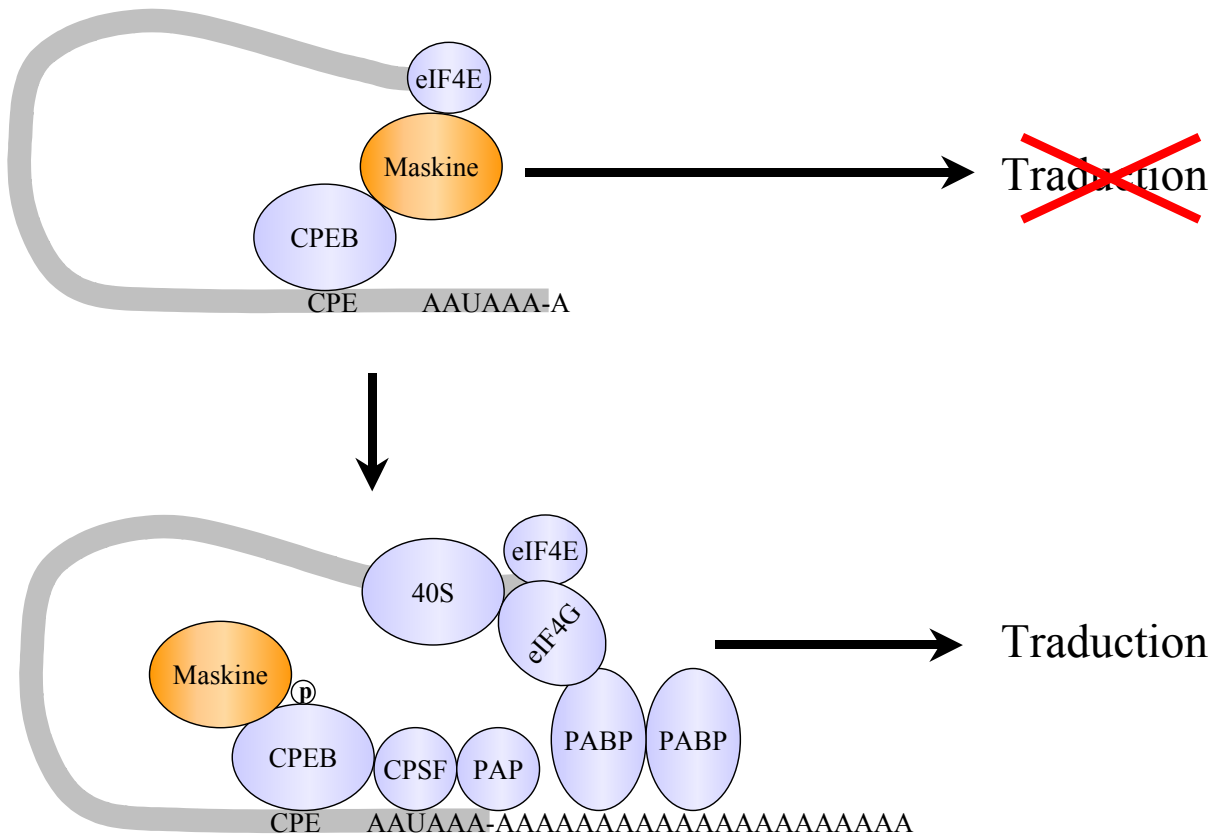


Figure 13 : Polyadénylation des ARNm et synthèse protéique

CPEB : Cytoplasmic polyadenylation element binding protein ; CPSF : Cleavage and polyadenylation specific factor ; eIF : Elongation initiation factor ; PABP : Poly A binding protein ; PAP : Poly A polymerase

GVBD, (Dupre et coll., 2002b). L'activation de la voie MAP kinase et la reprise méiotique déclenchées par injection d'une forme oncogénique de Ras ou d'un récepteur constitutivement actif du HGF-SF (Tpr-Met) sont bloquées par l'injection d'un dominant négatif de Raf (Fabian et coll., 1993b).

III Transcription et synthèse protéique au cours de la méiose

La transcription de nouveaux ARNm n'est pas nécessaire à la maturation : la reprise méiotique déclenchée par la progestérone n'est pas inhibée dans les ovocytes énucléés ou dans les ovocytes traités par un inhibiteur de la transcription : l'actinomycine D (Schorderet-Slatkine et Drury, 1973; Reynhout et Smith, 1974). Les voies stimulées par la progestérone et l'insuline requièrent la traduction d'ARNm maternels. La cycloheximide, inhibiteur de synthèse protéique, bloque la maturation, qu'elle soit déclenchée par la progestérone (Wasserman et Masui, 1975) ou par l'insuline/IGF1 (El-Etr et coll., 1979). Les protéines Ringo/Speedy, p39^{Mos}, certaines cyclines, XCDh1, Wee1, Cdk2, XKid sont les principales protéines synthétisées impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

La polyadénylation est l'un des mécanismes de contrôle de la synthèse protéique (Mendez et Richter, 2001; Richter, 2001). Les ARNm polyadénylés sont traduits tandis que les ARNm déadénylés se dissocient des ribosomes et ne sont pas traduits (Fig. 13 ;(Paris et Philippe, 1990). Des oligonucléotides antisens dirigés contre les séquences de polyadénylation inhibent la maturation induite par la progestérone (Sheets et coll., 1995). L'addition d'une queue poly-A prosthétique est suffisante pour déclencher la traduction d'un ARNm (Barkoff et coll., 1998). La région non traduite 3' (UTR 3') des ARNm contient une séquence riche en uracile : le CPE (Cytoplasmic polyadenylation element). La présence de cette séquence est responsable de la polyadénylation des ARNm (Richter, 1999). Elle est reconnue par la protéine CPEB (CPE-binding protein : Paris et coll., 1991; Hake et Richter, 1994). CPEB est associée à la maskine, protéine inhibant l'association entre les facteurs eIF4E et eIF4G à l'extrémité 5' de l'ARNm. L'association entre ces deux facteurs est nécessaire pour l'initiation de la traduction (Stebbins-Boaz et coll., 1999). Si elle est

phosphorylée, CPEB s'associe à la protéine CPSF (Cleavage and polyadenylation specificity factor) afin de permettre sa liaison avec la séquence AAUAAA de l'UTR3'. Cette liaison est également nécessaire à la polyadénylation (Dickson et coll., 1999; Mendez et coll., 2000b). CPSF permet la liaison de la poly(A) polymérase à l'extrémité 3' de l'ARNm qui catalyse l'ajout de résidus adénylyl. Enfin, des protéines de liaison aux séquences polyA, les PABP (PolyA Binding proteins) permettent l'association du facteur eIF4G avec eIF4E à la place de la Maskine à l'extrémité 5' de l'ARNm ce qui entraînerait l'initiation de la traduction (Fig. 13 ; revue, Mendez et Richter, 2001).

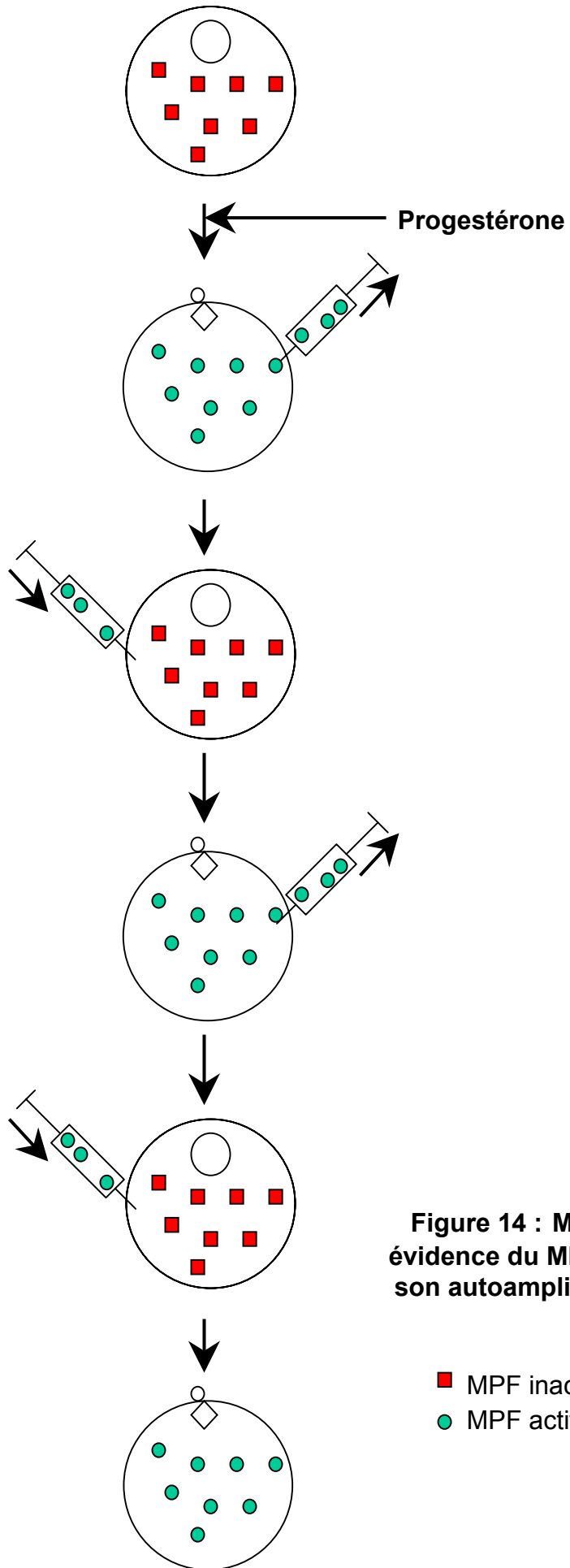
La liaison de CPEB à CPSF nécessite la phosphorylation du résidu Ser 174 de CPEB. Cette phosphorylation est catalysée par la kinase Aurora A/Eg2 (Mendez et coll., 2000a; Mendez et coll., 2000b). La glycogène-synthase kinase 3 (Gsk3) contrôle directement l'activité d'Aurora A, que les ovocytes soient stimulés par la progestérone ou par l'insuline. Dans le cas particulier de l'insuline, l'activation d'Aurora A est contrôlée par la PKC et la PI3 kinase (Sarkissian et coll., 2004). *In vitro*, Gsk3 phosphoryle Aurora A sur le résidu Ser 290/291, ce qui conduit à l'autophosphorylation d'Aurora A sur le résidu Ser 349. Ces deux phosphorylations diminuent la capacité de Aurora A à phosphoryler CPEB (Sarkissian et coll., 2004). Gsk3 exercerait donc un rôle négatif sur la traduction des ARNm. Ces données confirment des résultats montrant que GSK3 β est active dans les ovocytes de xénope arrêtés en prophase I et qu'elle est inactivée dès la reprise méiotique déclenchée par la progestérone (Fisher et coll., 1999b). L'expression d'une forme dominant négatif de GSK3 β ou l'injection d'un anticorps la neutralisant accélèrent la maturation (Fisher et coll., 1999b). L'injection de Aurora A constitutivement active déclenche également la GVBD mais les ovocytes restent en première division de méiose. Les chromosomes sont condensés mais le fuseau est absent. Aurora A est hyperphosphorylée et activée au moment de l'activation du MPF. Elle est ensuite progressivement déphosphorylée et inactivée avant d'être phosphorylée à nouveau (Ma et coll., 2003).

CPEB est présente dans tous les stades (I à VI) d'ovocytes immatures. Elle est hyperphosphorylée au moment de la GVBD et n'est plus détectable une heure après (Thom et coll., 2003). La phosphorylation de la région N-terminale de CPEB est responsable de la dégradation de cette protéine par le protéasome. p34^{Cdc2} serait responsable de ces phosphorylations (Reverte et coll., 2001; Thom et coll., 2003). La dégradation de la CPEB est requise pour la transition méiose I-méiose II ainsi que pour la polyadénylation et la traduction du deuxième groupe d'ARNm polyadénylés auquel appartient l'ARNm de la cycline B1 (Mendez et coll., 2002). Il faut noter que chez la palourde, CPEB est phosphorylée dans un premier temps par MAP kinase et dans un second temps par p34^{Cdc2}, au moment de la GVBD (Katsu et coll., 1999). La polyadénylation des ARNm varie au cours de la maturation : les ARNm codant p39^{Mos} sont polyadénylés dès l'entrée en première division de méiose. Les ARNm codant la cycline B1 sont polyadénylés au cours de la première division de méiose. Dans ce cas, la polyadénylation nécessite la présence de p39^{Mos} et l'activité de p34^{Cdc2} (Ballantyne et coll., 1997; de Moor et Richter, 1997; Mendez et Richter, 2001).

IV Différences entre les voies de transduction de la progestérone et de l'Insuline/IGF1

Les deux voies nécessitent l'intervention d'un récepteur membranaire, vraisemblablement à sept hélices transmembranaires pour la progestérone (Zhu et coll., 2003a; Zhu et coll., 2003b), à activité tyrosine kinase pour l'insuline/IGF1 (Ullrich et Schlessinger, 1990). L'injection d'une protéine tyrosine phosphatase (PTPase) retarde la maturation induite par l'insuline, par la progestérone et par injection de MPF (Cicirelli et coll., 1990; Tonks et coll., 1990). Les PTPases ont donc un deuxième site d'action en aval du MPF. Néanmoins, le retard est moins important et la GVBD₅₀ est moins sensible à la dose de PTPase dans le cas de la progestérone (Tonks et coll., 1990). L'inhibition de p21^{Ras} par un anticorps neutralisant inhibe la reprise méiotique stimulée par l'insuline et non par la progestérone (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). La progestérone

déclenche une diminution du taux intracellulaire d'AMP cyclique résultant de l'inhibition d'une adénylate cyclase (Speaker et Butcher, 1977; Bravo et coll., 1978; Schorderet-Slatkine et coll., 1978; Maller et coll., 1979; Cicirelli et Smith, 1985). L'injection de p21^{Ras} n'est pas accompagnée de modifications décelables du taux d'AMPc (Korn et coll., 1987). L'insuline/IGF1 provoque une diminution du taux intracellulaire d'AMPc en inhibant une phosphodiesterase, probablement par l'intermédiaire la voie PI3-K/Akt (Sadler et Maller, 1987 ; Sadler et Maller, 1989 ; Andersen et coll., 2003). Les effets de l'insuline nécessitent l'activation de la PI3-Kinase (Andersen et coll., 2003).



Chapitre IV : Le MPF et les complexes Cycline/CDK

I Mise en évidence

Les expériences de transfert de cytoplasme d'ovocyte mature de *Rana pipiens* dans des ovocytes immatures receveurs ont démontré l'existence d'un facteur cytoplasmique baptisé MPF (Maturation promoting factor) responsable de l'entrée en méiose (Fig. 14 ; Masui et Markert, 1971). Des expériences de microinjections croisées entre des ovocytes de genres et d'espèces différents (*Rana pipiens*, *Xenopus laevis*, souris, étoile de mer, etc.) ont montré que le MPF n'est pas spécifique de l'espèce ou du phylum (Reynhout et Smith, 1974; Wasserman et Smith, 1978). Il est établi que ce même facteur est responsable de l'entrée en mitose et plus généralement de l'entrée en phase M (Sunkara et coll., 1979; Nelkin et coll., 1980). Il est maintenant appelé M-phase promoting factor.

II Purification et identification

1. p34^{Cdc2}

La purification du MPF a été permise pour la première fois dans les ovocytes de xénope, via la détection de son activité kinasique par chromatographie puis analyse sur gel. Le MPF est constitué de deux sous-unités protéiques de 32 et 45 kDa (Lohka et coll., 1988). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'étude de mutants présentant un défaut thermosensible de la progression du cycle cellulaire (gènes *cdc*) a permis d'identifier la sous-unité catalytique. Des anticorps dirigés contre le produit du gène *cdc2* reconnaissent sur immunoempreinte la sous-unité de 32 kDa du MPF (Gautier et coll., 1988). Des orthologues de ce gène ont été

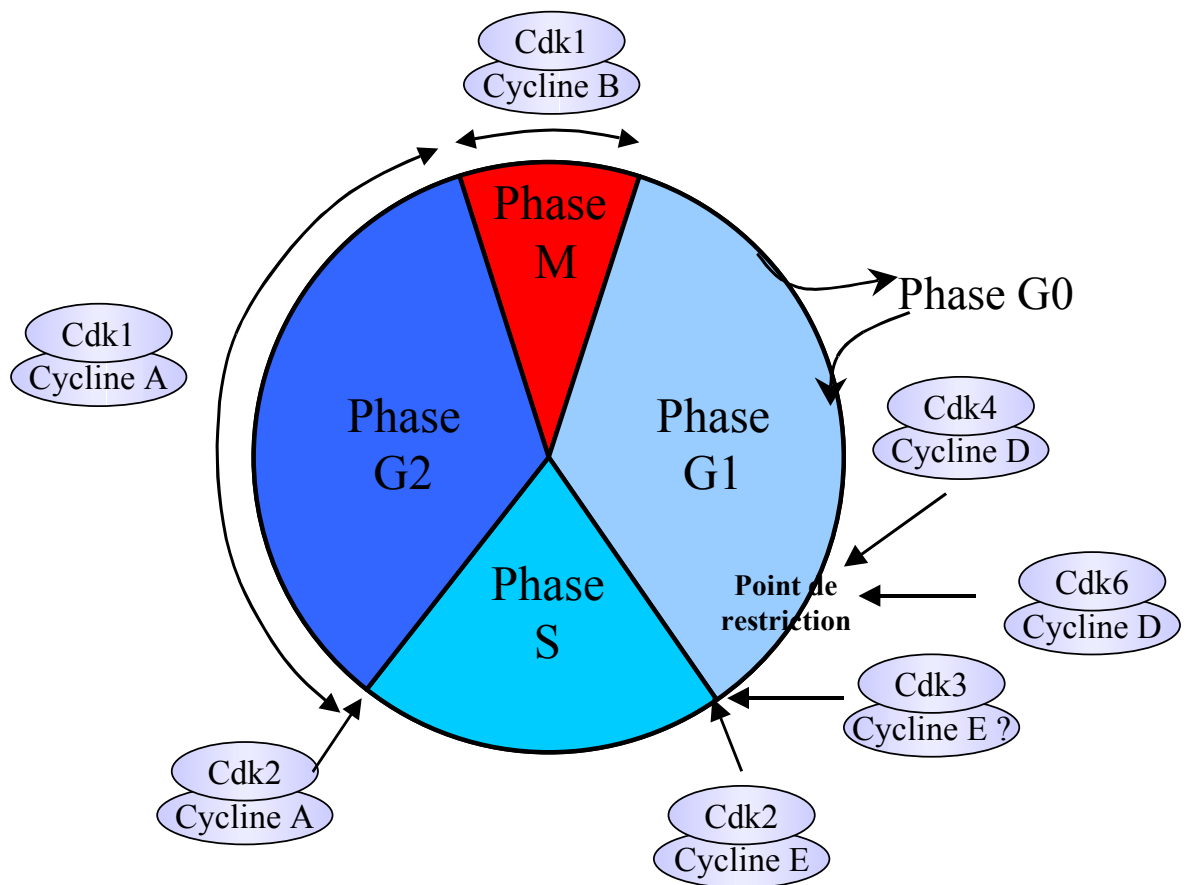


Figure 15 : Complexes Cycline/CDK et régulation du cycle cellulaire

retrouvés dans de nombreuses espèces. Ils codent des protéines très conservées dont la masse varie entre 32 et 34 kDa. Elles contiennent toutes une séquence de 16 acides aminés renfermant un motif « PSTAIR » (acides aminés 45 à 50 chez le xénope). Ces protéines sont des Ser/Thr kinases. p34^{Cdc2} a été clonée chez le xénope (GI 740281 : Milarski et coll., 1991).

2. La cycline B

Les cyclines appartiennent à une famille de protéines dont les premières ont été découvertes dans les blastomères d'invertébrés marins : leurs taux varient en fonction des phases du cycle cellulaire. La plupart des cyclines sont rapidement synthétisées au cours de l'interphase et brusquement dégradées à la fin de chaque mitose (Evans et coll., 1983).

Dans les ovocytes de xénope, le deuxième composant du MPF est reconnu par des anticorps dirigés contre la cycline B (Gautier et coll., 1990). Cette dernière avait été identifiée comme composant du MPF chez d'autres espèces dès 1989 (Minshull et coll., 1989). Le MPF est constitué par l'association de ces deux sous-unités. La cycline B a un rôle essentiellement régulateur alors que p34^{Cdc2} porte l'activité kinasique. p34^{Cdc2} est le premier membre d'une famille de kinases dont l'activité nécessite leur liaison à une cycline (Doree et Hunt, 2002). Ces kinases sont dénommées CDK (Cyclin dependent kinases) : p34^{Cdc2} a reçu le nom de Cdk1. 11 CDK sont actuellement connues ainsi que 14 (A à L et T) types de cyclines. De multiples complexes cycline/CDK sont impliqués dans différentes phases du cycle cellulaire. L'hétérodimère composé de p34^{Cdc2} / cycline B est le complexe universellement reconnu comme responsable de l'entrée et de la sortie de phase M (Fig. 15).

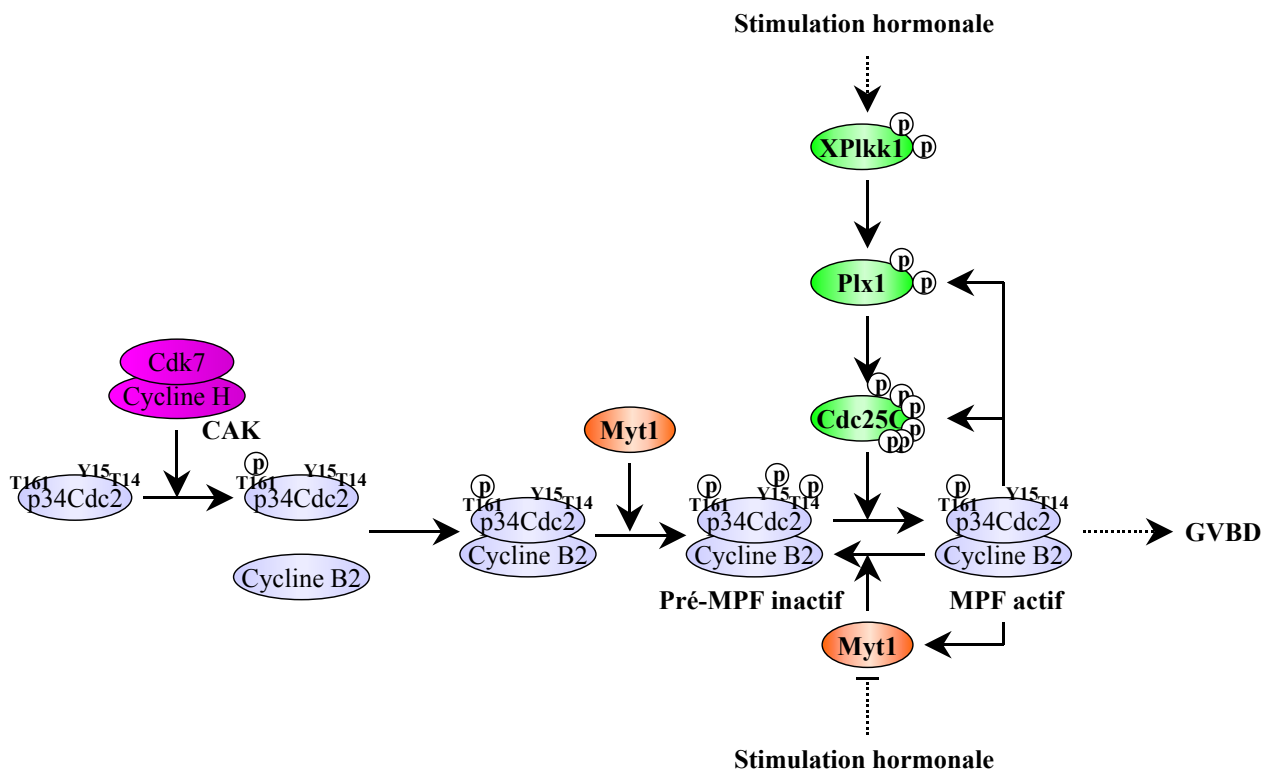


Figure 16 : Activation du MPF dans l'ovocyte de xénope

III Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la maturation

1. Variations de l'activité MPF

Dans les ovocytes, l'activité du MPF est mesurée grâce à sa capacité à phosphoryler l'histone H1, l'une des cibles de p34^{Cdc2}. L'activation du MPF déclenche l'entrée en phase M. A l'inverse, la sortie de phase M nécessite l'inactivation du complexe cycline B / p34^{Cdc2}. Lors de la transition métaphase - anaphase I, la diminution de l'activité H1 kinase permet la sortie de phase M (Kobayashi et coll., 1991; Ohsumi et coll., 1994; Roy et coll., 1996; Gross et coll., 2000). L'activité kinasique résiduelle du MPF est essentielle à l'absence d'interphase et de réplication de l'ADN entre la méiose I et la méiose II et donc à l'entrée en méiose II (Furuno et coll., 1994; Picard et coll., 1996; Roy et coll., 1996; Thibier et coll., 1997; Gross et coll., 2000; Iwabuchi et coll., 2000). Lors du blocage en métaphase II, l'activité H1 kinase reste élevée et ne disparaît qu'au moment de la fécondation, permettant la sortie de méiose II et la reformation d'une enveloppe nucléaire pour donner le pronucleus femelle (Lorca et coll., 1992).

Un stock de pré-MPF (cyclineB2 / p34^{Cdc2}) est maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme des ovocytes de stade VI immatures (Gautier et Maller, 1991; Kobayashi et coll., 1991; Krek et Nigg, 1991b; a; Norbury et coll., 1991; Solomon et coll., 1992). La cycline B2 et p34^{Cdc2} sont détectées dans les ovocytes dès le stade I (Furuno et coll., 2003). La forme libre de p34^{Cdc2} présente une activité kinasique faible (Lorca et coll., 1992). Cette activité est donc dépendante de la liaison entre la cycline B et p34^{Cdc2}. Les modifications de l'état de phosphorylation de p34^{Cdc2} régulent l'activité kinasique (Fig. 16 ; Solomon et coll., 1992; Solomon, 1993; 1994).

2. La CAK et la cycline B

La phosphorylation de p34^{Cdc2} sur le résidu Thr 161 change sa conformation et facilite sa liaison avec la cycline (Jeffrey et coll., 1995; Paulovich et Hartwell, 1995).

Cette phosphorylation est catalysée par une enzyme appelée CAK (CDK activating kinase). La CAK est constituée par le complexe cycline H/Cdk7/Mat1 (Fesquet et coll., 1993; Poon et coll., 1993; Solomon et coll., 1993; Adamczewski et coll., 1996; Nigg, 1996). Cdk7 (MO15) est la sous-unité catalytique (Solomon et coll., 1993), la cycline H est la sous-unité régulatrice (Fisher et Morgan, 1994; Makela et coll., 1994). Le taux de cette cycline reste constant au cours du cycle cellulaire, contrairement aux autres cyclines. La phosphorylation de la Thr161 a lieu en phase G2 et sa déphosphorylation par la phosphatase KAP a lieu après la dégradation de la cycline B (Hannon et coll., 1994; Poon et Hunter, 1995; Hanlon et Barford, 1998).

La liaison de la cycline B génère un changement de conformation qui démasque le site catalytique de p34^{Cdc2} et favorise son activité Ser/Thr kinase (De Bondt et coll., 1993). Toutes les cyclines s'associent avec les CDK par l'intermédiaire d'une région appelée « cyclin box » (Nugent et coll., 1991; Kobayashi et coll., 1992; Lees et Harlow, 1993). L'injection de ce domaine de liaison est suffisante pour induire la reprise méiotique des ovocytes de xénope (Lees et Harlow, 1993). La partie N-terminale de la « cyclin box » stabilise le complexe cycline/CDK (Endicott et coll., 1999).

Les cyclines B contiennent dans leurs extrémités N-terminales une séquence d'export nucléaire. La phosphorylation de cette séquence est nécessaire pour, d'une part, l'accumulation de la cycline B dans la vésicule germinative et d'autre part, l'activité du complexe cycline B1/p34^{Cdc2} (Pines et Hunter, 1994; Yang et coll., 1998a; Hagting et coll., 1999) ainsi que du complexe cycline B2/p34^{Cdc2} (Yoshitome et coll., 1998). Chez l'étoile de mer, la cycline B est phosphorylée par le MPF lui-même (Borgne et coll., 1999). Dans l'ovocyte de xénope, la phosphorylation de la cycline B se produit au même moment que le MPF (Minshull et coll., 1991). *In vivo*, p34^{Cdc2} phosphoryle la cycline B2 sur son résidu Ser 90 (Gautier et coll., 1990; Izumi et Maller, 1991). En outre, une kinase de la cycline B2, Cyk, a été identifiée dans les ovocytes. Il s'agit d'une forme particulière de la Calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase II (CaMKII) qui est activée avant le MPF. Elle phosphoryle *in vitro* la cycline B2 sur les résidus Thr 41 et Ser 53. Par contre, une mutation inhibitrice ou

activatrice de ces sites de phosphorylation ne révèle aucune implication dans la reprise méiotique ou la dégradation de la cycline (Derua et coll., 1997; Stevens et coll., 1999).

3. Myt1 et Wee1

Dans les ovocytes immatures, la cycline B2 et p34^{Cdc2} sont associées sous forme de pré-MPF. p34^{Cdc2} est maintenue inactive par phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 par la kinase membranaire Myt1 (Mueller et coll., 1995b; Liu et coll., 1997; Palmer et coll., 1998). Ces résidus sont phosphorylés lorsque p34^{Cdc2} s'associe à la cycline B2 (Solomon et coll., 1990; Meijer et coll., 1991; Solomon et coll., 1992). Ces deux résidus sont situés au cœur du domaine de fixation de l'ATP de p34^{Cdc2} et leur phosphorylation inhibe la liaison de l'ATP (Gould et Nurse, 1989). Myt1 est présente dans les ovocytes dès le stade I. Sa quantité augmente jusqu'au stade IV (Furuno et coll., 2003). Elle est elle-même contrôlée par des phosphorylations qui empêchent son activité (Mueller et coll., 1995b). Ces phosphorylations sont catalysées par deux membres de la voie ERK de l'ovocyte : p39^{Mos} (Peter et coll., 2002) et p90^{Rsk} (Palmer et coll., 1998). Dans les ovocytes de l'étoile de mer *Asterina pectinifera*, Myt1 est également phosphorylée par PKB/Akt (Okumura et coll., 2002). Une autre kinase inhibitrice mais nucléaire, Wee1, ne phosphoryle que le résidu tyr15 (Featherstone et Russell, 1991; Parker et coll., 1992; Boohar et coll., 1993; Lee et coll., 1994; Mueller et coll., 1995a; Watanabe et coll., 1995). La quantité de XeWee1 varie au cours de la croissance ovocytaire : elle est présente aux stades I, II et III puis disparaît (Nakajo et coll., 2000; Furuno et coll., 2003). Elle ne réapparaît que 1 à 1,5h après la GVBD, puis durant la méiose II et les cycles de division embryonnaire précoces (Murakami et Vande Woude, 1998; Nakajo et coll., 2000). La surexpression de XeWee1 réduit fortement la GVBD (5 à 10 %) lors d'une stimulation par la progestérone. Dans ces ovocytes, la phosphorylation de la Tyr15 de p34^{Cdc2} est maintenue. L'absence de XeWee1 est requise pour la suppression de la phase S après la première division de méiose (Nakajo et coll., 2000).

4. Cdc25

La déphosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15, par Cdc25, est responsable de l'activation du MPF. Cdc25 est une phosphatase à double spécificité, capable de déphosphoryler des résidus Ser/Thr aussi bien que des résidus tyrosine (Dunphy et Kumagai, 1991; Gautier et Maller, 1991; Kumagai et Dunphy, 1991; Strausfeld et coll., 1991). Chez les mammifères, trois Cdc25 ont été identifiées (A, B et C) relativement homologues dans leurs domaines en position C-terminale (Sadhu et coll., 1990; Galaktionov et Beach, 1991). Cdc25C agit *in vivo* comme régulateur de la transition G2/M (Millar et coll., 1991) en activant le complexe cycline B/Cdk1 (Hoffmann et coll., 1993; Strausfeld et coll., 1994). Cdc25B est également fortement exprimée dans les cellules au moment de la transition G2/M (Kakizuka et coll., 1992). Quant à Cdc25A, elle est phosphorylée et activée en phase S et sa phosphorylation dépend de l'activité du complexe cycline E/Cdk2 (Hoffmann et coll., 1994). Trois isoformes fortement homologues ont été clonées chez le xénope (Kumagai et Dunphy, 1991; Izumi et coll., 1992). La microinjection d'une protéine recombinante Cdc25A humaine déclenche l'activation du MPF et la GVBD en absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique (Rime et coll., 1994).

L'activité de Cdc25 est dépendante de son état de phosphorylation. La phosphorylation du résidu Ser 287 lie cette phosphatase aux protéines 14-3-3 ce qui provoque la séquestration et l'inhibition de Cdc25 (Kumagai et coll., 1998; Yang et coll., 1999; Mils et coll., 2000; Morris et coll., 2000; Graves et coll., 2001; Giles et coll., 2003). Les kinases responsables de cette phosphorylation seraient Chk1 (Oe et coll., 2001) et la PKA (Duckworth et coll., 2002). La déphosphorylation du résidu Ser 287 de Cdc25 serait contrôlée par les phosphatases PP1 et PP2A. Cependant, la protéine 14-3-3 protégerait ce résidu de la déphosphorylation. Lors de l'entrée en phase M, la dissociation de 14-3-3 précéderait la déphosphorylation de la Ser 287 de Cdc25 (Hutchins et coll., 2002; Margolis et coll., 2003).

Lors de son activation, Cdc25 est hyperphosphorylée. Ceci se traduit par l'observation sur immunoempreinte d'un important retard de mobilité

électrophorétique (de l'ordre de 16 kDa : Izumi et coll., 1992). Dans les ovocytes en prophase I, Cdc25 est maintenue déphosphorylée et inactive par une phosphatase sensible à l'acide okadaïque (Izumi et coll., 1992; Kumagai et Dunphy, 1992; Hoffmann et coll., 1993). Cette phosphatase serait PP2A (Kumagai et Dunphy, 1992; Clarke et coll., 1993). Au cours de la phase M, Cdc25 est hyperphosphorylée dans son domaine N-terminal par la kinase Plx1 (Polo-like kinase 1 de xénope : Kumagai et Dunphy, 1996; Qian et coll., 1998a). L'injection d'anticorps anti-Plx1 ou de forme dominant négatif de Plx1 retarde la phosphorylation et l'activation de Cdc25 lors d'une stimulation des ovocytes par la progestérone (Qian et coll., 1998a). De plus, l'injection de Cdc25 restaure les effets délétères de l'injection d'anticorps anti-Plx1. L'injection de Plx1 accélère l'activation de Cdc25 et l'entrée en méiose. Ces expériences situent Cdc25 en aval de la cascade de phosphorylation Plx1/XPlkk1. En effet, Plx1 est contrôlée par phosphorylation par la kinase XPlkk1 (Polo-like kinase kinase : Qian et coll., 1998b). La kinase responsable de la phosphorylation et de l'activation de Xplkk1 n'a pas encore été identifiée.

Les expériences de microinjection de cytoplasme ont révélé l'existence d'une boucle d'autoamplification du MPF (Masui et Markert, 1971; Wasserman et Masui, 1975). *In vitro*, le MPF phosphoryle et active Cdc25 sur au moins 5 résidus situés dans la partie N-terminale régulatrice : Thr48, Thr67, Thr138, Ser205 et Ser285 (Hoffmann et coll., 1993; Izumi et Maller, 1993; Strausfeld et coll., 1994). La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'autoamplification du MPF par Cdc25 (Izumi et Maller, 1993). Le MPF est également capable de phosphoryler Plx1 *in vitro*. Cette phosphorylation n'est pourtant pas capable d'activer Plx1 (Qian et coll., 1998a). Cependant, l'activation directe du MPF par injection de Cdc25 active dans les ovocytes entraîne une activation de Plx1 démontrant qu'il existe un rétrocontrôle positif du MPF sur Plx1 (Qian et coll., 1998a). Enfin, l'activation et l'autoamplification du MPF nécessite la présence de Plx1. Le MPF n'est pas activé dans des ovocytes de stade IV stimulés par la progestérone bien que les taux intracellulaires en AMPc diminuent (Mulner et coll., 1983; Sadler et Maller, 1983). L'injection de cytoplasme d'œuf mature dans des ovocytes de stade IV ne permet pas la déphosphorylation du

résidu Tyr15 de p34^{Cdc2} (Rime et coll., 1994). Ces ovocytes contiennent du pré-MPF et Cdc25 (Rime et coll., 1994; Furuno et coll., 2003). Par contre, Plx1 n'est pas exprimée. La surexpression de Plx1 permet d'activer l'autoamplification du MPF dans les ovocytes de stade IV (Karaïskou et coll., 2004).

5. Synthèse et dégradation de la cycline B

Dans des extraits cytoplasmiques d'œufs de xénope, les taux de cycline B varient de manière cyclique. Cette variation disparaît lorsque la synthèse protéique est inhibée ou lorsque les ARNm subissent un traitement par la RNase. Dans ce cas, la réactivation du MPF peut être obtenue par l'injection d'ARNm de cycline B d'oursin (Murray et Kirschner, 1989).

Cinq types de cyclines B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Minshull et coll., 1989; Brandeis et coll., 1998). Les cyclines B2 et B5 sont stockées dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF. L'incubation des ovocytes en progestérone stimule la synthèse *de novo* des cyclines B1 et B4 juste avant la GVBD. Les taux des cyclines B1, B2, B4 et B5 restent stables au moment de la métaphase II (Kobayashi et coll., 1991; Rime et coll., 1994; Hochegger et coll., 2001). Bien que les ovocytes contiennent des ARNm codant la cycline B3, ceux-ci ne semblent pas traduits et la cycline B3 ne jouerait aucun rôle dans la reprise méiotique (Hochegger et coll., 2001). La synthèse de la cycline B1 est contrôlée négativement par la PKA. Elle est indépendante de l'activité du MPF (Frank-Vaillant et coll., 1999). Les ARNm de la cycline B1 contiendraient dans leur UTR3' un à plusieurs éléments répresseurs de la polyadénylation (Barkoff et coll., 2000).

Dans les ovocytes de xénope, la micro-injection de cyclines A ou B, sous forme d'ARNm ou de protéines, provoque la GVBD en l'absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique (Swenson et coll., 1986; Roy et coll., 1991; Huchon et coll., 1993; Taieb et coll., 1997). La quantité de cycline B stockée dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF est suffisante pour permettre la GVBD

indépendamment de la synthèse de nouvelles molécules de cyclines (Minshull et coll., 1991; Hohegger et coll., 2001).

Entre les deux divisions de méiose, la quantité de cyclines B et l'activité H1 kinase diminuent de 50 à 70% (Kobayashi et coll., 1991; Ohsumi et coll., 1994; Roy et coll., 1996; Gross et coll., 2000). La dégradation des cyclines B est partiellement masquée par la synthèse de nouvelles cyclines. L'ubiquitinylation puis la dégradation des cyclines B par le protéasome conditionnent la sortie de phase M (Zachariae et Nasmyth, 1999; Nasmyth et coll., 2000). L'ubiquitinylation est réalisée 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 des mutations de la « destruction box » empêchent la dégradation de la cycline. L'injection d'une forme non dégradable de cycline B dans les ovocytes de xénope déclenche la reprise de la méiose mais les ovocytes restent bloqués en métaphase I (Huchon et coll., 1993). L'ubiquitine ligase spécifique de la transition métaphase-anaphase est l'APC (Anaphase promoting complex). L'activation de l'APC nécessite sa liaison à deux protéines régulatrices : p55^{Cdc20}/Fizzy et Cdh1/Hct1/Fizzy-related (Schwab et coll., 1997; Sigrist et Lehner, 1997; Visintin et coll., 1997; Fang et coll., 1998b; a; Kramer et coll., 1998; Lorca et coll., 1998; Zachariae et coll., 1998). L'activité de ces deux protéines est contrôlée par leur état de phosphorylation. Des expériences menées *in vitro* à partir de protéines de palourde et d'humain ont montré que p55^{Cdc20} ne peut activer l'APC que si elle est phosphorylée au préalable par le MPF (Kotani et coll., 1999). Dans les ovocytes de xénope, l'activité de l'APC-Xp55^{Cdc20} ne serait pas nécessaire à la transition métaphase I-anaphase I alors qu'elle est requise à la transition métaphase II - anaphase II (Peter et coll., 2001; Taieb et coll., 2001).

L'inactivation du MPF nécessite la déphosphorylation du résidu Thr161 de p34^{Cdc2} qui n'est possible qu'après la dégradation de la cycline B (Lorca et coll., 1992).

6. Protéines associées au MPF

➤ Xe-p9

Des protéines associées au complexe cycline B/p34^{Cdc2} modulent son activité. p13^{Suc1} est la première molécule associée au MPF identifiée chez la levure fissipare et porte le nom de Cks1 chez la levure bourgeonnante. Cette protéine est capable de compléter l'effet de mutations de p34^{Cdc2} chez ces levures (Hayles et coll., 1986; Hadwiger et coll., 1989). *In vitro*, cette protéine se lie à p34^{Cdc2} pour en réguler l'activité (Brizuela et coll., 1987; Hadwiger et coll., 1989). Chez le xénope, l'homologue de p13^{Suc1}/Cks est la protéine Xe-p9. Dans des extraits interphasiques, son immunosuppression empêche l'entrée en mitose. Ce résultat suggère que Xe-p9 régule l'activation du MPF à la transition G2/M (Patra et Dunphy, 1996) et facilite la phosphorylation de Cdc25, Myt1 et Wee1 par le MPF (Patra et coll., 1999). En outre, Xe-p9 régule de manière positive la phosphorylation de la sous-unité Cdc27 de l'APC par le MPF (Patra et Dunphy, 1998). Xe-p9 est donc impliquée dans la dégradation de la cycline B par l'APC (Patra et Dunphy, 1998).

➤ Ringo/Speedy

La protéine Ringo, encore appelée Speedy, ne présente aucun domaine d'homologie connu avec d'autres protéines hormis une séquence d'export nucléaire (Ferby et coll., 1999; Lenormand et coll., 1999). L'injection de Ringo dans des ovocytes immatures entraîne l'activation du MPF et de la voie MAP kinase et la GVBD en absence de stimulation hormonale. L'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de Ringo bloque la reprise méiotique en progestérone (Ferby et coll., 1999; Lenormand et coll., 1999). Ringo se lie à p34^{Cdc2} monomérique et l'active alors qu'elle est incapable de se fixer à p34^{Cdc2} lorsque celle-ci est associée à la cycline B (Ferby et coll., 1999; Lenormand et coll., 1999; Karaïskou et coll., 2001). Cette activation de p34^{Cdc2} est indépendante de la phosphorylation du résidu Thr 161 (Karaïskou et coll., 2001). Chez la souris, Ringo induit également l'activation du MPF et la GVBD (Terret et coll., 2001).

III Cibles du MPF

Les lamines, protéines constitutives de la lamina de l'enveloppe nucléaire, sont hyperphosphorylées lors de l'entrée en mitose et déphosphorylées à la sortie de phase M (Burke et Gerace, 1986; Heald et McKeon, 1990). Cette phosphorylation serait responsable de la GVBD. Les sites de phosphorylation *in vivo* de la lamine B2 sont phosphorylés *in vitro* par p34^{Cdc2} (Peter et coll., 1990). La phosphorylation des lamines par p34^{Cdc2} n'est pourtant pas suffisante puisque, dans des extraits acellulaires, des noyaux interphasiques ne subissent pas la GVBD, même si les lamines sont phosphorylées par du MPF purifié (Peter et coll., 1990). Les mêmes sites de phosphorylation des lamines sont phosphorylés par les MAP kinases (Peter et coll., 1992).

Le MPF phosphoryle l'histone H1 *in vitro* et *in vivo* (Guo et coll., 1995). Cette phosphorylation serait impliquée dans la condensation des chromosomes par le biais du recrutement de facteurs de compaction telle que la topoisomérase II (Adachi et coll., 1991).

Au cours de la maturation, le MPF phosphoryle *in vivo* les sous-unités δ et γ du facteur d'élongation EF1 (Mulner-Lorillon et coll., 1989; Belle et coll., 1995). Le MPF contrôle également la synthèse protéique par l'intermédiaire de la voie Aurora A/CPEB. L'activité de Aurora A augmente parallèlement à celle de p34^{Cdc2}. La synthèse d'Aurora A est indépendante du MPF. Les inhibiteurs de p34^{Cdc2}, p21^{Cip1}, roscovitine et 6-Diméthylaminopurine empêchent la phosphorylation et bloquent l'activité de Aurora A (Frank-Vaillant et coll., 2000). CPEB est également phosphorylée *in vitro* par p34^{Cdc2} (Paris et coll., 1991). Cette phosphorylation entraîne la dégradation de CPEB (Reverte et coll., 2001; Thom et coll., 2003).

Enfin, le MPF est associé aux microtubules (Fellous et coll., 1994; Ookata et coll., 1995). *In vitro*, p34^{Cdc2} régule la vitesse d'élongation des microtubules (Verde et coll., 1990; Verde et coll., 1992). Le MPF est associé aux microtubules par l'intermédiaire de Map4. p34^{Cdc2} phosphoryle Map4 et inhibe ainsi son activité stabilisatrice des microtubules. Néanmoins Map4 ne perd pas sa capacité de fixation aux

microtubules, ce qui maintient la localisation du MPF au niveau du fuseau de division (Ookata et coll., 1995). L'association de p34^{Cdc2} à d'autres MAP n'est pas exclue. Le MPF phosphoryle Map2 (Faruki et coll., 1992; Itoh et coll., 1997) et entraîne une diminution, d'une part de la capacité de fixation de Map2 sur la tubuline et d'autre part de la polymérisation des microtubules (Burns et coll., 1984). p34^{Cdc2} phosphoryle également la stathmine sur deux des quatre résidus sérine dont la phosphorylation est nécessaire à la progression mitotique (Larsson et coll., 1995; Marklund et coll., 1996; Larsson et coll., 1997). XMap215 est aussi phosphorylée *in vitro* par p34^{Cdc2} (Vasquez et coll., 1999). Toutes ces MAP peuvent être phosphorylées par MAP kinase.

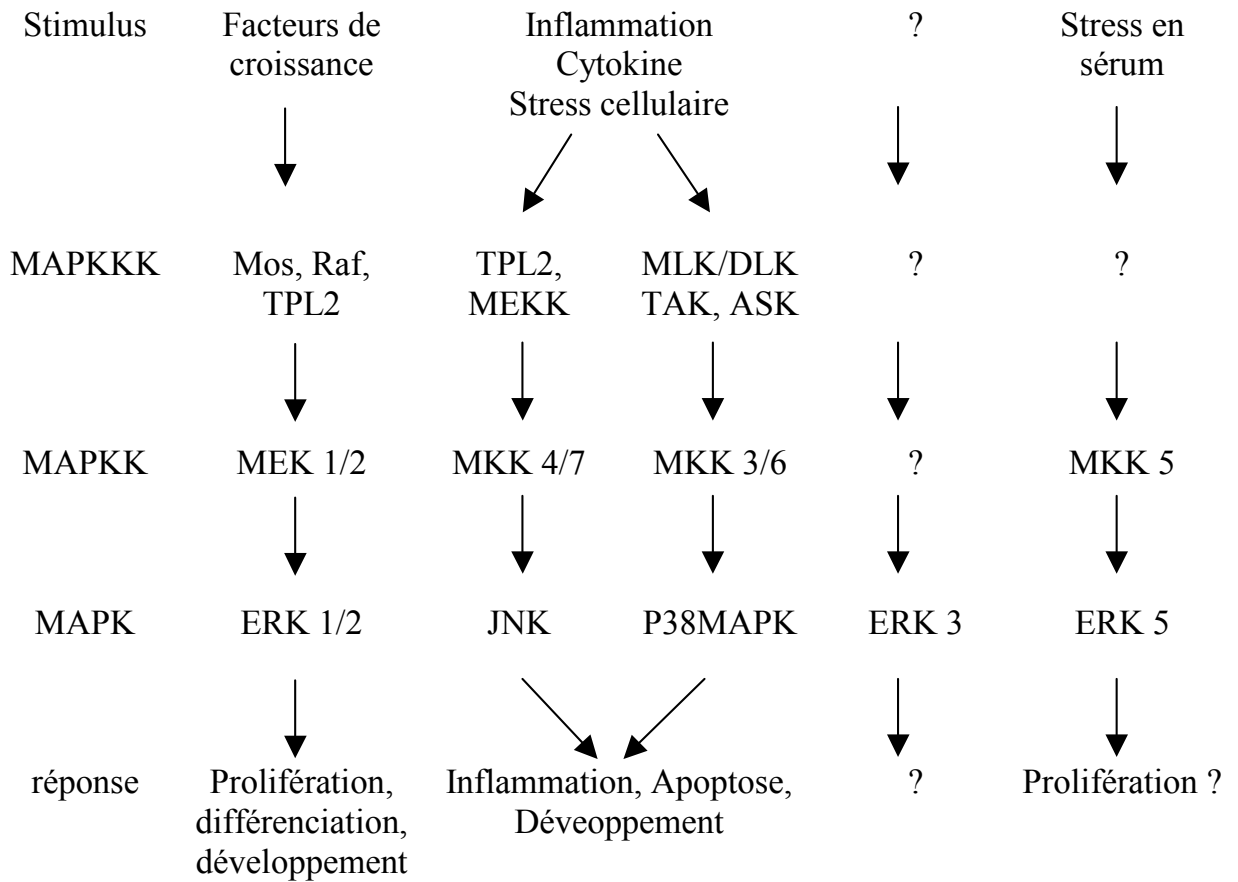


Figure 17 : Les voies des MAP kinases (D'après Tanoue et Nishida, 2003)

Chapitre V : Les voies des MAP kinases

I Généralités

La première MAP kinase (d'abord Microtubule associated protein kinase) a été identifiée dans les cellules NIH 3T3 stimulées par l'insuline, grâce à sa capacité de phosphorylation de Map2. Elle fut baptisée Erk1 (Extracellular regulated kinase 1) en raison de son activation en réponse aux signaux extracellulaires (Boulton et coll., 1990). Cette kinase est l'un des membres d'une famille de protéines appelées MAP kinases (Mitogen activated protein kinases) activées au cours de cascades de phosphorylations déclenchées par des signaux extracellulaires tels que les agents mitogènes. Les membres de ces cascades sont organisés en modules indépendants dont chacun active celui qui le suit en le phosphorylant. On distingue plusieurs modules : une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), une MAP kinase kinase (MAPKK) et une MAP kinase (MAPK). Les modules MAPKKK et MAPKK sont appelés respectivement MAPK/ERK kinase kinase (MEKK) et MAPK/ERK kinase (MEK) dans le cas des voies des MAP kinases Erk 1 et 2. Enfin, les MAPK-activated protein kinases (MAPAPK) sont en aval des MAP kinases (Fig.17 ; revue, Tanoue et Nishida, 2003). Ces cascades de phosphorylations sont également régulées par des protéines phosphatases à double spécificité (qui déphosphorylent les résidus Ser/Thr et Tyr). Ces phosphatases sont spécifiques des MAP kinases et sont appelées MAPK phosphatases (MKP).

Les membres de la famille des MAP kinases sont répartis en cinq groupes ayant leurs propres mécanismes de régulation :

- Les MAP kinases ERK répondent aux signaux extracellulaires stimulant la croissance ou la différenciation.

- Les MAP kinases JNK ou SAP kinases (c-Jun N-terminal kinases ou Stress activated protein kinases) sont activées par des signaux de stress.
- Les MAP kinases de la famille de p38^{MAPK} répondent également à des signaux de stress.
- La MAP kinase Erk5 (encore appelée Big MAP kinase) est impliquée dans la réponse aux signaux de stress nutritionnel.
- La MAP kinase Erk3 est encore très mal connue.

II Voies MAP kinases et reprise méiotique

1. Les modules identifiés dans l'ovocyte

1.1. Module MAPKKK

1.1.1. p39^{Mos}

La protéine Mos est le produit du proto-oncogène homologue cellulaire de l'oncogène *v-mos* du virus responsable du sarcome murin de Moloney (Oskarsson et coll., 1980; Van Beveren et coll., 1981). Dans les cellules somatiques, elle n'est généralement pas exprimée (Propst et Vande Woude, 1985). Dans les cellules germinales, elle est synthétisée et elle s'accumule. L'ARNm de Mos est détectable précocement au cours de l'ovogenèse et reste stable jusqu'à la gastrulation. La protéine n'est cependant présente qu'au cours de la maturation. Elle s'accumule peu de temps avant la GVBD et n'est dégradée qu'à la fin de la deuxième division méiotique (Sagata et coll., 1988). Le proto-oncogène *mos* code une protéine de 39 kDa (p39^{Mos}) à activité Ser/Thr kinase (Watanabe et coll., 1989).

L'injection d'oligonucléotides antisens de p39^{Mos} de type phosphodiester bloque la synthèse de p39^{Mos} et l'activation de la MAPKAPK p90^{Rsk} lors d'une stimulation par la progestérone ou par l'insuline (Barrett et coll., 1990). L'injection du même type

d'oligonucléotides ou d'oligonucléotides antisens de p39^{Mos} de type Morpholino inhibe l'activation de la MAPK de type ERK Xp42^{Mpk1} et de sa cible p90^{Rsk} par la progestérone (Dupre et coll., 2002a). Par contre, l'activation de p90^{Rsk} par injection d'une forme oncogénique de Ras n'est que partiellement inhibée par l'injection d'oligonucléotides antisens phosphodiester de p39^{Mos} (Barrett et coll., 1990; Dupre et coll., 2002b). p39^{Mos} phosphoryle directement la MAPKK Mek1 *in vivo* (Posada et coll., 1993). Dans des extraits ovocytaires, l'ajout de p39^{Mos} induit l'activation de MAPK (Nebreda et Hunt, 1993; Posada et coll., 1993; Shibuya et Ruderman, 1993). Enfin, l'injection d'anticorps dirigés contre Mek1 bloque la reprise méiotique déclenchée par injection de Mos (Kosako et coll., 1994b). p39^{Mos} est la MAPKKK / MEK kinase qui active la voie des MAP kinases de type ERK lors de la maturation stimulée par la progestérone.

La voie MAP kinase est activée en aval de la levée du blocage en prophase I par la PKA. L'injection d'une PKA active ou inactive inhibe la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk} lors d'une stimulation par la progestérone (Schmitt et Nebreda, 2002). La présence de PKA empêche la synthèse de p39^{Mos} si Xp42^{Mpk1} est inactive (Faure et coll., 1998). Dans les ovocytes de rat, la PKA inhibe la polyadénylation de l'ARNm de Mos (Lazar et coll., 2002).

La synthèse de XCdh1, constituant de l'APC, est requise pour la GVBD en progestérone (Papin et coll., 2004). Le rôle de XCdh1 passerait par un mécanisme indépendant de l'APC puisque l'activité du protéasome n'est pas nécessaire à la reprise méiotique. La micro-injection de Cdh1 humaine permet d'accélérer les effets de la progestérone mais ne déclenche pas la GVBD en absence de stimulation hormonale. Par contre, elle entraîne la synthèse de p39^{Mos} et l'activation de Xp42^{Mpk1} (Papin et coll., 2004). XCdh1 pourrait être impliquée dans l'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} (Papin et coll., 2004).

Au cours de la maturation des ovocytes de xénope, l'accumulation de p39^{Mos} résulte, à la fois, de sa synthèse et de sa stabilisation. Dans l'ovocyte en prophase I, l'absence de queue polyA sur les ARNm de p39^{Mos} empêche leur traduction. Les

effets de la progestérone entraînent la polyadénylation des ARNm, nécessaire à la synthèse et à l'accumulation de p39^{Mos} (Gebauer et coll., 1994; Sheets et coll., 1995). La polyadénylation serait dépendante du MPF (Ballantyne et coll., 1997; Frank-Vaillant et coll., 1999). La phosphorylation de CPEB par Aurora A est nécessaire à la polyadénylation de l'ARNm de p39^{Mos} (Mendez et coll., 2000a). La surexpression d'Aurora A accélère l'accumulation de p39^{Mos}, l'activation de la MAP kinase Xp42^{Mpk1} et la GVBD. De plus, elle diminue la concentration de progestérone requise pour déclencher la reprise de la méiose (Andresson et Ruderman, 1998). L'injection d'une protéine Aurora A constitutivement active est capable d'induire la GVBD, la synthèse de p39^{Mos}, l'activation du MPF et de Xp42^{Mpk1}, indépendamment de toute stimulation hormonale. La voie Gsk3 β -AuroraA/Eg2 relierait donc les étapes précoces de la maturation à la voie des MAP kinases.

Seuls trois résidus de p39^{Mos} ont été identifiés comme sites majeurs de phosphorylation. Il s'agit de la Ser 3 (Freeman et coll., 1992; Nishizawa et coll., 1992), de la Ser 16 (Bai et coll., 1991; Pham et coll., 1999) et de la Ser 25 (Yang et coll., 1996). La Ser 3 serait une cible d'autophosphorylation (Nishizawa et coll., 1992). Pourtant, sa phosphorylation est toujours observée si l'activité kinase de p39^{Mos} est supprimée par mutation (Freeman et coll., 1992). MAP kinase phosphoryle le résidu Ser3 *in vitro* (Matten et coll., 1996). La phosphorylation sur Ser3 facilite l'association de p39^{Mos} avec MEK (Chen et Cooper, 1995). Des peptides synthétiques contenant la Ser 16 sont phosphorylés *in vitro* par le MPF (Liu et coll., 1990) et par MAP kinase (Matten et coll., 1996). La Ser 25 est le site majeur de phosphorylation du produit de l'oncogène v-Mos exprimé dans les cellules somatiques. Ce résidu est phosphorylé par PKA. Cette phosphorylation provoque une légère activation de l'activité de Mos (Yang et coll., 1996). Pourtant, la phosphorylation de ce site pourrait servir à inhiber l'activation de Mos induite par la phosphorylation de la Ser 3 (Yang et coll., 1998b). D'autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence. La Ser 232 (263 de v-Mos) est un site mineur de phosphorylation dans les cellules somatiques transformées. Il peut être phosphorylé *in vitro* par la PKA (Singh et Arlinghaus, 1997). La reprise de la méiose par injection

de Mos nécessite la présence sur la protéine de la Ser105, bien que ce site ne semble pas phosphorylé lorsque la maturation est déclenchée par la progestérone (Freeman et coll., 1992).

L'inhibition des mécanismes de dégradation de p39^{Mos} facilite son accumulation. L'injection d'une protéine Cdc2 purifiée dont l'activité kinasique est déficiente bloque l'accumulation de p39^{Mos} sans affecter son taux de synthèse. Ceci suggère que la dégradation de p39^{Mos} est régulée négativement par une voie dépendante du MPF (Nebreda et coll., 1995). p34^{Cdc2} phosphoryle et stabilise p39^{Mos} *in vitro* (Singh et Arlinghaus, 1997; Pham et coll., 1999; Castro et coll., 2001). Au moment de la GVBD, la phosphorylation de la Ser 3 augmente la stabilité de p39^{Mos} en prévenant la reconnaissance par une ubiquitine ligase du résidu proline 2 adjacent (Freeman et coll., 1992; Nishizawa et coll., 1992; Nishizawa et coll., 1993). Selon d'autres résultats, la proline 2 n'interviendrait pas directement dans la stabilisation de p39^{Mos} mais serait responsable d'une régulation négative de la phosphorylation de la Ser 3 qui inhiberait la dégradation de la protéine (Sheng et coll., 2002). La phosphorylation de la Ser 16 de Mos inhibe sa dégradation dans des cellules COS transfectées (Pham et coll., 1999).

p39^{Mos} est dégradée peu après la fécondation. Cette dégradation est dépendante de l'ubiquitinylation mais est indépendante de p55^{Cdc20} (Nishizawa et coll., 1992; Nishizawa et coll., 1993; Castro et coll., 2001). Des travaux *in vitro* ont suggéré une dégradation de p39^{Mos} par la calpaïne, une cystéine protéase dépendante du calcium (Watanabe et coll., 1989). Cependant, les concentrations calciques physiologiques observées à la fécondation semblent insuffisantes pour que la calpaïne puisse dégrader p39^{Mos} (Lorca et coll., 1991).

1.1.2. Raf

Raf est une oncoprotéine rétrovirale à activité Ser/Thr kinase (Rapp et coll., 1983; Moelling et coll., 1984). Chez l'humain, 3 isoformes ont été identifiées : A-Raf, B-Raf

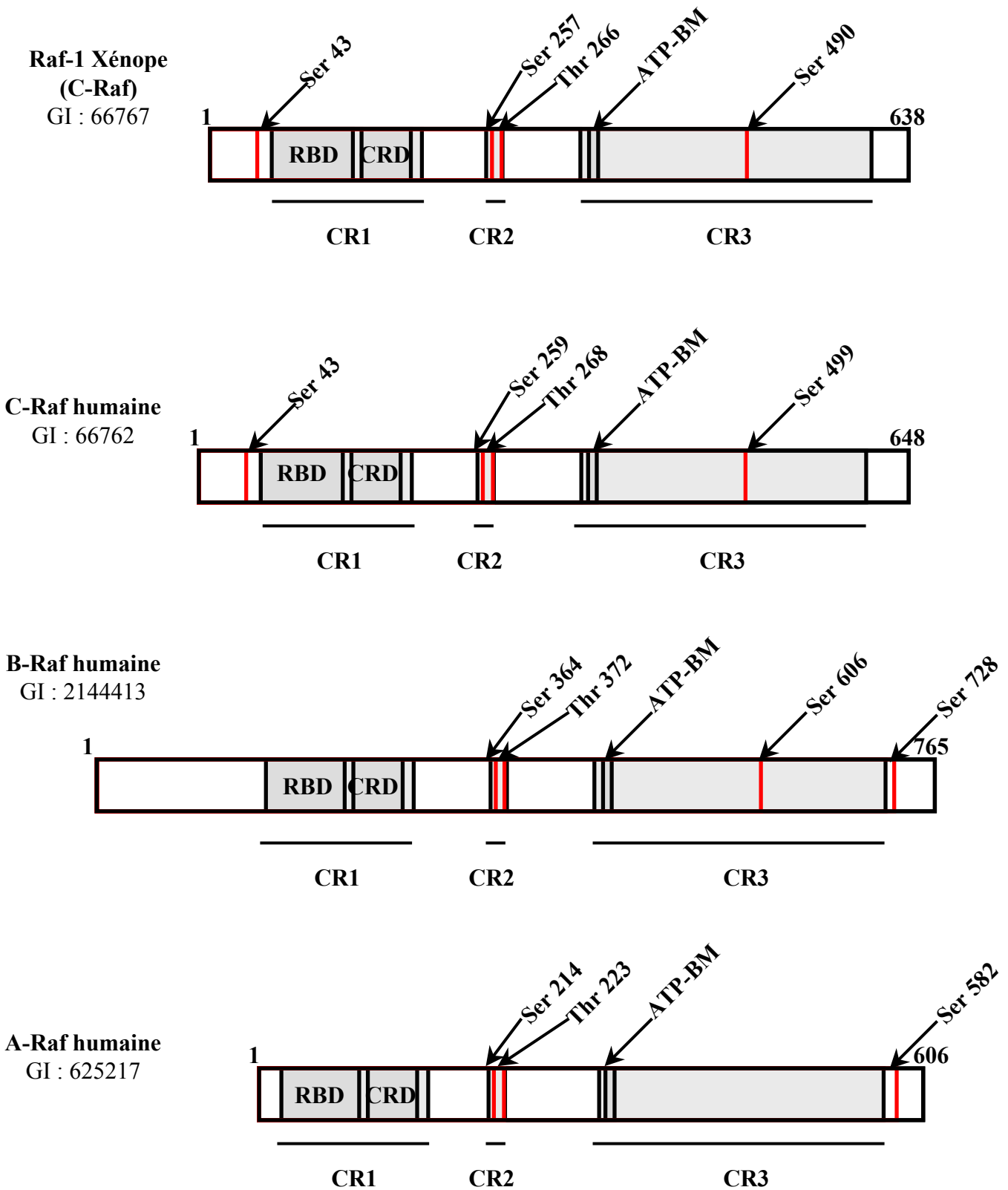


Figure 18 : Raf-1 de xénope et les Raf humaines

CR1 : Région conservée 1 de liaison à Ras ; **CR2** : région conservée 2 riche en sites de phosphorylation ; **CR3** : région conservée 3 portant l'activité catalytique ; **RBD** : domaine de liaison à Ras ; **CRD** : domaine riche en cystéine ; **ATP-BM** : motif de liaison de l'ATP. Les sites majeurs de phosphorylation sont indiqués.

et C-Raf. Toutes sont constituées de 3 régions conservées, CR1, CR2 et CR3 (Fig. 18 : Morrison et Cutler, 1997).

- CR1 et CR2 constituent le domaine régulateur de Raf situé en position N-terminale. CR1 comprend les domaines RBD (Ras binding domain) et CRD (cystein rich domain) qui sont impliqués dans la liaison de Raf à la protéine p21^{Ras} lorsque cette dernière est associée au GTP. La liaison de p21^{Ras} à Raf permet le recrutement de Raf à la membrane et son activation (Vojtek et coll., 1993; Nassar et coll., 1995; Morrison et Cutler, 1997). CR2 est une région riche en sérines et en thréonines dont les phosphorylations et les interactions protéiques affectent la localisation et l'activation de Raf (Morrison et coll., 1993; Yao et coll., 1995; Zimmermann et Moelling, 1999; Guan et coll., 2000; Zhang et Guan, 2000).
- CR3 est le domaine portant l'activité kinase. Il est situé en position C-terminale (Heidecker et coll., 1990).

Raf est la principale MEK kinase des cellules somatiques (Morrison et Cutler, 1997; Schaeffer et Weber, 1999). Son activation nécessite son recrutement à la membrane grâce à la protéine p21^{Ras} (Kikuchi et Williams, 1994; Leever et coll., 1994; Mineo et coll., 1997). En plus de cette interaction, p21^{Ras} entraîne indirectement la phosphorylation de Raf-1 (C-Raf). La PI3-K activée par p21^{Ras} produit des phospholipides qui activent la petite protéine G monomérique Rac. Cette dernière se lie à et active la kinase PAK (p21^{Cdc42/Rac1} activated Ser/Thr kinase ; Sun et coll., 2000). PAK-3 phosphoryle Raf sur le résidu Ser 338 dont la phosphorylation est requise pour l'activation de Raf (King et coll., 1998). Le résidu Tyr 341 de Raf-1 est phosphorylé par les kinases de la famille Src (Fabian et coll., 1993a; Mason et coll., 1999). Les résidus Ser 338 et Tyr 341 phosphorylés activent Raf-1 de manière synergique (Mason et coll., 1999). Au contraire, la phosphorylation de la Ser 259 par Akt supprime l'activité de Raf-1 (Zimmermann et Moelling, 1999).

Au cours de la maturation, Raf-1 est phosphorylée et activée dans les ovocytes de xénope (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b), et non dans les ovocytes de

souris (Verlhac et coll., 1996). Dans les ovocytes de xénope, l'injection d'une protéine Raf oncogénique entraîne la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et la GVBD (Muslin et coll., 1993b). Des dominants négatifs de Raf empêchent l'activation de Xp42^{Mpk1} lors d'une stimulation par la progestérone, par injection d'une forme oncogénique de Ras ou par expression du récepteur de HGF-SF constitutivement actif (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b). De plus, l'injection d'une protéine Raf constitutivement active stimule l'activation de la voie MAP kinase malgré l'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} par des oligonucléotides phosphodiester antisens (Fabian et coll., 1993b). Ces observations suggèrent que Raf est nécessaire à l'activation de la voie MAP kinase et qu'elle agit en aval de p39^{Mos}. Cependant, dans des extraits acellulaires, l'activation de la voie MAP kinase par une protéine Mos purifiée n'est pas bloquée par l'ajout d'un dominant négatif de Raf (Shibuya et coll., 1996). Ce résultat est en contradiction avec l'hypothèse qui situe Raf comme relais de p39^{Mos} dans la cascade de la voie MAP kinase.

1.2. Les voies MAP Kinases

1.2.1. La voie Mek1-Xp42^{Mpk1}

Les cellules de vertébrés expriment deux formes très similaires de protéine ERK : une protéine de 44 kDa (p44^{ERK1}) et une protéine de 42 kDa (p42^{ERK2}). Alors que les ovocytes d'un amphibien tel que l'axolotl, expriment les deux formes (Vaur et coll., 2004), les tests immunologiques ont révélé que les ovocytes de xénope n'expriment que ERK2, appelée Xp42^{Mpk1}, Xp42^{Erk} ou Xp42^{MAPK} (Ferrell et coll., 1991; Gotoh et coll., 1991; Jesus et coll., 1991; Posada et coll., 1991). Xp42^{Mpk1} est la première MAP kinase découverte dans les ovocytes de xénope par sa capacité à phosphoryler la protéine MAP2 lors de la reprise méiotique (Haccard et coll., 1990). Elle est l'homologue de la MAP kinase mammalienne p42^{Erk2}.

Xp42^{Mpk1} est activée par la MAPKK Mek1 qui la phosphoryle sur les deux résidus Thr 183 et Tyr 185 présents dans la boucle d'activation (Kosako et coll., 1993). Les kinases Erk sont les seuls substrats identifiés des MEK (Cowley et coll., 1994;

Mansour et coll., 1994). Mek1 est détectée dans les ovocytes dès le stade I. Sa quantité augmente pendant toute l'ovogenèse. Xp42^{Mpk1} est également présente dès le stade I mais son taux ne s'accroît significativement qu'à partir du stade IV (Furuno et coll., 2003).

1.2.2. La voie JNK

Les cellules mammaliennes expriment deux formes ubiquitaires Jnk1 et Jnk2 ainsi qu'une forme spécifique du cerveau, du cœur et des testicules nommée Jnk3. Ces formes majeures sont codées par trois gènes. Les poids moléculaires des protéines synthétisées varient de 46 à 55 kDa en fonction d'épissages alternatifs (Gupta et coll., 1996). Dans l'ovocyte de xénope, deux isoformes de JNK sont exprimées et activées au cours de la maturation. Leurs poids moléculaires sont de 40 kDa (Xp40^{Jnk}) et 49 kDa (Xp49^{Jnk}). Xp40^{Jnk} et Xp49^{Jnk} sont les homologues des isoformes mammaliennes p42^{Jnk} et p54^{Jnk} (Bagowski et coll., 2001b).

Dans les ovocytes de xénope, les injections de p39^{Mos}, Mek ou Raf activent les JNK. Ces dernières sont susceptibles d'être activées par rétrocontrôle après l'activation de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}. Cependant, un choc osmotique provoqué par un milieu contenant 0,5 M de sorbitol active les JNK alors que Xp42^{Mpk1} n'est pas activée (Bagowski et coll., 2001b). Aucune MAPKK spécifique de la voie JNK n'a été isolée dans les ovocytes de xénope.

1.2.3. La voie MKK6/p38^{MAPK}

Quatre formes de MAPK de la famille p38 sont connues dans les cellules mammaliennes : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ (Johnson et Lapadat, 2002). Dans les ovocytes de xénope, trois isoformes de p38^{MAPK} ont été identifiées : p38 α , p38 β et p38 γ . Xp38 γ a été clonée, elle est identique à 75% à p38 γ /SAPK3 et à 65% à p38 δ /SAPK4. La présence de p38 δ n'a pas été observée (Perdiguero et coll., 2003).

MKK 3 et MKK 6 sont les deux MAPKK en amont de la voie de p38^{MAPK}. Dans les ovocytes de xénope, MKK6 a été clonée (Perdiguero et coll., 2003).

1.3. Le module MAPKAP kinase

Xp90^{Rsk} (Ribosomal S6 subunit protein kinase) a d'abord été découverte dans l'ovocyte de xénope pour sa capacité à phosphoryler la sous-unité S6 du ribosome (Erikson et Maller, 1985). Elle est phosphorylée et activée pendant la maturation et déphosphorylée et désactivée après la fécondation (Erikson et Maller, 1989). Deux isoformes sont exprimées, Xp90^{Rsk1} et Xp90^{Rsk2} (Ferrell, 1999). Toutes deux sont des substrats de phosphorylation de Xp42^{Mpk1} (Sturgill et coll., 1988; Erikson et Maller, 1991). Elle est le principal relais de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} (Gross et coll., 2000). L'injection de p90^{Rsk} constitutivement active supplée les effets délétères de U0126, un inhibiteur de MEK 1 et 2 (Gross et coll., 2000).

1.4. Les MK phosphatases

Les MKP sont des phosphatases qui déphosphorylent les résidus thréonine et tyrosine des MAP kinases. Elles font partie de la famille des phosphatases à double spécificité (DUSP ou DSP) à laquelle appartient également Cdc25. Les MKP comptent 10 membres (Theodosiou et Ashworth, 2002). Seules Mkp1 et Mkp3 ont été étudiées dans l'ovocyte de xénope.

➤ Mkp1 (DUSP1/CL100) déphosphoryle préférentiellement Jnk et p38^{MAPK} plutôt que Erk1 et Erk2 (Tanoue et coll., 2001; Theodosiou et Ashworth, 2002). XCL100 a été clonée chez le xénope. Elle est la seule MKP connue dans les ovocytes immatures et matures dans lesquels elle est exprimée de manière constitutive. *In vitro*, XCL100 recombinante déphosphoryle les résidus thréonine et tyrosine de Xp42^{Mpk1} (Lewis et coll., 1995).

➤ Mkp3 (DUSP6/PYST1/rVH6) est spécifique de Erk1 et Erk2 (Groom et coll., 1996; Muda et coll., 1996), son identification n'a jamais été rapportée dans l'ovocyte de xénope.

L'injection de Mkp1 dans les ovocytes de xénope inhibe partiellement la synthèse de p39^{Mos} qui est donc sous rétrocontrôle positif de Xp42^{Mpk1}. Ce rétrocontrôle implique un effet sur la polyadénylation puisque l'injection de Mkp3 bloque la polyadénylation

de l'ARNm de p39^{Mos} induite par injection d'une MEK constitutivement active (Howard et coll., 1999).

Les mécanismes de régulation des MKP dans les ovocytes demeurent peu connus. Dans les ovocytes de souris, une activité de type MAP Kinase Phosphatase est régulée négativement par l'accumulation de Mos. (Verlhac et coll., 2000b).

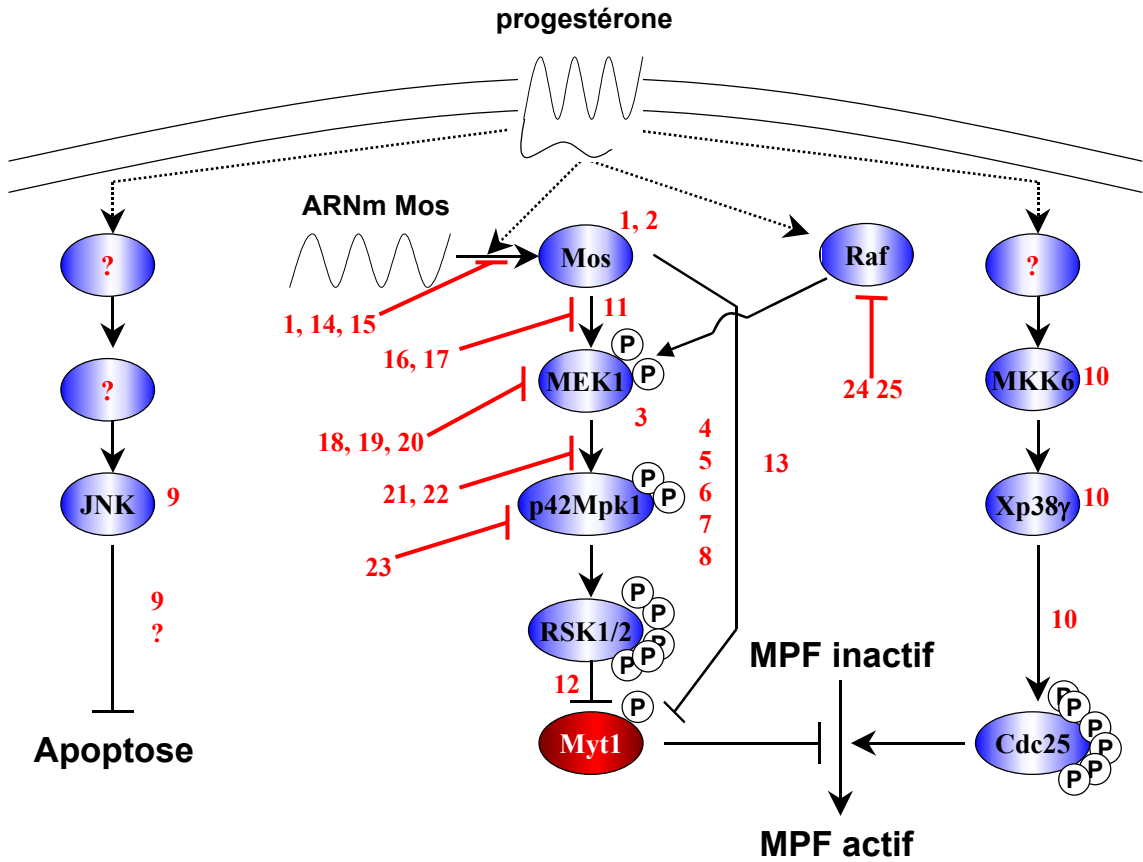
2. Rôle des voies MAP kinases dans la reprise méiotique

Contrairement au cas des cellules somatiques, les voies MAP kinases n'ont pas de rôle génomique dans les ovocytes de xénope puisque la maturation est indépendante de la transcription.

2.1 Régulation positive du MPF

2.1.1. Voies MAP kinases et GVBD

Dans les ovocytes de xénope, la stimulation des voies MAP kinases entraîne l'activation du MPF et la GVBD en absence d'hormone. Les injections d'une protéine Ras humaine ou de sa forme oncogénique (Birchmeier et coll., 1985), d'une protéine p39^{Mos} recombinante (Yew et coll., 1992) ou de son ARNm (Freeman et coll., 1989; Sagata et coll., 1989) déclenchent la reprise méiotique. Les injections de formes constitutivement actives de Mek1 (Gotoh et coll., 1995; Huang et coll., 1995) ou Mek2 (Bodart et coll., 2002b), de Erk2 thiophosphorylée (Haccard et coll., 1995) ou de Rsk constitutivement active (Gross et coll., 2001) stimulent l'activation du MPF et la GVBD. L'activation du MPF et la GVBD, déclenchées par injection de p39^{Mos}, Mek1 ou Mek2, sont indépendantes de la synthèse protéique (Yew et coll., 1992; Gotoh et coll., 1995; Huang et coll., 1995; Bodart et coll., 2002b), alors que la reprise méiotique stimulée par Erk 2 thiophosphorylée en est dépendante (Haccard et coll., 1995).



- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 Sagata et coll., 1988 | 15 Dupré et coll., 2002 |
| 2 Watanabe et coll., 1989 | 16 Fisher et coll., 1999 |
| 3 Kosako et coll., 1993 | 17 Fisher et coll., 2000 |
| 4 Ferrell et coll., 1991 | 18 Kosako et coll., 1994 |
| 5 Gotoh et coll., 1991 | 19 Duesbery et coll., 1998 |
| 6 Seaus et coll., 1991 | 20 Bodart et coll., 2002a |
| 7 Posada et coll., 1991 | 21 Cross et Smythe, 1998 |
| 8 Haccard et coll., 1995 | 22 Gross et coll., 2000 |
| 9 Bagowski et coll., 2001 | 23 Gotoh et coll., 1995 |
| 10 Perdiguero et coll., 2003 | 24 Fabian et coll., 1993 |
| 11 Posada et coll., 1993 | 25 Muslin et coll., 1993 |
| 12 Palmer et coll., 1998 | |
| 13 Peter et coll., 2002 | |
| 14 Barrett et coll., 1991 | |

Figure 19 : Les voies MAP kinase lors d'une stimulation de la maturation des ovocytes de xénope par la progestérone

La surexpression de MKK6 et de p38 γ déclenche également la GVBD (Perdiguero et coll., 2003). Au contraire, l'injection d'une forme constitutivement active de p46^{Jnk1} en est incapable (Mood et coll., 2004).

L'inhibition de la voie MAP kinase a donné des résultats contradictoires en fonction des stratégies d'inhibition utilisées (Fig. 19, Tableau 3).

Un premier groupe d'études montre que l'inhibition de la cascade des MAP kinases empêche l'activation du MPF et la GVBD. Les injections d'un anticorps neutralisant ou d'une forme dominant négatif de p21^{Ras} n'empêchent pas la reprise méiotique déclenchée par la progestérone mais bloque celle stimulée par l'insuline (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). La prévention de la synthèse de p39^{Mos} par injection d'oligonucléotides phosphodiester antisens inhibe la maturation déclenchée par la progestérone ou par l'insuline (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990). En présence de progestérone, l'injection d'une forme dominant négatif de Raf retarde (Fabian et coll., 1993b) ou inhibe (Muslin et coll., 1993b) la reprise méiotique. La maturation est bloquée par injections d'anticorps anti-MEK (Kosako et coll., 1994b), de la toxine du facteur létal de l'anthrax (LF) qui clive les MAPK kinases sans distinctions (Duesbery et coll., 1998; Bodart et coll., 2002a) ou par incubation des ovocytes en présence de PD98059, inhibiteur de Mek1 et 2 (Cross et Smythe, 1998). Enfin, l'inhibition de Xp42^{Mpk1} par injection de la phosphatase CL100 (Gotoh et coll., 1995) ou d'anticorps neutralisants (Gotoh et Nishida, 1995) empêche l'activation du MPF et la GVBD.

D'autres résultats démontrent que l'inhibition de la voie MAP kinase conduit à un simple retard de la GVBD lorsque la maturation est stimulée par la progestérone. L'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} par injection d'oligonucléotides antisens de type Morpholino (Dupre et coll., 2002a) ou l'inhibition de l'activité de p39^{Mos} par incubation en présence de geldanamycine, inhibiteur de Hsp90 (Fisher et coll., 1999a; Fisher et coll., 2000), n'empêchent pas la GVBD mais la retardent. Des résultats similaires ont été obtenus en incubant les ovocytes en présence de U0126, inhibiteur de Mek1 et Mek2 (Gross et coll., 2000). L'injection d'ARNm codant la phosphatase Mkp3 retarde

Inhibiteur	Effet	Effet sur la GVBD		Références
		Progestérone	Insuline	
α corps anti-Ras	Inactive Ras	Aucun	Inhibition	Deshpande et Kung, 1987 Korn et coll., 1987
DN Raf	Inactive Ras et Raf	Inhibition	N.D.	Muslin et coll., 1993
		Retard	N.D.	Fabian et coll., 1993
p39 ^{Mos} -POAS	Inhibe l'accumulation p39 ^{Mos}	Inhibition	Inhibition	Sagata et coll., 1988 Barrett et coll., 1990
p39 ^{Mos} -MAS	Inhibe l'accumulation p39 ^{Mos}	Retard	N.D.	Dupré et coll., 2002
Geldanamycine	Inhibe p39 ^{Mos}	Retard	Inhibition	Fisher et coll., 1999
LF	Clive et inactive l'ensemble des Mek	Inhibition	N.D.	Duesbery et coll., 1998 Bodart et coll., 2002a Chopra et coll., 2003
PD98059	Inhibe Mek 1 et 2	Inhibition	N.D.	Cross et Smythe, 1998
U0126	Inhibe Mek 1 et 2	Retard	N.D.	Gross et coll., 2000
α corps anti-Erk	Inactive les MAP kinases	Inhibition	N.D.	Gotoh et Nishida, 1995
ARNm MKP1	Inactive Xp42 ^{Mpk1}	Inhibition	N.D.	Gotoh et coll., 1995 Howard et coll., 1999
ARNm MKP3	Déphosphoryle Xp42 ^{Mpk1}	Retard	N.D.	Fisher et coll., 1999

Tableau 3 : Effets de différents inhibiteurs des voies MAP kinase sur la reprise méiotique des ovocytes de xénope

α corps : anticorps ; DN : Dominant négatif ; LF : Facteur létal de la toxine de l'anthrax ; MAS Mos : oligonucléotides antisens Morpholino contre la synthèse de p39^{Mos} ; N.D. : Non déterminé ; POAS Mos : oligonucléotides antisens phosphodiester contre la synthèse de p39^{Mos}

également la GVBD (Fisher et coll., 1999a). Bien que la surexpression de MKK6 et de p38 γ déclenche la GVBD, l'injection de formes mutantes dominant négatifs de Xp38 γ ou de MKK6 ne font que la retarder (Perdiguero et coll., 2003).

Il est intéressant de signaler que les résultats obtenus dans les ovocytes de souris sont également contradictoires. L'injection d'anticorps neutralisant l'activité de Mos empêche la GVBD (Zhao et coll., 1990; Zhao et coll., 1991). Au contraire, l'injection d'oligonucléotides antisens prévenant la synthèse de Mos ne bloque pas la maturation (Paules et coll., 1989) et des ovocytes issus de femelles nullizygotés Mos^{-/-} sont toujours capables de subir la reprise méiotique (Verlhac et coll., 1996).

2.1.2. Mécanismes d'activation du MPF par les voies MAP kinases

Myt 1, protéine kinase inhibitrice de p34^{Cdc2}, s'associe via son extrémité carboxy-terminale à p90^{Rsk}. *In vitro*, cette association entraîne la phosphorylation et l'inactivation de Myt1. *In ovo*, des complexes Myt1-p90^{Rsk} (de préférence hyperphosphorylée) ont été immunoprécipités. Ces observations suggèrent que p90^{Rsk} participe à l'activation du MPF en inhibant Myt1 (Palmer et coll., 1998). En amont de p90^{Rsk}, p39^{Mos} est capable d'interagir directement avec Myt 1 *in vitro*. p39^{Mos} phosphorylerait Myt1 *in vivo* et faciliterait ainsi la conversion du pré-MPF en MPF, même en absence d'activation de la voie MAP kinase (Peter et coll., 2002). Bien que p39^{Mos} et p90^{Rsk} soient toutes deux inhibées en présence de geldanamycine, Myt1 subit un retard de mobilité électrophorétique sur immunoempreinte. Ceci suggère que d'autres kinases indépendantes de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk}, sont impliquées dans la régulation négative de Myt1 (Fisher et coll., 1999a).

Les voies MAP kinases participent également à l'activation du MPF via la régulation positive de Cdc25. Dans les ovocytes de xénope bloqués en prophase I ou en métaphase II, Cdc25 est associée à Raf1. *In vitro* Raf1 phosphoryle et active Cdc25 A et B (Galaktionov et coll., 1995). Dans les cellules de mammifères, la voie p38^{MAPK} conduit, directement ou indirectement, à la phosphorylation des Cdc25 (Wang et coll., 2000; Bulavin et coll., 2001). *In vitro*, l'activité phosphatase de XCdc25C a été

testée en présence de Xp38 γ et de Xp38 α . Seule Xp38 γ stimule l'activité de XCdc25, même si les 199 acides aminés N-terminaux de la phosphatase sont tronqués. Xp38 γ phosphoryle XCdc25C sur le résidu Ser 205, phosphorylation responsable de l'effet activateur de Xp38 γ . La capacité de Xp38 γ à activer le MPF en phosphorylant XCdc25 est néanmoins plus faible que celle de Plx1 (Perdiguero et coll., 2003).

2.1.3. Suppression de la phase S

Après la phase S préméiotique, les ovocytes perdent la capacité de répliquer l'ADN. Le rétablissement de cette fonction nécessite la synthèse d'une ou de plusieurs protéines au moment de la GVBD. Des ovocytes traités par la cycloheximide 60 minutes après la GVBD répliquent leur ADN après la première division méiotique. Si la cycloheximide est ajoutée au milieu 30 minutes avant la GVBD, la GVBD peut avoir lieu mais la réplication de l'ADN demeure impossible (Furuno et coll., 1994). Parmi tous les composants des complexes d'initiation de la réplication et de pré-réplication, seule la protéine Cdc6 est absente des ovocytes immatures de xénope. L'injection de cette protéine est capable de restaurer la réplication de l'ADN lorsque les ovocytes sont incubés en présence de cycloheximide 30 minutes avant la GVBD (Lemaitre et coll., 2002; Whitmire et coll., 2002). Des ovocytes injectés d'oligonucléotides antisens de Cdc6 ne peuvent plus acquérir la capacité de répliquer l'ADN au cours de la maturation (Lemaitre et coll., 2002). La co-injection de Cdc6 et de 50 nM de cycline A dans des ovocytes incubés en présence de cycloheximide permet de déclencher la GVBD et d'induire la réplication de l'ADN après la première division de méiose. Cdc6 est donc la protéine dont la synthèse est requise pour permettre aux ovocytes de retrouver leur capacité à répliquer l'ADN (Whitmire et coll., 2002).

Les ovocytes possèdent dès la GVBD toutes les protéines requises pour la synthèse d'ADN. L'inactivation de la voie MAP kinase dans l'ovocyte provoque une réplication précoce de l'ADN après la première division de méiose (Furuno et coll., 1994; Gross et coll., 2000; Dupre et coll., 2002a). L'inhibition de p34^{Cdc2} à la transition méiose I-

méiose II par un dominant négatif entraîne la reformation d'une enveloppe nucléaire et la réplication de l'ADN (Furuno et coll., 1994). L'inhibition de la synthèse des cyclines B provoque la disparition de l'activité du MPF entre les deux divisions méiotiques et conduit à l'entrée en phase S (Furuno et coll., 1994; Picard et coll., 1996; Roy et coll., 1996; Thibier et coll., 1997; Gross et coll., 2000). Des ovocytes incubés en cycloheximide et co-injectés de Cdc6 et de 500 nM de cycline A subissent la GVBD mais ne peuvent répliquer leur ADN. Ce résultat serait dû au maintien d'une activité MPF forte en raison de l'importante concentration de cycline A injectée (Whitmire et coll., 2002). En conclusion, la voie $p39^{Mos}$ - $Xp42^{Mpk1}$ serait nécessaire pour réactiver prématurément un niveau d'activité du MPF élevé qui empêcherait la réplication de l'ADN entre les deux divisions méiotiques (Sagata et coll., 1989; Yew et coll., 1992; Nebreda et coll., 1995; Masui, 2000; Abrieu et coll., 2001; Hochegger et coll., 2001). Il faut cependant noter que la voie MAP kinase n'est pas nécessaire pour la réactivation du MPF entre les deux phases de méiose de l'ovocyte de souris (Verlhac et coll., 1996).

2.1.4. Activité CSF : stabilisation des cyclines

Le CSF (facteur cytoplasmique) est responsable de l'arrêt des ovocytes en métaphase de deuxième division. L'injection du cytoplasme d'un ovocyte mature dans un blastomère d'un embryon au stade deux cellules provoque l'arrêt de ce blastomère en métaphase. Ce blastomère ne se clive plus alors que le blastomère non injecté continue à se diviser normalement. Cette activité cytotatique du cytoplasme disparaît 30 à 45 minutes après la fécondation. Ce facteur est responsable de l'arrêt en métaphase des œufs de vertébrés (Masui et Markert, 1971). L'identité de ce facteur reste encore débattue. Lorsqu'ils sont injectés dans une cellule d'un embryon au stade 2, les membres de la voie MAP kinase sont capables de bloquer la division du blastomère injecté. C'est le cas de $p39^{Mos}$ (Sagata et coll., 1989), de $Xp42^{Mpk1}$ (Haccard et coll., 1993) et de $p90^{Rsk}$ (Gross et coll., 1999). Un résultat similaire a été obtenu en injectant un ARNm codant une forme constitutivement active de Mek1 (Sagata, 1995). L'activité cytotatique de $p39^{Mos}$ est inhibée par des anticorps neutralisant Mek1 (Kosako et coll., 1994a). La

phosphatase Mkp1 ou l'immunosuppression de p90^{Rsk} lèvent l'arrêt métaphasique d'extraits d'œufs de xénope (Minshull et coll., 1994; Bhatt et Ferrell, 1999).

L'arrêt en métaphase dépend du maintien de l'activité MPF. La stabilisation de l'activité MPF par le CSF 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 d'ARNm codant p39^{Mos}, l'absence de dégradation des cyclines est également observée et l'activité CSF est maintenue à un taux élevé (Sagata et coll., 1989). p39^{Mos} pourrait provoquer l'arrêt métaphasique en maintenant l'activité MPF par inhibition de la dégradation des cyclines. p39^{Mos} phosphoryle *in vitro* la cycline B2 (Roy et coll., 1990). Cependant, l'expression ectopique de p39^{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 p39^{Mos} n'est pas directe. L'inhibition de la protéolyse de la cycline B par la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} est relayée par l'activation d'un inhibiteur de l'APC (Vorlaufer et Peters, 1998). MAP kinase ne semble pas inactiver la voie de dégradation des cyclines mais préviendrait la promotion de cette dégradation par le MPF (Abrieu et coll., 1996; Abrieu et coll., 2001).

Outre son implication dans l'activité CSF, p39^{Mos} stimule la synthèse des cyclines B1 (Ballantyne et coll., 1997; de Moor et Richter, 1997) : les ARNm de la cycline B1 contiennent dans leur UTR3' une séquence de type MRE (Mos response element : de Moor et Richter, 1997). L'inhibition de l'activité des MEK par le PD98059 n'a pas d'effet sur la polyadénylation des ARNm de la cycline B1 (Howard et coll., 1999) ce qui suggère que la synthèse des cyclines B1 peut être stimulée par une voie indépendante des MAP kinases.

Dans des conditions physiologiques, la levée du blocage métaphasique dépend de l'augmentation du calcium intracellulaire et de la CaMKII (calcium/calmoduline dépendante kinase II) qui entraînent une dégradation complète et rapide des cyclines et la séparation des chromatides sœurs (Lorca et coll., 1991; Lorca et coll., 1993;

Morin et coll., 1994). Plx1 pourrait intervenir dans ce processus (Descombes et Nigg, 1998). La protéolyse de p39^{Mos} et la déphosphorylation de Xp42^{Mpk1} ont lieu 30 à 40 minutes après la fécondation (Ferrell et coll., 1991; Posada et coll., 1991; Watanabe et coll., 1991; Hartley et coll., 1994; Roy et coll., 1996). La levée du blocage métaphasique se fait donc en dépit d'une activité MAP kinase élevée. Même si la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} 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 Xp42^{Mpk1} soit inactivée (Abrieu et coll., 1996). L'inactivation de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} n'est donc pas requise pour la dégradation de la cycline B lors de la levée du blocage métaphasique. L'activation, puis l'inactivation de Xp42^{Mpk1} interviendraient en outre dans la régulation de la durée du premier cycle cellulaire (Walter et coll., 2000).

2.2. Régulation du point d'assemblage du fuseau et relations avec les microtubules

Les études réalisées dans les ovocytes de mammifères, suggèrent l'implication de la voie MEK-ERK dans le contrôle de la formation et de la stabilité du fuseau. Dans les ovocytes de porc et de souris, MAP kinase est localisée au fuseau de métaphase et migre vers le milieu du fuseau durant la transition métaphase/anaphase (Lee et coll., 2000; Hatch et Capco, 2001). p90^{Rsk} suit le même profil de localisation (Fan et coll., 2003). Dans des ovocytes de souris, l'inhibition de Mos par injection d'oligonucléotides antisens (Paules et coll., 1989) ou d'anticorps (Zhao et coll., 1991) bloque l'expulsion du premier globule polaire. L'injection d'un anticorps dirigé contre Mos empêche la formation du fuseau méiotique (Zhao et coll., 1991). Pourtant, des ovocytes de souris dont l'activité MAP kinase est inhibée par mutation des deux allèles du gène codant Mos peuvent se diviser et expulser le premier globule polaire, même si ce dernier est anormalement grand (Verlhac et coll., 2000a). Des ovocytes provenant de souris nullizygote Mos^{-/-} montrent des altérations microtubulaires et chromatiniennes. Le réseau microtubulaire prophasique se maintient au cours de la métaphase I. Des réseaux microtubulaires astraux persistants pourraient être responsables de la mauvaise association du fuseau méiotique à la membrane (Araki

et coll., 1996; Choi et coll., 1996). Une autre étude a montré que de nombreux ovocytes $Mos^{-/-}$ présentent des anomalies de répartitions des chromosomes sur la plaque équatoriale du fuseau ainsi qu'une condensation plus faible de la chromatine (Araki et coll., 1996). Dans une troisième étude, les microtubules et la chromatine prennent un aspect interphasique entre la métaphase I et la métaphase II dans les ovocytes $Mos^{-/-}$ contrairement aux ovocytes témoins dans lesquels l'organisation microtubulaire et la condensation des chromosomes restent stables entre les deux divisions méiotiques (Verlhac et coll., 1996). Une protéine récemment isolée, MISS (MAP kinase-interacting and spindle-stabilizing protein) est impliquée dans la stabilité et l'intégrité du fuseau de métaphase II (Lefebvre et coll., 2002). L'inhibition de sa synthèse entraîne la perte de l'organisation bipolaire du fuseau de métaphase II et l'apparition de nombreux asters dans le cytoplasme. MISS est un substrat de la voie Mos/MAP kinase et possède 4 sites potentiels de phosphorylation par ERK ainsi que la séquence consensus de reconnaissance par ERK (Docking site : Lefebvre et coll., 2002). L'injection d'ARNm codant Mkp1 dans des ovocytes bovins conduit à une désorganisation du fuseau et de l'alignement des chromosomes ainsi qu'à une activation parthénogénétique des ovocytes (Gordo et coll., 2001). Enfin, la surexpression de Mos dans des cellules somatiques entraîne des aberrations chromosomiques résultant de l'altération du fuseau mitotique et de la binucléation des cellules, voire un arrêt du cycle cellulaire (Fukasawa et Vande Woude, 1995; 1997).

Les études concernant MAP kinases et fuseau de division sont beaucoup moins abondantes dans les modèles amphibiens. Chez le xénope, l'inhibition de la voie de $Xp42^{Mpk1}$ induit la formation de fuseaux monopolaires dans des extraits ovocytaires (Horne et Guadagno, 2003). Aucune structure microtubulaire organisée n'est observée à la membrane d'ovocytes traités par U0126 (Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002b; Horne et Guadagno, 2003) ou injectés d'oligonucléotides Morpholinos antisens de $p39^{Mos}$ (Dupre et coll., 2002a). Chez *Rana japonica*, l'inhibition de MEK par U0126 ne permet pas l'organisation d'un MTOC à la base de la VG. Les chromosomes ne se condensent que partiellement et aucun fuseau

bipolaire ne s'organise. Entre 9 et 12 heures après la GVBD, les chromosomes se décondensent, une enveloppe nucléaire se reforme et l'ADN est répliqué. 15 à 18 heures après la GVBD, les chromosomes se recondensent partiellement mais aucun fuseau ne se forme (Kotani et Yamashita, 2002). L'injection de p39^{Mos} dans les ovocytes de *R.japonica* induit l'activation de MAP kinase et non du MPF : la GVBD ne se produit pas (Yoshida et coll., 2000). Les chromosomes se condensent partiellement et le réseau microtubulaire entourant la vésicule germinative se réorganise à la façon d'un TMA (Kotani et Yamashita, 2002).

La voie ERK régule le point de contrôle d'assemblage du fuseau (Spindle Checkpoint) qui inhibe la sortie de phase M jusqu'à l'attachement complet des chromosomes au fuseau (Wells et Murray, 1996). Au cours de ce processus, certaines protéines s'associent aux kinétochores lors de la métaphase (Chen et coll., 1996; Li et Benezra, 1996; Taylor et McKeon, 1997; Taylor et coll., 1998). Le point de contrôle du fuseau régule l'activité de l'APC en inactivant p55^{Cdc20} et Cdh1 (Li et coll., 1997; Fang et coll., 1998a; Gorbsky et coll., 1998; Kallio et coll., 1998; Kim et coll., 1998; Alexandru et coll., 1999; Fesquet et coll., 1999; Fraschini et coll., 1999). Bub1, une des protéines impliquée dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau, est phosphorylée et activée par p90^{Rsk} (Schwab et coll., 2001). Elle s'associe aux kinétochores avant l'alignement des chromosomes (Taylor et McKeon, 1997; Taylor et coll., 1998) et elle est capable de supprimer l'activité de l'APC induite par p55^{Cdc20} (Alexandru et coll., 1999).

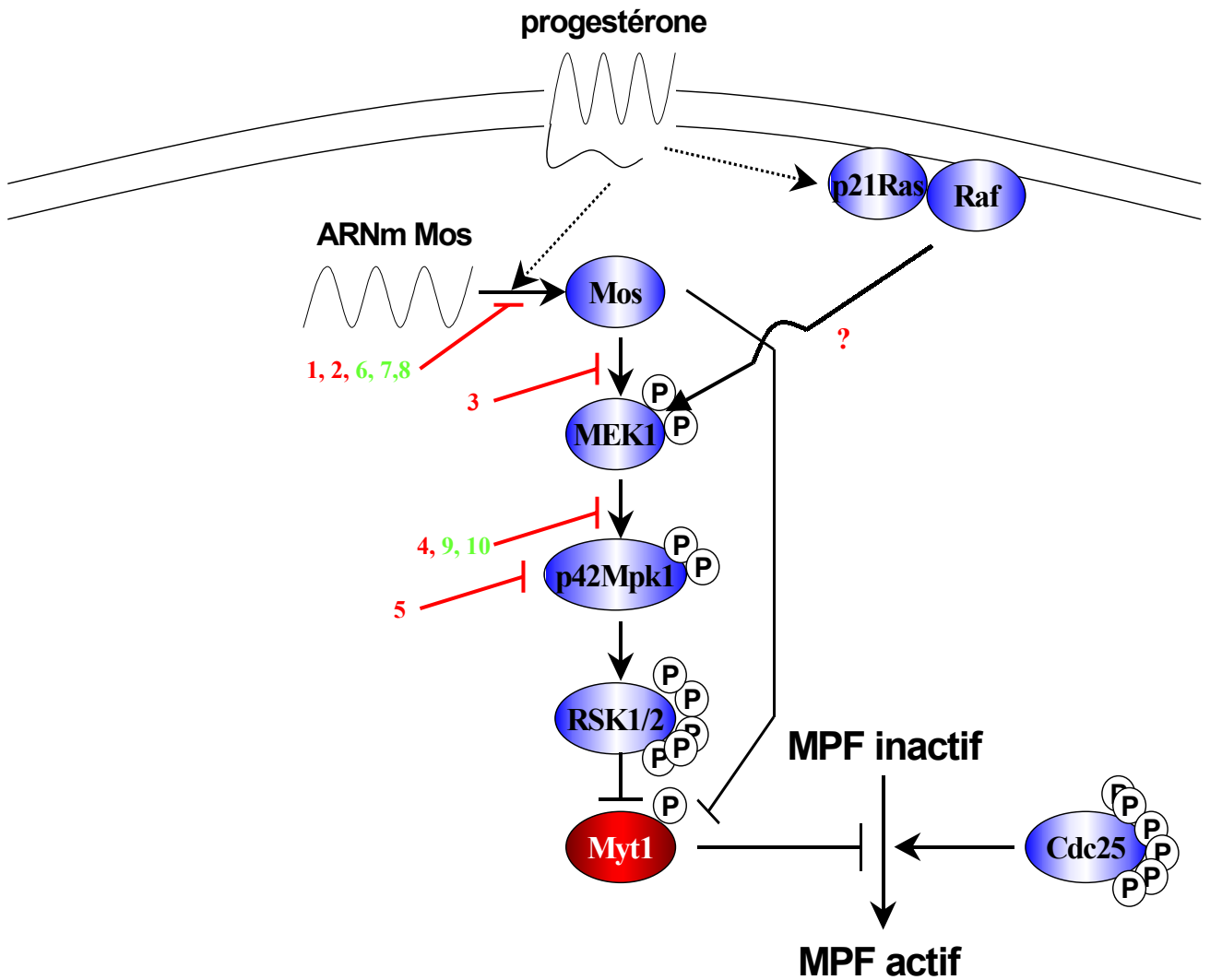
2.3. Relations entre voie JNK et apoptose et voie JNK

Jnk 1 et 2 sont impliquées dans l'apoptose déclenchée par les UV dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Tournier et coll., 2000). Jnk3 est responsable de la mort cellulaire des neurones de l'hippocampe de souris soumis à l'excitoxine (Yang et coll., 1997). Au contraire, dans des cellules souches embryonnaires de souris, Jnk inhibe l'apoptose (Yujiri et coll., 1998).

Certains ovocytes peuvent subir une lyse lors de leur conservation en culture. Dans ces ovocytes apparaît une activité JNK basale absente des ovocytes « sains ».

L'activité des JNK pourrait être responsable d'une mort cellulaire des ovocytes (Bagowski et coll., 2001b).

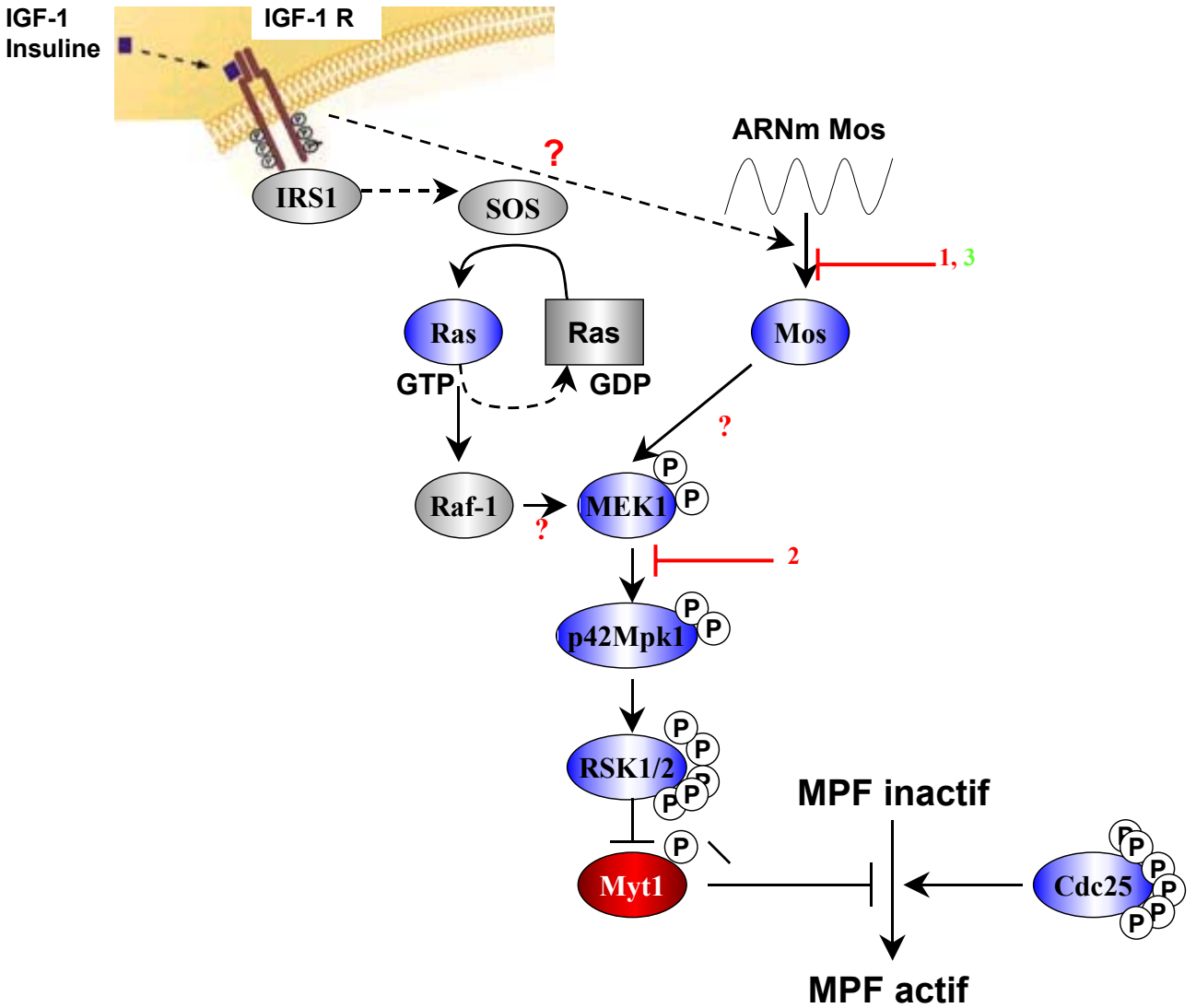
Résultats



- 1 Oligonucléotides morpholinos antisens (MAS), publication 1, pp. 87-89
- 2 Oligonucléotides phosphorothioates antisens (PSAS), publication 1 et 2, pp. 87-89 ; 92-93
- 3 Geldanamycine, premiers résultats, pp. 79-81
- 4 U0126, publication 1 et 2, pp. 86-89 ; 92
- 5 ARNm MKP3, premiers résultats, pp. 81-93
- 6 MAS + Mu-Mos, publication 1, pp. 87-89
- 7 PSAS + Mu-Mos, publication 1 et 2, pp. 87-89 ; 92-93
- 8 PSAS + CA-Rsk, publication 1, pp. 92-93
- 9 U0126 + Mu-Mos, publication 1, pp. 86-89
- 10 U0126 + CA-Rsk, publication 1, pp. 86-89

Figure 20 : Stratégies mises en œuvre pour étudier la voie MAP kinase lors d'une stimulation par la progestérone

- 1 Inhibition
- 6 Inhibition et restauration



- 1 Oligonucléotides phosphorothioates antisens (PSAS), publication 2, pp. 92-93
- 2 U0126, publication 2, pp. 92-93
- 3 PSAS + Mu-Mos, publication 2, pp. 92-93

Figure 21 : Stratégies mises en œuvre pour étudier la voie MAP kinase lors d'une stimulation par l'insuline

- 1 Inhibition
- 3 Inhibition et restauration

Objectifs généraux

La simultanéité d'activation du MPF et de la voie MAP kinase a longtemps constitué le principal obstacle à l'étude des rôles respectifs de ces deux voies lors de la reprise méiotique des ovocytes de xénope. Certaines expériences démontrent que l'activation de la voie MAP kinase est nécessaire à la GVBD. L'inhibition de la synthèse et de l'accumulation de p39^{Mos} au moyen d'oligonucléotides phosphodiester antisens empêche totalement la GVBD induite par la progestérone ou l'insuline (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990). La toxine du facteur létal de l'anthrax, qui clive sans spécificité toutes les MEK, bloque, elle aussi, la maturation (Duesbery et coll., 1998; Bodart et coll., 2002b). Plus en aval de la voie MAP kinase, l'injection d'ARNm codant Mkp1, une phosphatase des MAP kinase, empêche la GVBD en présence de progestérone (Gotoh et coll., 1995; Howard et coll., 1999). D'autres travaux démontrent, au contraire, que la GVBD est simplement retardée et non inhibée en bloquant la voie MAP kinase des ovocytes stimulés par la progestérone. La geldanamycine, inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90, empêche l'activation de la voie MAP kinase et retarde l'activation du MPF ainsi que la GVBD (Fisher et coll., 1999a). Ces résultats ont été confirmés en U0126, inhibiteur de Mek1 et Mek2 (MAPK kinase spécifiques de la phosphorylation des MAP kinases de la famille Erk) (Gross et coll., 2000). L'injection d'oligonucléotides antisens de type Morpholino bloquant la synthèse de p39^{Mos}, retarde la GVBD sans jamais l'inhiber (Dupre et coll., 2002a). Enfin, l'injection d'ARNm codant la phosphatase Mkp3 donnent des résultats similaires (Fisher et coll., 1999a).

Au cours de la maturation des ovocytes de xénope, deux MAPKK kinases sont activées : p39^{Mos} et Raf. L'inhibition de chacune d'entre elles bloque l'activation de Xp42^{Mpk1} (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990; Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b). Les premiers travaux ont montré que Raf agit en aval de p39^{Mos} dans l'activation de Xp42^{Mpk1}, que les ovocytes soient stimulés par la progestérone ou

l'insuline (Fabian et coll., 1993b). Par contre, l'injection d'une forme dominant négatif de Raf ne bloque pas l'activation *in vitro* de Xp42^{Mpk1} par p39^{Mos} (Shibuya et coll., 1996). Dans les cellules somatiques, la stimulation par l'insuline des voies Ras-dépendantes active les MAP kinases de type Erk par l'intermédiaire de Raf. Il a été supposé que ces mêmes voies activent Xp42^{Mpk1} de manière analogue dans les ovocytes de xénope. Des travaux plus récents démontrent clairement que p39^{Mos} est la MAPKK kinase responsable de l'activation de Xp42^{Mpk1} lorsque les ovocytes sont stimulés par la progestérone (Dupre et coll., 2002a).

Dans les ovocytes de mammifères et d'amphibiens de nombreuses observations suggèrent que les MAP kinases sont impliquées dans la morphogenèse du fuseau méiotique.

Nous avons vérifié que l'inhibition de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} ne bloque pas la reprise méiotique des ovocytes de xénope. Ce modèle nous a permis d'étudier l'implication de cette cascade dans la morphogenèse du fuseau méiotique grâce à une analyse morphologique, par cytologie classique ou par immunocytologie, des ovocytes traités par différents inhibiteurs de cette voie. Des injections de protéines Mos murine (Mu-Mos) ou Rsk constitutivement active (CA-Rsk) nous ont permis de tester la spécificité de nos stratégies d'inhibition et de déterminer l'importance respective de différents membres de la cascade dans la morphogenèse du fuseau. La reprise méiotique a été stimulée par la progestérone ou par l'insuline. Contre toute attente, nous avons montré que p39^{Mos} est requise pour l'activation de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} par l'insuline. Nous avons étudié les modifications de phosphorylation de Raf et de Mek1 dans ces différentes conditions.

Plusieurs stratégies d'inhibition de la cascade p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} ont été utilisées (Fig. 20 et 21) :

- L'incubation en présence de geldanamycine, inhibiteur de Hsp90, bloque l'activité de p39^{Mos} (Fisher et coll., 1999b; Fisher et coll., 2000).

- Des ARNm codant la phosphatase Mkp3, qui déphosphoryle spécifiquement Xp42^{Mpk1} (Groom et coll., 1996; Muda et coll., 1996; Fisher et coll., 1999a) ont été injectés.
- L'incubation en présence d'U0126 inhibe Mek1 et Mek2 (Favata et coll., 1998).
- L'injection d'oligonucléotides antisens permet d'empêcher l'accumulation de la MAPKK kinase p39^{Mos}.

Premiers résultats :

Effets de la geldanamycine et de l'injection d'ARN messagers codant la phosphatase Mkp3.

Introduction

Dans les cellules NIH3T3, l'expression d'une forme oncogénique de Ras génère des aberrations chromosomiques (van den Berg et coll., 1991; Denko et coll., 1994) qui conduisent à une ségrégation impropre des chromosomes et à leur exclusion des noyaux fils (Hagag et coll., 1990; Denko et coll., 1995). L'instabilité chromosomique provoquée par l'expression de Ras ou de Mos oncogénique est relayée par la voie MEK/ERK (Saavedra et coll., 1999). Cette voie MAP kinase est donc impliquée dans la transmission du patrimoine génétique. Dans les ovocytes de souris et de porc, MAP kinase est colocalisée au niveau du fuseau de métaphase et migre vers le milieu du fuseau durant la transition anaphase/télophase (Lee et coll., 2000; Hatch et Capco, 2001). Les ovocytes de souris injectés d'un anticorps anti-Mos n'assemblent pas de fuseau méiotique (Zhao et coll., 1991). La voie MAP kinase serait impliquée dans l'organisation du fuseau méiotique et la condensation des chromosomes (Zhao et coll., 1991; Araki et coll., 1996; Choi et coll., 1996; Verlhac et coll., 1996). Sans activité MAP kinase, les ovocytes de souris sont encore capables de se diviser et expulsent un premier globule polaire anormalement grand (Choi et coll., 1996; Verlhac et coll., 1996).

Des travaux récents montrent que la méiose peut être déclenchée sans activité MAP kinase. La geldanamycine est un inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90. Son utilisation dans les ovocytes de xénope entraîne l'inhibition de la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et retarde l'activation du MPF et la GVBD, sans toutefois les bloquer (Fisher et coll., 1999a). Des travaux ont établi que Hsp90 est nécessaire à l'activité de p39^{Mos} (Fisher et coll., 2000). De même, l'injection d'ARNm codant la phosphatase Pyst1/Mkp3 retarde la GVBD déclenchée par la progestérone (Fisher et coll., 1999a). Les MAP kinases de type Erk constituent le substrat préférentiel de Mkp3 (Groom et coll., 1996; Muda et coll., 1996). Les travaux de Fisher et collaborateurs (Fisher et coll., 1999a) ont montré que la geldanamycine ou l'injection d'ARNm codant Mkp3 déclenche la reprise méiotique des ovocytes de xénope en absence d'activité de Xp42^{Mpk1}.

Progesterone	-	+	+	+	+
DMSO (%)	-	1	0.2	0.5	1
Geldanamycine (μM)	-	-	0.1	0.25	0.5

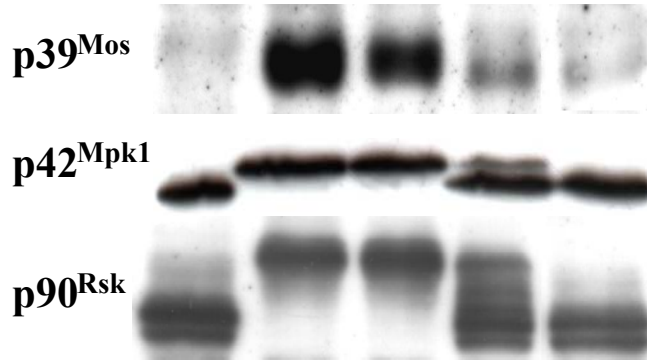


Figure 22 : Effets de doses croissantes de geldanamycine sur l'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} lors d'une stimulation par la progestérone

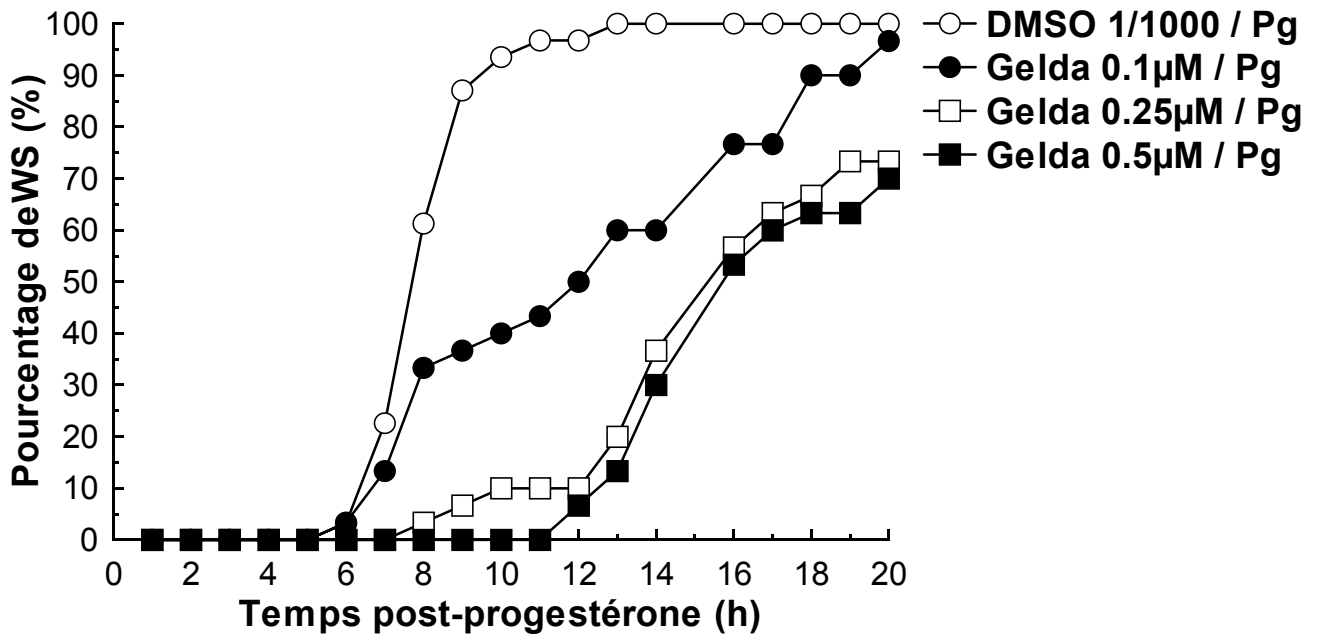


Figure 23 : Effets de doses croissantes de geldanamycine sur la cinétique de la maturation induite par la progestérone

Nous avons utilisé ces deux stratégies d'inhibition pour étudier la morphogenèse du fuseau dans des ovocytes dont la reprise méiotique déclenchée par la progestérone se déroule en absence d'activité Xp42^{Mpk1}. Les ARNm de Mkp3 nous ont été fourni par le Dr. G. Pages de l'université de Nice (Brunet et coll., 1999).

Résultats et discussion

1. Effets de la geldanamycine sur la maturation induite par la progestérone

Les ovocytes sont préincubés pendant une heure en présence de geldanamycine 0,1 ; 0,25 ; 0,5 μ M ou en présence de DMSO 1/1000 (solvant). La progestérone (10 μ M) est ensuite ajoutée au milieu. Les états de phosphorylations de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk} sont appréhendés par observation des changements de leurs mobilités électrophorétiques sur immunoempreinte. Dans des ovocytes immatures, Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} sont déphosphorylées et se présentent chacune sous la forme d'une bande basse (Fig. 22, premier puits). Dans des ovocytes matures, Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} sont phosphorylées et apparaissent chacune sous forme d'une bande haute (Fig. 22, second puits). p90^{Rsk} étant un des principaux substrats de Xp42^{Mpk1} (Gross et coll., 2000), l'absence de phosphorylation de p90^{Rsk} témoigne de l'inactivité de Xp42^{Mpk1}. L'activation de Xp42^{Mpk1} et l'hyperphosphorylation de p90^{Rsk} sont inhibées par la geldanamycine de façon dose-dépendante : l'inhibition est totale à la concentration de 0,5 μ M (Fig. 22). Aux doses utilisées, la geldanamycine diminue l'accumulation de p39^{Mos} sans jamais la supprimer. La perte du rétrocontrôle positif exercé par la voie MAP kinase sur l'accumulation de p39^{Mos} (Howard et coll., 1999) pourrait en être la cause. Une voie dépendante du MPF permettrait l'accumulation de p39^{Mos} en absence d'activité de Xp42^{Mpk1} après traitement des ovocytes par la geldanamycine (Fisher et coll., 1999a ; nos résultats) ou par U0126 (Gross et coll., 2000).

Dans nos conditions expérimentales, la geldanamycine ne bloque jamais mais retarde de manière significative la GVBD déclenchée par la progestérone (Fig. 23).

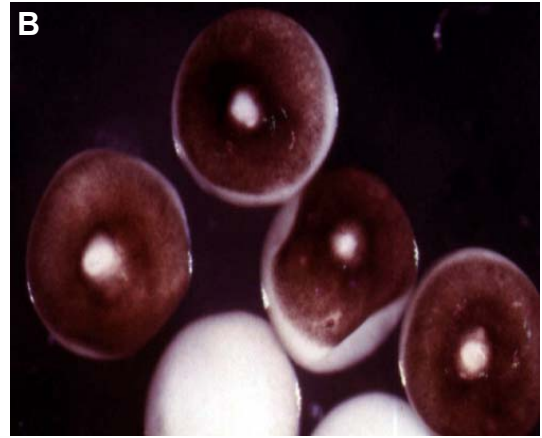
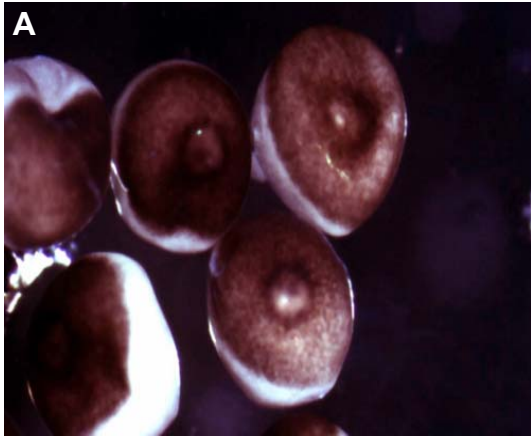


Figure 24 : Aspect des taches de maturation :

A lors d'une stimulation par la progestérone en présence de 1/1000 DMSO.

B lors d'une stimulation par la progestérone en présence de geldanamycine.

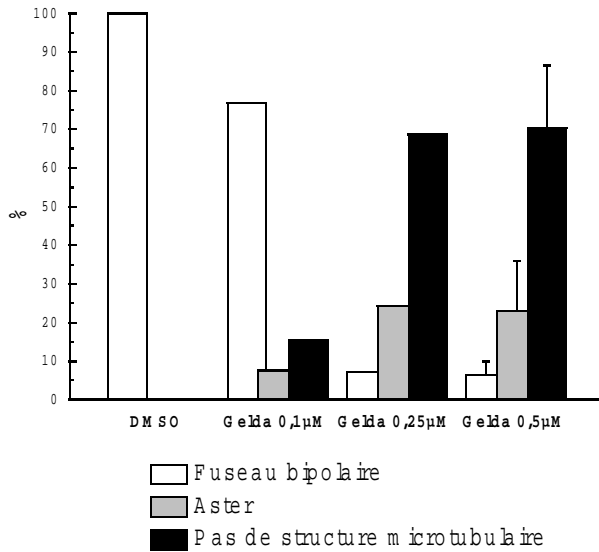


Figure 25 : Influence de doses croissantes de geldanamycine sur la morphogenèse du fuseau

	DMSO/Pg	Geld 0.1µM/Pg	Geld 0.25µM/Pg	Gelda 0.5µM/Pg
Nombre d'ovocytes (nombre de femelles)	39 (4)	25 (2)	12 (2)	30 (3)
Fuseau bipolaire (%) ± SEM	100 ± 0	76,9	7,1	6,5 ± 3,3
Aster (%) ± SEM	0	7,7	24,3	23,1 ± 12,9
Pas de structure (%) ± SEM	0	15,4	68,6	70,4 ± 16,1

Tableau 4 : Influence de doses croissantes de geldanamycine sur la morphogenèse du fuseau

L'application de geldanamycine provoque cependant une diminution conséquente du pourcentage de GVBD. En effet, le pourcentage de tache de maturation observé en présence de DMSO 1/1000 est de $95,0\% \pm 3,6$ ($n=3^1$). Ce pourcentage est réduit à $74,5\% \pm 11,4$ ($n=3$) dès que la concentration de geldanamycine est de $0,1 \mu\text{M}$ et chute à $52,5\% \pm 15,2$ ($n=3$) et $54,3\% \pm 15,8$ ($n=3$) pour des concentrations respectives de geldanamycine de $0,25$ et $0,5 \mu\text{M}$ après 20 heures de stimulation par la progestérone. Les résultats obtenus avec les trois gammes réalisées étant hétérogènes en fonction des animaux, il n'est pas possible d'effectuer une étude de la significativité. La différence de pourcentage de tache de maturation entre les ovocytes traités par le DMSO seul et par la geldanamycine à $0,1 \mu\text{M}$ suggère que les effets de la geldanamycine ne seraient pas spécifiques à cette concentration. $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ n'est pas inhibée à la concentration de $0,1 \mu\text{M}$.

La valeur de GVBD_{50} (temps nécessaire pour que 50% des ovocytes réalisent la GVBD) des ovocytes traités par la geldanamycine $0,1 \mu\text{M}$ n'est que de $1,2 \pm 0,2$ fois celle des ovocytes témoins traités par le DMSO. En geldanamycine $0,25$ et $0,5 \mu\text{M}$, les valeurs de GVBD_{50} sont multipliées respectivement par $2,3$ ($n=2$; le troisième lot n'a pas atteint 50 %) et par $2,1$ ($n=2$) par rapport à la GVBD_{50} des ovocytes témoins. Les résultats obtenus en geldanamycine $0,5 \mu\text{M}$ sont comparables à ceux extrapolés des observations de Fisher et collaborateurs (Fisher et coll., 1999a).

Les taches de maturation des ovocytes traités par la geldanamycine apparaissent laiteuses et plus diffuses que celles observées au pôle animal des cellules témoins traités par le DMSO (Fig. 24). Après analyse cytologique, nous avons constaté la disparition progressive du fuseau méiotique en fonction des doses croissantes de geldanamycine. A $0,5 \mu\text{M}$, aucune structure n'est décelable dans la majorité des cas ; des structures microtubulaires de type aster sont néanmoins observées dans $23,1\% \pm 12,9$ des ovocytes traités (Fig. 25 ; Tableau 4).

¹ ($n=x$) indique le nombre d'expériences sur des ovocytes provenant d'animaux différents

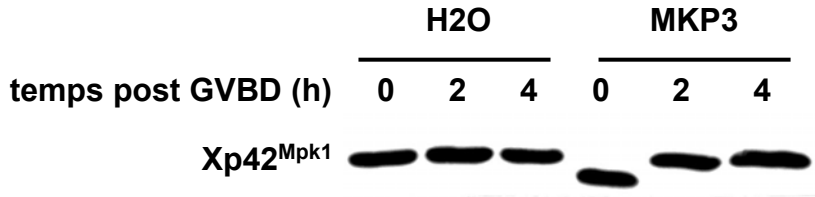


Figure 26 : Effets de l'injection d'ARNm codant MKP3 sur la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} lors d'une stimulation par la progestérone

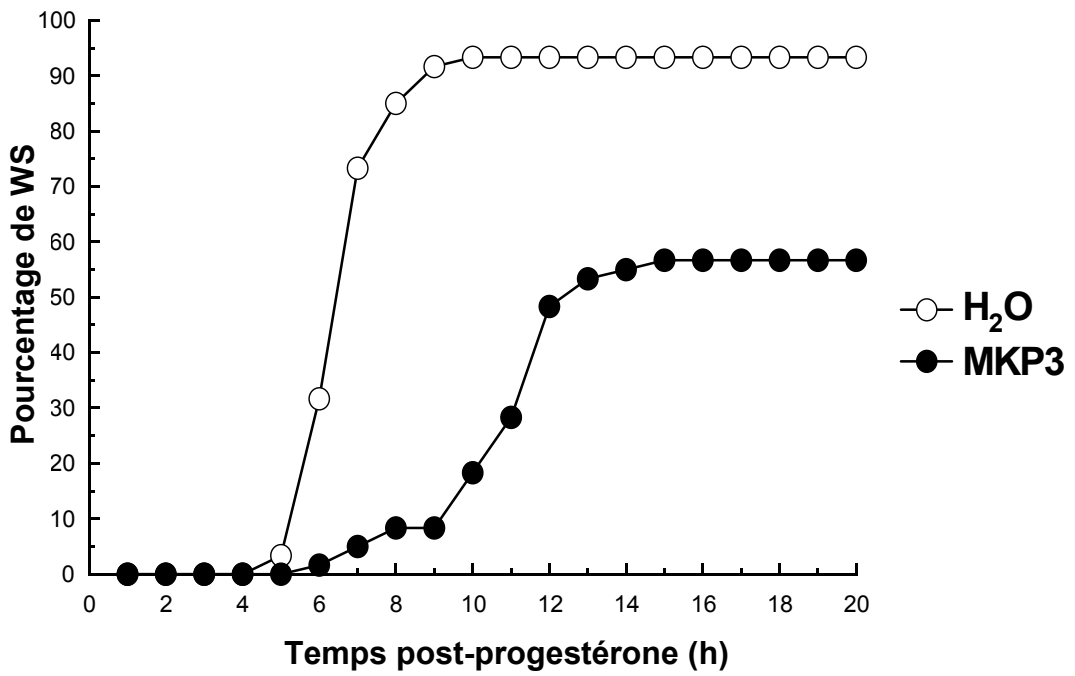


Figure 27 : Effets de l'injection d'ARNm codant MKP3 sur la cinétique de la maturation induite par la progestérone

La geldanamycine a été initialement utilisée dans des lignées somatiques, comme inhibiteur de tyrosine kinases telles que les récepteurs à activité tyrosine kinase p185^{ErbB2} et Abl (Okabe et coll., 1992; Miller et coll., 1994). La geldanamycine entraîne la dégradation spécifique de ces kinases. Puis, il a été montré que la principale cible de la geldanamycine est la protéine chaperonne Hsp90 (Neckers et coll., 1999). La geldanamycine se lie avec Hsp90 au niveau de la poche de liaison ADP/ATP et entraîne la perte de fonction de la protéine chaperonne (Stebbins et coll., 1997). Hsp90 met en conformation ses protéines cibles pour en favoriser la stabilité. Pour certaines protéines, la geldanamycine inhibe cette mise en conformation, ce qui conduit à leur protéolyse (Schulte et coll., 1997). C'est le cas de Raf-1 et de PKB/Akt humaines (Stancato et coll., 1993; Wartmann et Davis, 1994; Schulte et coll., 1997; Sato et coll., 2000) ainsi que de la kinase Polo de Drosophile (de Carcer et coll., 2001). Dans les ovocytes de xénope, la geldanamycine empêche l'activité de p39^{Mos}. Selon les travaux considérés, Hsp90 serait requise pour l'activation et la phosphorylation de p39^{Mos} mais n'aurait aucun effet sur la stabilisation de l'oncoprotéine (Fisher et coll., 2000).

Dans la mesure où Raf-1, PKB/Akt et Plx1 sont également impliquées dans la reprise méiotique chez le xénope, la geldanamycine pourrait agir sur des voies autres que celle de p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}.

2. Effets de l'injection d'ARNm codant Mkp3 sur la maturation induite par la progestérone

Afin d'inhiber Xp42^{Mpk1} de manière plus spécifique, 20 ng d'ARNm codant Mkp3 ont été injectés dans les ovocytes, une heure avant l'incubation en progestérone. Le faible rendement de production d'ARNm de Mkp3 à partir de nos plasmides nous a empêché de suivre l'évolution biochimique des ovocytes toutes les heures. Des lots de cinq ovocytes ont été récupérés au moment de l'apparition de la tache de maturation, deux heures ou quatre heures après. L'analyse par immunoempreinte montre que Xp42^{Mpk1} est phosphorylée au moment de la GVBD (n=2) ou après la GVBD (n=1) (Fig. 26). Nous avons utilisé un anticorps anti-Myc (Réf. M5546, Sigma)

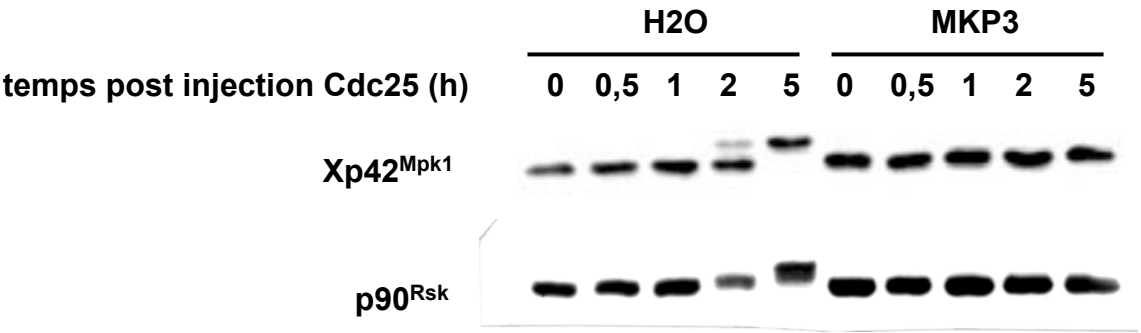


Figure 28 : Effets de l'injection d'ARNm codant MKP3 sur la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk} lors d'une stimulation par injection de Cdc25

afin de contrôler la synthèse et la stabilité de MKP3 dans les ovocytes. Les protéines Mkp3 codées par les ARNm injectés portent un TAG Myc. Malheureusement, cet anticorps ne nous n'a jamais permis de détecter la présence de MKP3 sur immunoempreinte. La stabilité des ARNm dans les ovocytes n'a pas encore été vérifiée. Nous ne disposons donc d'aucune preuve de la synthèse et de la stabilité de la protéine Mkp3 et de son ARNm dans les ovocytes. Le seul effet observé des injections d'ARNm de Mkp3 est un retard de GVBD (Fig. 27) : la valeur de GVBD₅₀ des ovocytes injectés d'ARNm est de $1,6 \pm 0,2$ fois celle des ovocytes témoins injectés d'eau (n=3). Les analyses cytologiques réalisées après la GVBD ne montrent aucune différence entre les ovocytes injectés d'ARNm et les ovocytes témoins. Dans les deux cas, le fuseau méiotique se forme normalement. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} est observée dans ces ovocytes.

Dans une expérience qui n'a été réalisée qu'une seule fois, nous avons injecté les ARNm codant Mkp3 et nous avons stimulé la GVBD par injection de Cdc25 active. Les ovocytes ont été injectés avec les ARNm douze heures avant l'injection de Cdc25. Dans les ovocytes témoins injectés d'eau, Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} sont partiellement phosphorylées quatre heures après la deuxième injection et complètement phosphorylées après cinq heures. Dans les ovocytes injectés d'ARNm codant Mkp3, Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} ont été observées sous formes déphosphorylées le temps de nos observations (Fig. 28). Les ovocytes traités et témoins présentent des taux de GVBD de 100 % deux heures après l'injection de Cdc25. Dans cette unique expérience, la protéine Mkp3 était donc active dans les ovocytes 17 heures après l'injection des ARNm. Si ce résultat était confirmé, il suggérerait que les mécanismes régulant la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} sont différents entre une stimulation par la progestérone et une stimulation par injection de Cdc25 active. Lorsque la reprise méiotique est déclenchée par le FGF via l'expression de FGFR dans des ovocytes préalablement injectés (huit heures) des mêmes ARNm MKP3, la GVBD et la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} ne sont pas observées, même quinze heures après la stimulation (Browaey-Poly et coll., 2004).

Des travaux ont montré que l'injection d'ARNm codant Mkp3 retarde la GVBD sans la bloquer. Xp42^{Mpk1} n'est pas phosphorylée dans les ovocytes récupérés au temps GVBD (Fisher et coll., 1999a). Dans nos conditions, l'injection des ARNm entraîne un retard de la reprise méiotique mais Xp42^{Mpk1} ne peut être maintenue déphosphorylée de manière stable après la GVBD. Dans les ovocytes de souris, la protéine Mos est requise pour la phosphorylation de Mek mais aussi pour désactiver une phosphatase de MAP kinase (Verlhac et coll., 2000b). Un mécanisme analogue de régulation négative des MKP indépendamment du MPF pourrait exister dans les ovocytes de xénope. Cependant, les expériences d'expression de la phosphatase Mkp1/CL100 ont conduit à une inactivation durable de Xp42^{Mpk1} et à l'absence de GVBD lors d'une stimulation par la progestérone (Gotoh et coll., 1995; Howard et coll., 1999).

Les problèmes de spécificité posés par la geldanamycine et les difficultés inattendues de l'utilisation des ARNm de Mkp3 nous ont conduit à abandonner ces deux stratégies et à privilégier d'autres approches d'inhibition de Xp42^{Mpk1}. Des résultats publiés pendant notre travail ont rapporté que U0126, inhibiteur biochimique spécifique de Mek 1 et 2 (Gross et coll., 2000) et que l'injection d'oligonucléotides antisens de p39^{Mos} de type Morpholino (Dupre et coll., 2002a) bloque l'activation de Xp42^{Mpk1} et retarde la GVBD sans jamais l'inhiber. Nous avons de ce fait utilisé ces nouveaux outils pour étudier la morphogénèse du fuseau : U0126 et injection d'oligonucléotides Morpholino antisens de p39^{Mos} ainsi que d'oligonucléotides antisens de p39^{Mos} de type phosphorothioates.

Publication 1 :

Differential roles of p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes.

Article en préparation

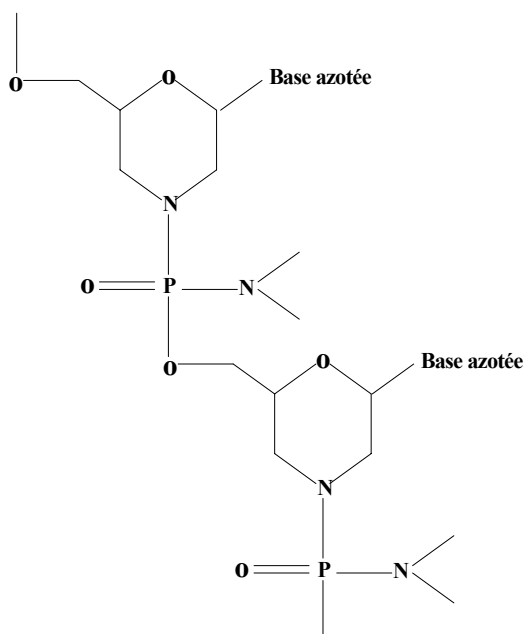
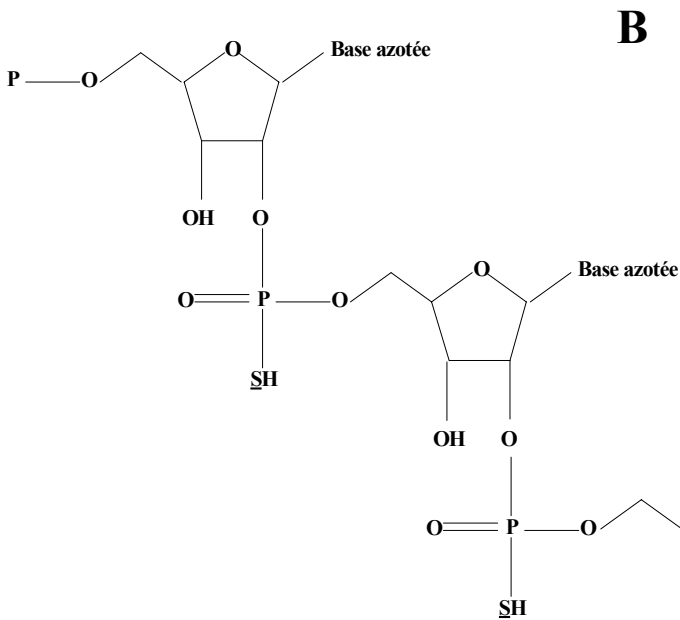
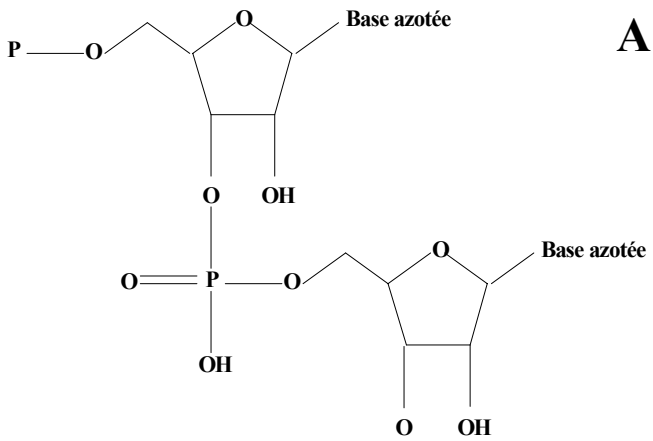


Figure 29 : Structures :

A : d'un oligonucléotide phosphodiester,
B : d'un oligonucléotide phosphorothioate,
C : d'un oligonucléotide Morpholino.

Introduction

La progestérone stimule la reprise de la méiose indépendamment de l'activité de p21^{Ras} (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). La MAPKK kinase Raf est phosphorylée et activée au cours de la maturation (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b). La cascade qui mène à la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} dépend essentiellement de la synthèse et de l'accumulation de p39^{Mos} (Sagata et coll., 1988; Dupre et coll., 2002a). L'injection d'oligonucléotides phosphodiester antisens, qui préviennent la synthèse de p39^{Mos}, bloque totalement l'activation de Xp42^{Mpk1} et la GVBD (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990). Des travaux récents ont remis en question la spécificité de cet outil : l'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} par injection d'oligonucléotides antisens Morpholino empêche l'activation de Xp42^{Mpk1} et retarde la GVBD (Dupre et coll., 2002a). Ce même résultat a été obtenu en inhibant Mek1 par U0126 (Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002b).

Lorsque la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} n'est pas active, aucun fuseau méiotique n'est observé à la membrane, les ovocytes n'entrent pas en deuxième division méiotique, les chromosomes se décondensent et l'ADN est répliqué (Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002b; Dupre et coll., 2002a). L'incubation des ovocytes de *Rana japonica* en présence d'U0126 altère la formation du fuseau et la condensation des chromosomes lors de la reprise méiotique en présence de progestérone. Une enveloppe nucléaire se reforme neuf à douze heures après la GVBD et l'ADN est répliqué (Kotani et Yamashita, 2002).

Nous avons complété notre étude de l'implication de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la morphogenèse du fuseau en utilisant des stratégies d'inhibition par U0126 ou par oligonucléotides antisens de p39^{Mos} de type Morpholino ou phosphodiester. Nous les avons couplées à des expériences de restauration par différents membres de la cascade. Ces approches nous ont permis de préciser le rôle de certains modules de cette cascade dans la formation du fuseau méiotique. Nous discutons également des implications respectives de p39^{Mos} et de Raf dans la

phosphorylation de Mek1 et de l'implication de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la phosphorylation de Raf.

Les oligonucléotides que nous avons employés portent des modifications de types phosphorothioate ou Morpholino (Fig. 29). Ces modifications leur confèrent une plus grande stabilité et une plus grande spécificité en comparaison des oligonucléotides phosphodiester classiques. Si l'utilisation d'oligonucléotides de type Morpholino est déjà décrite dans l'ovocyte de xénope (Dupre et coll., 2002a), ceux de type phosphorothioates présentent un avantage économique. Les expériences de restauration du fuseau méiotique ont été réalisées par injection des protéines Mos murine (Mu-Mos) ou Rsk constitutivement active (CA-Rsk).

Résultats et discussion

Les effets de U0126 ont été analysés sur des ovocytes stimulés par la progestérone. Des doses croissantes d'U0126 jusqu'à 100µM n'inhibent jamais la maturation. Par rapport aux témoins incubés en présence de DMSO 1%, U0126 retarde la GVBD de manière fortement significative ($p < 0,001$)¹ dès la concentration 10µM. Aux concentrations de 10, 25 et 50µM, le retard est significativement dose-dépendant ($p < 0,05$)². U0126 bloque partiellement l'activation de Xp42^{Mpk1} à 10µM et totalement dès 25µM (Publication 1, Fig. 1B). Nous avons ainsi vérifié la concentration optimale de U0126 permettant d'inhiber complètement et sûrement Xp42^{Mpk1}. Dans toutes nos expériences, les ovocytes ont été incubés en présence de U0126 50µM (Publication 1, Fig. 1B). A cette concentration, U0126 ne bloque pas la synthèse et l'accumulation de p39^{Mos}. Comme en geldanamycine, nous observons une diminution de l'accumulation de p39^{Mos} par rapport aux ovocytes témoins vraisemblablement provoquée par la perte du rétrocontrôle positif exercé par Xp42^{Mpk1} sur la synthèse de p39^{Mos} (Howard et coll., 1999). Mek1 est toujours phosphorylée (Publication 1, Fig. 1B). U0126 exerce donc son effet d'inhibiteur de

¹ Analyse statistique effectuée par un test Logrank

² Analyse statistique effectuée par un test Logrank

MEK en empêchant son activité sans bloquer son activation. Les immunoempreintes réalisées après maturation montrent un retard de la mobilité électrophorétique de Raf qui témoigne de sa phosphorylation (Publication 1, Fig. 3 ; (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b). En présence de U0126, ce retard est partiellement inhibé sans que le profil ne soit celui observé dans des ovocytes immatures (Publication 1, Fig. 3). Ce résultat suggère que la phosphorylation de Raf est en partie dépendante de l'activité de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}.

Des injections d'oligonucléotides antisens de type Morpholino (p39^{Mos}-MAS) ou phosphorothioate (p39^{Mos}-PSAS) ont été réalisées pour bloquer la synthèse de p39^{Mos}. L'injection de 10 ng de ces deux types d'oligonucléotides une nuit avant la stimulation des ovocytes est suffisante pour bloquer la synthèse et l'accumulation de p39^{Mos} (Publication 1, Fig. 2B). Les injections de p39^{Mos}-MAS n'inhibent pas mais retardent la GVBD en progestérone (Publication 1, Fig. 2A). Ces effets sont spécifiques de l'inhibition de p39^{Mos} et de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} : l'injection de protéine Mu-Mos, avant la stimulation par la progestérone, supprime le retard provoqué par les p39^{Mos}-MAS et accélère la reprise de la méiose en comparaison des ovocytes témoins injectés d'eau ou d'oligonucléotides sens Morpholinos de p39^{Mos} (p39^{Mos}-MS ; Publication 1, Fig. 2A).

L'analyse par immunoempreinte révèle que les injections d'oligonucléotides sens de p39^{Mos} de type Morpholino (p39^{Mos}-MS) ou phosphorothioates (p39^{Mos}-PSS) n'ont pas d'effet sur la synthèse de p39^{Mos} et sur la phosphorylation de Mek1, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk} et Raf pendant la reprise méiotique déclenchée par la progestérone (Publication 1, Fig. 2B, puits 2, 3, 5 et 6). Au contraire, les injections de p39^{Mos}-MAS (Publication 1, Fig. 2B, puits 4) ou de p39^{Mos}-PSAS (Publication 1, Fig. 2B, puits 7) bloquent complètement la synthèse et l'accumulation de p39^{Mos}, l'activation de Xp42^{Mpk1} et la phosphorylation de p90^{Rsk}.

Dans ces mêmes conditions expérimentales, Mek1 n'est pas phosphorylée et la migration électrophorétique de Raf est partiellement inhibée (Publication 1, Fig. 2B). L'isoforme partiellement phosphorylée de Raf ne semble pas correspondre à un état

actif de la protéine qui lui permettrait de phosphoryler et d'activer Mek1. En présence de U0126 50 μ M, le retard de migration électrophorétique de Raf est comparable à celui observé lorsque les ovocytes sont traités par les MAS ou les PSAS. En U0126, Mek1 est phosphorylée (Publication 1, Fig. 2B). Cette phosphorylation peut donc être attribuée aux protéines p39^{Mos} détectées.

L'injection de Mu-Mos dans des ovocytes préalablement traités par les p39^{Mos}-PSAS ne restaure que partiellement l'activation de Xp42^{Mpk1} et l'hyperphosphorylation de p90^{Rsk} (Publication 1, Fig. 2B, puits 8). Par contre, l'injection de Mu-Mos restaure la phosphorylation de Mek1 endogène. La migration électrophorétique de Raf est rétablie : elle est comparable à celle observée dans les ovocytes témoins injectés d'eau ou de p39^{Mos}-PSS. Ce résultat confirme celui obtenu avec U0126 montrant que la phosphorylation complète de Raf est dépendante de l'activité de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk}. Nous avons montré que p39^{Mos} est active dans les ovocytes traités par U0126. p39^{Mos} ne peut donc pas être responsable de la phosphorylation complète de Raf. L'injection de protéine Rsk constitutivement active (CA-Rsk) dans des ovocytes traités par les p39^{Mos}-PSAS ou par U0126 50 μ M est incapable de restaurer des profils électrophorétiques de la cascade p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} et de Raf comparables à ceux des ovocytes témoins matures (Publication 1, Fig. 3, puits 5 et 8). Pourtant cette injection est suffisante pour supprimer les effets morphologiques de U0126 (voir plus loin). La protéine CA-Rsk est donc active dans les ovocytes. La phosphorylation complète de Raf serait donc sous le contrôle direct, soit de Mek1, soit plus vraisemblablement de Xp42^{Mpk1} qui reste le seul substrat connu de Mek1 et 2 (Cowley et coll., 1994; Mansour et coll., 1994). En absence de synthèse de p39^{Mos}, il n'existe aucun rétrocontrôle positif possible vers Mek1 à partir de p90^{Rsk} ou des protéines situées en aval.

En utilisant les mêmes stratégies d'inhibition et de restauration, nous avons testé l'implication des différents modules de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la morphogenèse du fuseau méiotique. Les ovocytes ont été observés en cytologie classique après coloration au rouge nucléaire et picro-indigocarmin. Nous nous sommes assurés de la présence des chromosomes en mettant au point une

technique d'immunocytochimie nous évitant le recours à la microscopie confocale. Après traitement par les inhibiteurs, les ovocytes sont fixés par du méthanol froid et inclus en paraffine. Des coupes semi-fines sont réalisées et marquées par du Hoechst. Les coupes révélant la présence de chromosomes sont mises en présence d'anticorps anti-tubuline et révélées par observation au microscope à fluorescence. Dans les ovocytes stimulés par la progestérone, l'inhibition de la voie MAP kinase par U0126, par injection de p39^{Mos}-MAS ou par injection de p39^{Mos}-PSAS, empêche la bipolarisation du fuseau et provoque l'apparition d'une ou de plusieurs structures microtubulaires de type aster, associées à des chromosomes ayant subi la diacynèse (Publication 1, Fig. 4D, E, I-K, O-Q et R ; Fig. 5 B et J ; Tableau1). Les altérations morphologiques du fuseau méiotique observées dans les ovocytes injectés de p39^{Mos}-PSAS ou de p39^{Mos}-MAS sont corrigées par l'injection de Mu-Mos (Publication 1, Fig. 5C et J ; Tableau1). Ces observations permettent d'établir que la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} est bien impliquée dans l'organisation bipolaire du fuseau. Dans les ovocytes traités par U0126, la présence de p39^{Mos} endogène, suffisante pour phosphoryler Mek1, ou l'injection de Mu-Mos, sont incapables de promouvoir l'organisation du fuseau en absence de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} (Publication 1, Fig. 4R ; Tableau1). La morphogénèse du fuseau méiotique dans les ovocytes traités par U0126 est restaurée par l'injection de CA-Rsk (Publication 1, Fig. 4 R ; Fig. 5 G-I ; Tableau1). p90^{Rsk} est un élément clef de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la formation d'un fuseau bipolaire. Bien que l'injection de CA-Rsk restaure la formation d'un fuseau en présence de U0126, elle en est incapable en absence de p39^{Mos} dans des ovocytes injectés de p39^{Mos}-PSAS (Publication 1 ; Fig. 5D-F et J ; Tableau1). Nos résultats suggèrent que p39^{Mos} ou p90^{Rsk} ne peuvent seules promouvoir l'organisation bipolaire du fuseau de division. En plus de p90^{Rsk} active, l'activité de p39^{Mos} est indispensable à l'établissement de la bipolarité du fuseau méiotique.

Differential roles of p39^{Mos} - Xp42^{Mpk1} cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes.

F. Y. BAERT^{1,2}, J.- F. L. BODART^{1,2,6}, C. SELLIER¹, N. S. DUESBERY³, S. FLAMENT⁵ and J.- P. VILAIN¹

¹ Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France.

² Co-authors

³ Laboratory of Developmental Cell Biology, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan 49503, USA.

⁵ Faculté des Sciences, EA 3442, Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré, entrée 1B, 9^{ème} étage, Boulevard des Aiguillettes, BP239, 54506, Vandoeuvre lez Nancy CEDEX, France.

⁶ Corresponding Author.

Running title : Mos, Xp42^{Mpk1} and spindle formation

Keywords : spindle formation, p39^{Mos}, MAPK, Meiosis, *Xenopus*

Summary

Fully-grown G2-arrested *Xenopus* oocytes resume meiosis upon hormonal stimulation. Resumption of meiosis is accompanied by germinal vesicle breakdown, chromosome condensation and organization of a bipolar spindle. At the molecular level, resumption of meiosis is accompanied by activation of MPF and the p39^{Mos}–MEK1–Xp42^{Mpk1}–p90^{Rsk} pathways. The latter cascade is activated upon p39^{Mos} accumulation. Using U0126, a MEK1 inhibitor, and p39^{Mos} antisense morpholino and phosphorothiate oligonucleotides, we have investigated the role of the members of the p39^{Mos}–MEK1–Xp42^{Mpk1}–p90^{Rsk} in spindle morphogenesis. First, we have observed at a molecular level that prevention of p39^{Mos} accumulation always led to MEK1 phosphorylation defects even though meiosis is stimulated through the insulin Ras-dependent pathway. Moreover we have observed that Raf1 phosphorylation that occurs during meiosis resumption was dependent upon the activity of MEK1 or Xp42^{Mpk1} but not p90^{Rsk}. Second, either p39^{Mos} accumulation prevention or MEK1 inhibition led to the formation of aster-like structure in cytoplasm, associated together with condensed chromosomes. Spindle morphogenesis rescue experiments using constitutively active Rsk and purified murine Mos protein suggested that p39^{Mos} promotes meiotic spindle morphogenesis through two separate pathways. Nevertheless, both proteins are required for bipolar spindle organization at the plasma membrane.

(194 words)

Introduction

Fully-grown *Xenopus laevis* oocytes are arrested at prophase of the first meiotic division. In response to stimulation by steroid hormones, they resume meiosis in a process called maturation. The latter, which is analogous to G2/M transition, is characterized by the move of the nucleus or germinal vesicle (GV) towards the animal pole. As the GV moves towards the cortex, the nuclear envelope breaks down (germinal vesicle breakdown or GVBD), the chromosomes condense and a bipolar spindle forms. Moving of the GV and anchoring of the spindle at the cortex create the appearance of a white spot (WS) at the apex of the oocyte. The first meiotic division is completed after extrusion of the first polar body, while the second division resumes in absence of interphase. Meiotic progression is then blocked at metaphase II in anticipation for fertilization (Hausen and Riebesell, 1991).

The molecular mechanisms underlying the morphogenesis of the first meiotic spindle are poorly characterized. Unlike mitosis, first meiotic spindle formation in *Xenopus* oocytes proceeds in absence of active centrosomes. Indeed, centrosomes are functionally inactivated at earlier stages of oogenesis (Gard et al., 1995).

Cytological events accompanying maturation are correlated to the activation of protein-kinases. Among them, the cytoplasmic M phase promoting factor (MPF) has been shown to be responsible for promotion of G2/M transition. It has been demonstrated to be a universal regulator of entry in meiosis and mitosis. It is a heterodimer made up of two subunits: a catalytic subunit, the kinase p34^{Cdc2/Cdk1} and a regulatory subunit, the cyclin B (For review, see Masui, 2001; Nurse P, 1998).

Simultaneously to MPF activation, the Erk-like Xp42^{Mpk1} (Extracellular Regulated Kinase) is phosphorylated and activated (Ferrell et al., 1991). Xp42^{Mpk1} belongs to the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway that is turned on by the synthesis of p39^{Mos} in response to progesterone stimulation (Sagata et al., 1988; Dupre et al, 2002). Once accumulated, p39^{Mos} activates MEK1 that in turn phosphorylates Xp42^{Mpk1} (Nebreda and Hunt, 1993). Upon its activation, Xp42^{Mpk1} phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (p90^{Rsk}). Accumulation of p39^{Mos} can either be regulated by Xp42^{Mpk1} through the regulation of p39^{Mos} mRNA translation (Howard et al., 1999) or by MPF-dependent mechanisms (Frank-Vaillant et al., 1999). This pathway has been shown to be responsible for S-Phase suppression between MI and MII. Indeed, inhibition of p39^{Mos} synthesis (Furuno et

al., 1994; Dupre et al., 2002), or inhibition of MEK1 using U0126 (Gross et al., 2000) inhibits meiosis I - meiosis II transition and DNA is replicated.

Available evidence indicates that the MAP kinases pathway is involved in spindle formation and stabilization. In mouse oocytes, MAP kinase has been found to be associated with MTOC (Verlhac et al., 1994). In mouse and pig oocytes, MAP kinase distributes to the metaphase spindle and migrates to the middle of the spindle during the transition from anaphase to telophase (Lee et al., 2000; Hatch and Capco, 2001). The same pattern of distribution has been observed for its downstream effector, p90^{Rsk} (Fan et al., 2003). Interestingly, amphibian and mammalian oocytes in which the MAP kinase pathway is inactive fail to assemble a normal spindle (Bodart et al 2002 ; Zhao et al., 1991 ; Araki et al., 1996 ; Choi et al., 1996). However, mouse oocytes deficient in MAP kinase activity can still divide and release polar body. In this case, the emitted polar body is abnormally large (Verlhac et al., 2000a).

This study was undertaken to analyze *in vivo* the effects of p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway on spindle morphogenesis induced by hormonal stimulation in *Xenopus laevis* oocytes. Both chemical inhibitor and antisense strategies were used and their effects on the MAP kinase cascade regulation as well as on the MEK kinase Raf1 have been analysed and discussed. Our results provide evidences that p39^{Mos} is the only MAPKK kinase involved in MEK1 phosphorylation and that Raf complete phosphorylation is dependent upon phosphorylation by either MEK1 or Xp42Mpk1. While inactivation of MAP kinase leads to formation of aster-like structures, we observed that members of p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway might play complementary but different roles in spindle formation.

Material and Methods

Isolation of oocytes.

Adult *Xenopus* females were purchased from University of Rennes I, France. After anaesthetizing frogs by immersion in 1g/l MS222 solution (tricaine methane sulfonate, 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, pH 7.5 (NaOH)]. Fully-grown stage VI oocytes (Dumont, 1972) were isolated and follicles were removed by collagenase treatment for 30 min (1 mg/ml collagenase A, Roche etc.), followed by manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until experiments. All treatments were started within 24 hours after ovarian lobes removal.

Antisense oligonucleotides

Phosphorothioate deoxyribo-oligonucleotides were purchased from Eurogentec. The sequence of the antisense against p39^{Mos} was AAGGCATTGCTGTGTGACTCGCTGAAAC and was similar to those described in Sagata et al (1988). As control we used the inverted sequence GTTTCAGCGAGTCACACAGCAATGCCTT designed as sense oligonucleotides or RNase free water.

Morpholino oligonucleotides were purchased from Gene Tools. The sequence of the antisense against p39^{Mos} was GGGAAGGCATTGCTGTGTGACTCGC. As a control, we used the inverted sequence CGCTCAGTGTGTCGTTACGGAAGGG.

For both phosphorothioate and morpholino oligonucleotides, 10 ng were microinjected into each oocytes by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). Oocytes were then incubated in ND96 medium for progesterone experiments and in OR2 medium for insulin experiments (see Baert et al., 2003). U0126 (Promega) was prepared in DMSO and used at final concentration of 50µM. Treatments began 1 h before progesterone or insulin addition. Control oocytes were treated with an identical amount of DMSO.

Oocyte injections

Purified murine Mos protein (Mu-Mos) was kindly provided by Dr. Vande Woude. Purified constitutively active Rsk (CA-Rsk) was a gift of Dr Nebreda (Perdiguero et al., 2003). Mu-Mos (37.5 ng) and CA-Rsk (5 ng) were injected into each oocytes (50nl) just before progesterone or insulin treatment. Batches of injected oocytes (30 to 60) were observed every hour and scored for the appearance of white spot. At each time point, 3 to 5 oocytes were frozen at -20°C for later biochemical analysis (see below).

Resumption of meiosis was stimulated by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 μM progesterone (Sigma). Incubation in DMSO (0.1%) or injection with PSS were used as controls for U0126 and PSAS experiments respectively.

Cytological and immunocytological analysis

For classical cytological analysis, oocytes 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 that reveals cytoplasmic structures.

For immunocytological analysis, oocytes were fixed overnight in cold methanol, which was gradually replaced by butanol before embedding in paraffin. 10 μm sections were cut and stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (Sigma) to visualize chromosomes. Microtubules were stained with monoclonal anti-tubulin antibody Tub 2.1 (Sigma). Primary antibodies were revealed with antimouse antibody coupled to Oregon Green (Molecular probes).

Western Blotting.

Oocytes were homogenized in homogenisation buffer (15 mM MgCl_2 ; 1mM NaF ; 1 mM Na Orthovanadate ; 60 mM β -glycerophosphate ; 15 mM paranitrophenylphosphate ; 1 mM phenylphosphate ; 15 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Soybean trypsin inhibitor ; 10 μM benzamidine ; 25 mM MOPS ; pH 7.2 : Azzi et al., 1994) and then centrifuged for 5 min. at 10,000 g (4°C) to eliminate yolk platelets. Proteins were then separated on a 12.5% mini-SDS- polyacrylamide gel for phospho-MEK immunodetection or on a

modified 17.5% polyacrylamide gel (Chesnel et al., 1997) for Raf, p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} immunodetection. Such gels allow better discrimination between active and inactive proteins (Bodart et al., 1999). Xp42^{Mpk1} was detected using the monoclonal antibody D-2 (Santa Cruz Biotechnology) (1/1000). p39^{Mos} was detected using the polyclonal antibody C238 (Santa Cruz Biotechnology) (1/1000). p90^{Rsk} detection was performed using the polyclonal antibody C21 (Santa Cruz Biotechnology) (1/1000). Raf was detected using the polyclonal antibody C20 (Santa Cruz Biotechnology) (1/500) and phospho-MEK detection was performed using the polyclonal antibody (Calbiochem) (1/1000). Signals were detected using ECL chemoluminescence system (Amersham).

Results

Dose-dependent effects of Xp42^{Mpk1} pathway chemical inhibitors U0126 on G2/M transition.

To analyse the impact of the inhibition of the p39^{Mos}-MEK1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} pathway on spindle morphogenesis, we determine the effects of two strategies on Xp42^{Mpk1} activity and p39^{Mos} accumulation.

Dose-dependent effects of the MEK inhibitor U0126 on meiotic resumption induced by progesterone or insulin were first investigated. Previous results obtained by Gross and collaborators (2000) used only 50 μ M concentration of U0126 and showed that this concentration could not block progesterone-induced GVBD but rather delayed it. Using increasing concentration of U0126 (10 to 100 μ M) on progesterone-stimulated oocytes, we observed that U0126 never prevented GVBD though it did delay GVBD (Fig. 1A). In oocytes treated by U0126 10 μ M, time of GVBD₅₀ (time to which 50% of the oocytes underwent meiotic resumption) was 1.5 ± 0.2 fold of GVBD₅₀ of control oocytes treated with DMSO. In oocytes treated with U0126 50 μ M, time of GVBD₅₀ was 1.8 ± 0.1 fold of control oocytes. From these experiments, a logrank test showed heterogeneity between GVBD kinetics in DMSO, U0126 10, 20 and 50 μ M ($p < 0.05$, $n = 4$) suggesting that MEK1 inhibitor U126 delayed GVBD in a dose-dependent manner.

It is also noteworthy that U0126 treatment, if not resulting in the full inhibition of GVBD, induced partial inhibition of GVBD. Percentage of white spot of control oocytes treated with DMSO was of $93.1 \% \pm 3.6$. It was of $66 \% \pm 9.8$ in oocytes treated with U0126 10 μ M and of $58.7 \% \pm 9.1$ and $58.1 \% \pm 8.8$ in oocytes treated respectively with U0126 25 and 50 μ M. In our hands, GVBD percents in U0126-treated oocytes did not increase after 20 hours and never reached values comparable to those of DMSO-treated oocytes even after 36 hours exposure.

To evaluate the effects of increasing concentrations of U0126 on p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway, p39^{Mos} accumulation as well as the phosphorylation status of Xp42^{Mpk1} and its downstream target p90^{Rsk} were analysed by Western blotting at the end of each experiment (20 hours post-progesterone; Fig. 1B). In immature oocytes (Fig 1B, first lane) p39^{Mos} was not detectable and Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were unphosphorylated. In control oocytes treated with DMSO 1/1000 and stimulated with

progesterone (second lane), p39^{Mos} was present and Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were phosphorylated. By contrast, we observed that in oocytes treated with 10 μ M U0126 and progesterone, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation were only partially inhibited whereas they were totally inhibited in U0126 25 μ M and 50 μ M treated oocytes. However, U0126 treatment up to 50 μ M never abolished p39^{Mos} accumulation but resulted in a slight decrease of the detected amounts (Fig. 1B). We also noted that phosphorylation of MEK1 was never inhibited even if concentration of U0126 was increased up to 50 μ M. This observation agrees with report of Davies and colleagues (2000), which demonstrated that U0126 blocks Xp42^{Mpk1} phosphorylation through direct inhibition of phosphorylated MEK1 and not by preventing phosphorylation of MEK1. As we already showed in insulin-treated oocytes (Baert et coll., 2003), U0126 incubation partially inhibited Raf phosphorylation in progesterone-stimulated oocytes (Fig. 3, lane 7).

Figure 1

Effects of p39^{Mos} morpholinos antisense on G2/M transition induced by hormonal stimulation.

We reported previously that injection of antisense phosphorothioate oligonucleotides of p39^{Mos} (p39^{Mos} PSAS) gave similar results : when stimulated either by insulin or progesterone, injected oocytes exhibited no activation of the p39^{Mos} - Xp42^{Mpk1} pathway and GVBD was delayed but not prevented (Baert et al., 2003).

To compare with antisense phosphorothioate strategies, we used antisense Morpholino oligonucleotides (p39^{Mos}-MAS) against p39^{Mos} synthesis on progesterone-stimulated oocytes. We observed that maturation was strongly delayed but not inhibited (Fig. 2A). Injection of 10 ng of sense Morpholinos oligonucleotides (p39^{Mos}-MS) of p39^{Mos} had no effect on maturation time course : time of GVBD₅₀ was 1.0 \pm 0.1 fold those of control oocytes injected with water. In contrast, time of GVBD₅₀ of p39^{Mos}-MAS-injected oocytes was increased by 1.4 \pm 0.1 fold. Whereas U0126 induced a noticeable decrease in GVBD rate, p39^{Mos}-MAS injection had little or no effects on the percentage of GVBD. In progesterone-stimulated oocytes, p39^{Mos}-MAS injection resulted in 82.0 % \pm 7.3 of white spot

compared to $85.5\% \pm 3.3$ in water-injected oocytes and $75.6\% \pm 8.6$ in p39^{Mos}-MS-injected oocytes.

We performed Western blot studies of the effects of these oligonucleotides on the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway (Fig. 2B). We did not observe any difference between p39^{Mos}-MAS-injected oocytes and immature oocytes concerning p39^{Mos} signal detection. Indeed, we failed to detect any p39^{Mos} in p39^{Mos}-MAS-injected oocytes. This resulted in abolition of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} activation as demonstrated by their lack of phosphorylation (Fig. 2B). Our results showed that, like p39^{Mos}-PSAS, p39^{Mos}-MAS prevent p39^{Mos} synthesis, MEK1 phosphorylation and Xp42^{Mpk1} activation (Fig. 2B) and cause a delay in GVBD. Thus both phosphorothioate and Morpholinos strategies can be used to prevent similarly the p39^{Mos} - Xp42^{Mpk1} pathway.

Figure 2

p39^{Mos} but not Raf is responsible for MEK1 phosphorylation and MAP kinase pathway activation during *Xenopus* oocyte maturation.

We observed that MEK1 is not phosphorylated in p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes stimulated by progesterone (Fig. 2B) or by insulin (not shown). Same treatments result only in Raf partial phosphorylation (Baert et coll., 2003; Fig. 2B and 3). Then, the partially phosphorylated isoform of Raf detected in such oocytes (Fig. 2B and 3) is not able to induce MEK1 phosphorylation, suggesting that this partially phosphorylated isoform is not active. Conversely, injection of murine Mos (Mu-Mos) protein rescued MEK1 and Raf phosphorylation and partially rescued Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} levels of phosphorylation (Fig. 2B). In these conditions, no p39^{Mos} signal was detected, mainly because antibody used failed to detect exogenous injected Mu-Mos. In 50 μ M U0126-treated oocytes, we observed that neither p39^{Mos} accumulation nor MEK1 phosphorylation were prevented, supporting the hypothesis that U0126 does not impair MEK1 activation but rather inhibits its kinasic activity (Fig. 1B). Finally, injection of constitutively active Rsk (CA-Rsk) failed to rescue Xp42^{Mpk1} and Raf phosphorylation in both p39^{Mos}-PSAS-injected and U0126-treated oocytes (Fig. 3) but succeeded in reverting the effects of U0126 on spindle morphogenesis (Fig. 5K and table 1).

Figure 3

Prevention of p39^{Mos} synthesis or MEK1 inhibition alter bipolar spindle morphogenesis and induce aster-like formation following progesterone stimulation.

We performed cytological and immunocytological analysis to assess the effects of both U0126 and p39^{Mos}-antisense oligonucleotides on bipolar spindle morphogenesis during progesterone and insulin stimulation. Control oocytes stimulated by progesterone exhibited meiotic spindles at the plasma membrane with condensed chromosomes on a metaphase plate in 93.0 % ± 5.0 of the oocytes treated with 0.1% DMSO (table 1; Fig. 4F-H), spindle formation was slightly decrease in control oocytes injected with p39^{Mos}-PSS (82.0% ± 1.1 bipolar spindle ; table 1 and Fig. 4L-N). While spindle percentages were lower in p39^{Mos}-MS-injected oocytes, there was no significative difference in regard to cytological structures found in p39^{Mos}-MS-injected and in control H₂O-injected oocytes (58.0 ± 7.1, n=5 and 73.2 ± 5.7 %, n=3 respectively; table 1). Similarly, there was no significative differences between H₂O and p39^{Mos}-PSS-injected oocytes (n=5). Inhibition of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway resulted in a significant decrease in bipolar spindle formation (table1; Fig. 4R,S and 5J). Meiotic metaphase spindles were observed in only 17.0 % ± 7.2 of the oocytes treated with 50 µM U0126, 10.0 % ± 10.0 in oocytes injected with p39^{Mos}-PSAS and 3.8 % ± 3.8 in oocytes injected with p39^{Mos}-MAS (table 1). Statistical analysis confirmed that there was a significative difference between DMSO and U0126 50 µM-treated oocytes, between p39^{Mos}-MS and p39^{Mos}-MAS-injected oocytes and between p39^{Mos}-PSS and p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes (each p<0.001 , n= 3).

Percentage of bipolar spindles observed in U0126-treated oocytes decreased in a dose-dependent manner (table1; Fig. 4R) : 41.0% ± 19.5 of 10 µM U0126-treated oocytes exhibited a meiotic spindle when 25 µM U0126-treated oocytes exhibited a meiotic spindle in only 9.2 % ± 5.8 of the cases (table 1; Fig. 4R). If we failed to detect bipolar spindles in these oocytes, we observed aster-like structures (table1; Fig. 4R) in 61.2 % ± 9.4 of the oocytes treated with 50 µM U0126 (table 1; Fig. 4D). Percentage of aster-like structures in U0126-treated oocytes depended upon the concentration used (table 1; Fig 4R) : 10 µM U0126

treated oocytes exhibited $17.9\% \pm 17.9$ whereas $50\ \mu\text{M}$ U0126 leads to the formation of 61.2 ± 9.3 aster-like structures in the oocytes. These effects appeared to be dose-dependent because we have observed a statistical difference between each concentration of U0126 that were used ($p < 0.05$).

Similarly to U0126 treated oocytes, aster-like structures were found in $76.0\% \pm 10.8$ of the oocytes injected with $p39^{\text{Mos}}$ -PSAS (table 1; Fig. 4O-Q and 5J) and $78.7\% \pm 2.9$ of the oocytes injected with $p39^{\text{Mos}}$ -MAS (table 1; Fig. 4E; 5B and J). In comparison, aster-like structures were detected only in $1.8\% \pm 1.8$ of the control oocytes treated with 0.1% DMSO, in $14\% \pm 3.6$ of oocytes injected with $p39^{\text{Mos}}$ -PSS and in $10.2\% \pm 4.5$ of the oocytes injected with $p39^{\text{Mos}}$ -MS (table1). Inhibition of $Xp42^{\text{Mpk1}}$ activation by U0126 also appeared to alter microtubular network and spindle organization because $21.7\% \pm 10.8$ of U0126 $50\ \mu\text{M}$ -treated oocytes exhibited no structure at all (Fig. 4R, table1). The latter effect seemed not to be specific of $Xp42^{\text{Mpk1}}$. Indeed, we failed to detect any structure only in $14\% \pm 9.3$ and $17.4\% \pm 4.3$ of oocytes respectively injected with $p39^{\text{Mos}}$ -PSAS and $p39^{\text{Mos}}$ -MAS (table 1; Fig. 5J).

To assert the presence of condensed chromosomes associated to the aster-like structures observed by nuclear red/picroindigocarmine staining, we performed an Hoechst and anti-tubulin staining on sections of cold methanol-fixed oocytes. Such treatment allowed us to observe condensed chromosomes that have undergone diakinesis associated with microtubules both in U0126-treated (Fig. 4I-K) and $p39^{\text{Mos}}$ -antisense-injected oocytes (Fig. 4O-Q). Nevertheless, if condensed chromosomes were observed, we noted that the signal appeared weaker than in metaphase II control oocytes. One might argue that the aster-like structure could be interpreted as a polar view of a misorientated metaphase spindle in the cytoplasm. However, on such a polar view, one shall not attend to observe nucleated microtubules radiating around of aggregate of chromosomes. Aster structures observed were always larger than metaphase spindle (i.e. in $50\ \mu\text{M}$ U0126-treated oocytes, aster-shaped microtubular structures observed are 2.0 ± 0.5 fold larger than control metaphase II spindle ; also compare Fig. 4H and N with K and Q) and were never located at the plasma membrane but rather in the sub-cortical cytoplasm. Indeed, in $p39^{\text{Mos}}$ -PSAS-treated oocytes, microtubular structures were found at the plasma membrane in only

33.3% \pm 8.3 of the oocytes but in 86 % \pm 3.6 of the cases in p39^{Mos}-PSS-injected oocytes. In contrast, structures were found in subcortical area in 58.3 \pm 8.3 and even in deep cytoplasm in 8.3% \pm 8.3 of p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes. By contrast, in p39^{Mos}-PSS-treated oocytes, structures were observed in subcortical area in 5.5% \pm 5.5 of the cases and in deep cytoplasm in 6.7% \pm 6.7 of the oocytes.

Thus, chemical inhibitor and p39^{Mos}-antisense strategies led to microtubule nucleation in the cytoplasm without establishment of a bipolar axis.

Figure 4

Table 1

Prevention of first polar body extrusion is not specific to MAPK inhibition by U0126.

Whereas the decrease of metaphase spindle organization in U0126-treated oocytes was decreased in a dose-dependent manner (table 1; Fig. 4R), the extrusion of the first polar body was already impaired by 10 μ M U0126 exposure. Detection of polar body can be accurately performed on 7 μ m sections : polar bodies have distinctive shape from remaining follicular cells and are located between the plasma membrane and the vitelline membrane in a V-shaped depression (fig 4C and 5A). Though first polar bodies were found in 68.7% \pm 3.3 of DMSO-incubated oocytes, they were never detected in U0126-treated oocytes, whatever the concentration used was. While 10 μ M concentration did not totally block Xp42^{Mpk1} phosphorylation as attested by the electrophoretic shift observed in Fig. 1B, this partial inhibition might have been sufficient to prevent polar body extrusion. Similarly, no polar bodies were detected in p39^{Mos}-MAS-injected oocytes.

CA-Rsk injection does not rescue spindle organization in p39^{Mos} antisense-injected oocytes.

To assert that aster-like formation accounts for the inhibition of p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway, spindle rescue experiment were performed using CA-Rsk or Mu-Mos protein injection in p39^{Mos}-antisense oligonucleotides-injected oocytes. We observed that while Mu-Mos injection rescued the establishment of a bipolar spindle

in $65.7\% \pm 4.2$ of p39^{Mos}-MAS -injected oocytes (n=5; table1; Fig. 5C and J) and in 75% of p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes (n=2; table 1 and Fig. 5J), the injection of CA-Rsk failed to properly rescue normal spindle morphogenesis in p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes (19 ± 13.2 , n=3 ; Table 1 and Fig. 5D-F and J). We determined that there was no significant differences between p39^{Mos}-PSS-injected oocytes and oocytes co-injected with Mu-Mos and p39^{Mos}-PSAS, as well as between p39^{Mos}-MS-injected oocytes and oocytes co-injected with Mu-Mos and p39^{Mos}-MAS. CA-Rsk and p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes exhibited a significant difference toward p39^{Mos}-PSS-injected oocytes ($p < 0.01$, n=3) and toward p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes ($p < 0.001$, n=2) or p39^{Mos}-MAS-injected oocytes ($p < 0.001$, n=5). The significant difference observed between CA-Rsk and p39^{Mos}-PSAS co-injected oocytes and p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes might be explained by the lack of structures observed when CA-Rsk is injected. No structure were observed in 53.2 ± 10.7 of the oocytes co-injected with CA-Rsk and p39^{Mos}-PSAS (table 1, fig 5J).

Figure 5

Constitutively active Rsk but not Mos rescues spindle formation in U0126 treated oocytes.

Since 50 μ M U0126-treated oocytes exhibited lower amounts of p39^{Mos} (Fig. 1B), one might suggest that this amount is not sufficient to allow the establishment of a spindle bipolar axis. To test this hypothesis, we injected Mu-Mos amounts that were able to rescue spindle organization in antisense-injected oocytes. In these conditions, we observed that Mu-Mos was not able to restore a metaphase spindle at the plasma membrane (12.5% metaphase spindle vs. 57.5% aster ; table 1 and Fig. 4R). Nevertheless, CA-Rsk injections at the same concentration than in antisense-injected oocytes, rescued normal bipolar spindle in $74.9\% \pm 12.6$ of U0126-treated oocytes (table 1; Fig. 4R and 5H-J). This suggest that inhibition of bipolar spindle formation is specific of MAP kinase pathway inhibition and that activity of p90^{Rsk} is necessary but not sufficient for bipolar spindle morphogenesis.

Discussion

p39^{Mos} accumulation has been shown not to be required for GVBD but for Xp42^{Mpk1} activation following progesterone (Baert et al., 2003; Dupre et al., 2002) or insulin stimulation in *Xenopus laevis* oocytes (Baert et al., 2003). We observed that inhibition of p39^{Mos} accumulation using antisense strategies prevented the phosphorylation of MEK1 both in progesterone and insulin-stimulated oocytes. Upon hormonal stimulation of Ras-dependent and Ras-independent pathways by insulin and progesterone respectively, Raf undergoes catalytic activation and electrophoretic mobility up-shift (Fabian et al., 1993; Muslin et al., 1993). It has been first hypothesized that Raf could be activated downstream of p39^{Mos} since prevention of p39^{Mos} accumulation reduced the electrophoretic shift of Raf (Fabian et al., 1993; Muslin et al., 1993). Nevertheless, Raf negative dominant isoforms, which were truncated from their catalytic domains but still contained the Ras-binding domain, might directly exert an inhibitory effect on Ras (Shibuya et al., 1996).

Together with the absence of MEK1 phosphorylation in p39^{Mos}-antisense (p39^{Mos}-AS) injected oocytes stimulated with insulin or progesterone, we have observed that Raf was only detected under a partially phosphorylated isoform in these conditions. Similarly Raf was detected under the same partially phosphorylated isoform in U0126-treated oocytes stimulated either with insulin or progesterone. Because p39^{Mos} still accumulated in these oocytes, absence of p39^{Mos} accumulation does not account for the prevention of full phosphorylation of Raf. Noteworthy, even if the amount of p39^{Mos} seemed to be lower in U0126-treated oocytes than in control oocytes, this amount was still enough to induce MEK1 phosphorylation.

Full phosphorylation of Raf was rescued by murine Mos (Mu-Mos) in p39^{Mos}-AS-injected oocytes while constitutively active Rsk (CA-Rsk) injections failed to restore Raf phosphorylation either in U0126-treated oocytes or in p39^{Mos}-AS-injected oocytes. From these results, it can be hypothesized that Raf full phosphorylation is under the control of p39^{Mos}-MEK1-Xp42^{Mpk1} pathway independently of p90^{Rsk}. Our results do not plague for a role for Raf during meiosis resumption since the latter can occur in absence of Raf activity or activation. Moreover, this suggests that p39^{Mos} is the unique MAPKK kinase responsible for MEK1 phosphorylation during *Xenopus* oocyte maturation in spite of the activation of Raf during meiosis resumption.

Taken together, recent results obtained using p39^{Mos} antisense strategies and chemical inhibitors of MEK in *Xenopus* oocytes have established that GVBD could occur in absence of p39^{Mos} accumulation or Xp42^{Mpk1} activity (Baert et al., 2003; Dupre et al., 2002; Gross et al., 2000). In these conditions, GVBD and MPF activation are delayed in comparison to control oocytes. However, we observed that egg cytoplasm-induced GVBD was delayed in p39^{Mos}-AS-injected oocytes whereas it was not in U0126-treated oocytes, suggesting that p39^{Mos} may play a role independently of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} in control of meiosis dynamic (Sellier and Bodart, unpublished observations). This effect could be mediated by the p39^{Mos} capacity to directly phosphorylate Myt1 independently of p90^{Rsk} (Peter et al., 2002).

In contrast to mouse, the involvement of the MAP kinase pathway in spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes *in vivo* has not been extensively studied. Studies have stressed out that *in vitro* MAPK inhibition leads to half spindle formation (Horne and Guadagno, 2003). In accordance with previous reports we failed to observe meiotic structures at the plasma membrane of the oocytes either treated with U0126 (Bodart et al., 2002; Gross et al., 2000) or injected with p39^{Mos}-antisense Morpholinos oligonucleotides (Dupre et al., 2002). We observed the occurrence of an aster-like structure in deep cytoplasm in absence of MAPK activity. Kotani and Yamashita (2002) have reported the absence of MTOC organization, chromosomes condensation and bipolar formation in U0126-treated *Rana japonica* oocytes. In U0126-treated oocytes, they have observed partial condensation followed by re-condensation of chromosomes together with a dispersed pattern of microtubules. In contrast to these observations, we have observed microtubule nucleation in *Xenopus* oocytes either treated with U0126 or injected with p39^{Mos}-AS oligonucleotides. These asters were associated together with chromosomes that have undergone diakinesis DNA replication and cell cycling in *Xenopus* oocytes observed when MAPK pathway is inhibited (Dupre et al., 2002; Gross et al., 2000) might account for the absence of microtubule nucleation and chromosomes condensation observed in about 20 % of treated oocytes.

MAP kinase pathway is also clearly dispensable for GVBD to occur in mouse oocytes (Abrieu et al., 2001; Colledge et al., 1994; Hashimoto et al.,

1994). In mouse *Mos*-nullizygous mice, oocytes still exhibited spindle morphogenesis but spindle shape was altered and such spindle did not migrate toward the plasma membrane. This leads to an asymmetric division together with the extrusion of an abnormally large polar body (Verlhac et al., 2000a). However, polar body extrusion was neither observed in $p39^{Mos}$ -AS-injected nor in U0126-treated oocytes where $Xp42^{Mpk1}$ phosphorylation was only partially inhibited. Absence of migration of GV content and microtubule toward the plasma membrane, as well as yolk platelet surroundings, may have prevented any polar body extrusion. Role of $p39^{Mos}$ in cytosolic activity (CSF), which maintains high levels of MPF activity in metaphase II-arrested oocytes through the prevention of cyclin B degradation, is mediated by $Xp42^{Mpk1}$ (Abrieu et al., 1996; Haccard et al., 1993; Minshull et al., 1994) and $p90^{Rsk}$ (Bhatt and Ferrell, 1999; Gross et al., 1999). Meiotic spindle defects were rescued in $p39^{Mos}$ antisense injected oocytes by the injection of Mu-*Mos* indicating that the activation of the $p39^{Mos}$ -MEK1- $Xp42^{Mpk1}$ - $p90^{Rsk}$ cascade was specifically involved in the establishment of the bipolar axis of meiotic spindle. We have also observed that presence of endogenous $p39^{Mos}$ in U0126-treated oocytes, which was still able to phosphorylate MEK1, or injection of Mu-*Mos* failed to rescue bipolar spindle formation in these conditions, suggesting that $p39^{Mos}$ is not sufficient on its own to enable spindle organization. Injection of CA-Rsk was sufficient to rescue the formation of a bipolar spindle at the plasma membrane in U0126-treated oocytes. This supports a crucial role for $p90^{Rsk}$ in spindle morphogenesis, through its activation by $p39^{Mos}$ -MEK1- $Xp42^{Mpk1}$ cascade. If injection of CA-Rsk was able to rescue spindle morphogenesis in U0126-treated oocytes, it was not in $p39^{Mos}$ -antisense-injected oocytes. Failure of spindle restoration in $p39^{Mos}$ -PSAS and CA-Rsk co-injected oocytes, as well as in U0126 treated oocytes exhibiting $p39^{Mos}$ levels sufficient to induce MEK1 phosphorylation, suggest that $p39^{Mos}$ and $p90^{Rsk}$ are not sufficient on their own to enable spindle organization. It also suggests that both proteins are required together for spindle morphogenesis and that $p39^{Mos}$ promotes spindle organization through separate pathways, including one that is $p90^{Rsk}$ -independent.

$p39^{Mos}$ has been demonstrated to associate and phosphorylate tubulin (Zhou et al., 1991). Kinetochores motor protein CENP-E has been

demonstrated to exhibit epitopes that are modified upon a Mos-dependent manner in mouse oocytes (Duesbery et al., 1997). two hybrids screen leads to the identification of MISS, a MAPK Interacting and Spindle Stabilizing protein. The latter accumulated only in MII, where it was localized to the spindle (Lefebvre et al., 2002). DOC1R has also been shown to be regulated by phosphorylation during meiotic maturation by MAPK pathway. DOC1R is localized to microtubules and injection of DOC1R antisense RNA leads to microtubule defects in MII oocytes (Terret et al., 2003). Recently, experiments achieved by Gard and colleagues (Becker et al., 2003) have provided new insights in the mechanisms of spindle assembly and microtubule organization in *Xenopus* oocytes: while NuMA and dynein are required for the organization of TMA (Transient microtubule array) and MTOC, XMAP215 and kinesin-related XKCM1 have antagonistic roles in the regulation of microtubule assembly and organization. Nevertheless further analyses are required to determine how p39^{Mos} and its downstream effectors could regulate the molecular mechanisms of spindle morphogenesis. Because we did observe aster-like structure similar to those observed following progesterone stimulation in either XMAP215 antibodies or XKCM1 antibodies injected oocytes (Becker et al., 2003), one might hypothesize that these molecules could be targeted by the p39^{Mos} – Xp42^{Mpk1} pathway.

Our works provide *in vivo* evidences that complete phosphorylation of Raf is under control of MEK1 or Xp42^{Mpk1}, independently of p90^{Rsk}. Moreover, Raf partially phosphorylated isoform detected in our conditions appeared not to be able to phosphorylate MEK1. Here, we have also demonstrated that the p39^{Mos} – MEK1 – Xp42^{Mpk1} – p90^{Rsk} cascade is required for correct establishment of bipolar axis of the meiotic spindle in *Xenopus* oocytes. Thus, p39^{Mos} appeared to promote spindle morphogenesis through separate pathways, one being independent of p90^{Rsk} activity.

Acknowledgements

We thank Arlette Lescuyer-Rousseau for technical assistance. We are grateful to Pr A. 'Vauban' Leprêtre for statistical analysis. We also thank Dr. Vande Woude and Dr. Ahn for providing Mu-Mos and MEK mutant proteins, as well as Dr. Nebreda for CA-Rsk and for helpful discussions. This work was supported by grants from the

French “Ministère de l’Education Nationale” (UPRES-EA 1033) and from the “Association pour la Recherche sur le Cancer”.

References

- Abrieu, A., Doree, M. and Fisher, D.** (2001). The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* **114**, 257-67.
- Abrieu, A., Lorca, T., Labbe, J. C., Morin, N., Keyse, S. and Doree, M.** (1996). MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* **109** (Pt 1), 239-46.
- Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y. and 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.
- 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**, 13279-88.
- Baert, F., Bodart, J. F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A. and Vilain, J. P.** (2003). Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **278**, 49714-20.
- Ballantyne, S., Daniel, D. L., Jr. and Wickens, M.** (1997). A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation. *Mol Biol Cell* **8**, 1633-48.
- Barkoff, A., Ballantyne, S. and Wickens, M.** (1998). Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs. *Embo J* **17**, 3168-75.
- Becker, B. E., Romney, S. J. and Gard, D. L.** (2003). XMAP215, XKCM1, NuMA, and cytoplasmic dynein are required for the assembly and organization of the transient microtubule array during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **261**, 488-505.
- Bhatt, R. R. and Ferrell, J. E., Jr.** (1999). The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science* **286**, 1362-5.
- Bodart, J. F., Bechard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J. P. and Flament, S.** (1999). Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(mos) proteolysis. *Exp Cell Res* **253**, 413-21.
- Bodart, J. F., Gutierrez, D. V., Nebreda, A. R., Buckner, B. D., Resau, J. R. and Duesbery, N. S.** (2002). Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev Biol* **245**, 348-61.
- 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**, 122-33.
- Choi, T., Rulong, S., Resau, J., Fukasawa, K., Matten, W., Kuriyama, R., Mansour, S., Ahn, N. and Vande Woude, G. F.** (1996). Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4730-5.
- Chong, H., Vikis, H. G. and Guan, K. L.** (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* **15**, 463-9.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B. and Evans, M. J.** (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* **370**, 65-8.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P.** (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**, 95-105.

- Duesbery, N. S., Choi, T., Brown, K. D., Wood, K. W., Resau, J., Fukasawa, K., Cleveland, D. W. and 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.
- Dumont, J. N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**, 153-79.
- Dupre, A., Jesus, C., Ozon, R. and Haccard, O.** (2002). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Embo J* **21**, 4026-36.
- Fabian, J. R., Morrison, D. K. and Daar, I. O.** (1993). Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* **122**, 645-52.
- Fan, H. Y., Tong, C., Lian, L., Li, S. W., Gao, W. X., Cheng, Y., Chen, D. Y., Schatten, H. and Sun, Q. Y.** (2003). Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol Reprod* **68**, 968-77.
- Ferrell, J. E., Jr., 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**, 1965-71.
- Flament, S., Bodart, J. F., Browaey, 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**, 11-9.
- Frank-Vaillant, M., Jesus, C., Ozon, R., Maller, J. L. and Haccard, O.** (1999). Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in *Xenopus* oocytes in response to progesterone. *Mol Biol Cell* **10**, 3279-88.
- Fukasawa, K. and 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.
- Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N.** (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *Embo J* **13**, 2399-410.
- Gard, D. L.** (1992). Microtubule organization during maturation of *Xenopus* oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev Biol* **151**, 516-30.
- Gard, D. L., Affleck, D. and Error, B. M.** (1995). Microtubule organization, acetylation, and nucleation in *Xenopus laevis* oocytes: II. A developmental transition in microtubule organization during early diplotene. *Dev Biol* **168**, 189-201.
- Gautier, J. and Maller, J. L.** (1991). Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *Embo J* **10**, 177-82.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. and Maller, J.** (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**, 433-9.
- Gebauer, F., Xu, W., Cooper, G. M. and Richter, J. D.** (1994). Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *Embo J* **13**, 5712-20.
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S. and Fissore, R. A.** (2001). Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **59**, 106-14.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L.** (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* **286**, 1365-7.

- Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y. W. and Maller, J. L.** (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol* **10**, 430-8.
- 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**, 1262-5.
- Hajnal, A. and Berset, T.** (2002). The *C.elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)/M meiotic arrest of developing oocytes. *Embo J* **21**, 4317-26.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y. et al.** (1994). Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* **370**, 68-71.
- Hatch, K. R. and Capco, D. G.** (2001). Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural elements of the mouse egg: potentiation of MAP kinase activity by CaM KII. *Mol Reprod Dev* **58**, 69-77.
- Hausen, P. and Riebesell, M.** (1991). the early development of *Xenopus laevis*: Springer Verlag.
- Hindley, A. and Kolch, W.** (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* **115**, 1575-81.
- Hohegger, H., Klotzbucher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M. and Hunt, T.** (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development* **128**, 3795-807.
- Horne, M. M. and Guadagno, T. M.** (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **161**, 1021-8.
- Howard, E. L., Charlesworth, A., Welk, J. and 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. and Erikson, R. L.** (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell* **6**, 237-45.
- Kosako, H., Gotoh, Y. and Nishida, E.** (1994). Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *Embo J* **13**, 2131-8.
- Kotani, T. and Yamashita, M.** (2002). Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol* **252**, 271-86.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G.** (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-14.
- Lee, J., Miyano, T. and Moor, R. M.** (2000). Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* **8**, 119-25.
- Lefebvre, C., Terret, M. E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B. and Verlhac, M. H.** (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol* **157**, 603-13.
- Lewis, T., Groom, L. A., Sneddon, A. A., Smythe, C. and Keyse, S. M.** (1995). XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from *Xenopus laevis*: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development. *J Cell Sci* **108** (Pt 8), 2885-96.
- Masui, Y.** (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* **69**, 1-17.
- Masui, Y. and Markert, C. L.** (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**, 129-45.

- Mercer, K. E. and Pritchard, C. A.** (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 25-40.
- Minshull, J., Sun, H., Tonks, N. K. and Murray, A. W.** (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **79**, 475-86.
- Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R. and Copeland, T. D.** (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* **268**, 17309-16.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. and Dunphy, W. G.** (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
- Murakami, M. S. and Vande Woude, G. F.** (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos. *Development* **125**, 237-48.
- Muslin, A. J., MacNicol, A. M. and Williams, L. T.** (1993). Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol* **13**, 4197-202.
- Nebreda, A. R., Hill, C., Gomez, N., Cohen, P. and Hunt, T.** (1993). The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo. *FEBS Lett* **333**, 183-7.
- Nebreda, A. R. and Hunt, T.** (1993). The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *Embo J* **12**, 1979-86.
- Nurse P, M. Y., Hartwell L.** (1998). Understanding the cell cycle. *Nat Med.* **4**, 1103-6.
- Palmer, A., Gavin, A. C. and Nebreda, A. R.** (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* **17**, 5037-47.
- Paris, J., Swenson, K., Piwnica-Worms, H. and Richter, J. D.** (1991). Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. *Genes Dev* **5**, 1697-708.
- Perdiguero, E., Pillaire, M. J., Bodart, J. F., Hennersdorf, F., Frodin, M., Duesbery, N. S., Alonso, G. and Nebreda, A. R.** (2003). Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C. *Embo J* **22**, 5746-56.
- Peter, M., Labbe, J. C., Doree, M. and Mandart, E.** (2002). A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development* **129**, 2129-39.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. A.** (1993). Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* **13**, 2546-53.
- Saavedra, H. I., Fukasawa, K., Conn, C. W. and Stambrook, P. J.** (1999). MAPK mediates RAS-induced chromosome instability. *J Biol Chem* **274**, 38083-90.
- Sagata, N.** (1997). What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* **19**, 13-21.
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. and Vande Woude, G. F.** (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* **335**, 519-25.
- Shibuya, E. K., Morris, J., Rapp, U. R. and Ruderman, J. V.** (1996). Activation of the *Xenopus* oocyte mitogen-activated protein kinase pathway by Mos is independent of Raf. *Cell Growth Differ* **7**, 235-41.

Shibuya, E. K. and Ruderman, J. V. (1993). Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Mol Biol Cell* **4**, 781-90.

Solomon, M. J. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 180-6.

Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E. and 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.

Terret, M. E., Lefebvre, C., Djiane, A., Rassinier, P., Moreau, J., Maro, B. and Verlhac, M. H. (2003). DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* **130**, 5169-77.

Theodosiou, A. and Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3009.

Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H. and 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., Clarke, H. J. and Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* **120**, 1017-25.

Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J. and Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* **122**, 815-22.

Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P. and Maro, B. (2000a). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* **10**, 1303-6.

Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Kubiak, J. Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W. and Maro, B. (2000b). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J* **19**, 6065-74.

Ye, J., Flint, A. P., Luck, M. R. and Campbell, K. H. (2003). Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction* **125**, 645-56.

Zhao, X., Singh, B. and Batten, B. E. (1991). The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene* **6**, 43-9.

Zhou, R. P., Oskarsson, M., Paules, R. S., Schulz, N., Cleveland, D. and Vande Woude, G. F. (1991). Ability of the c-mos product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science* **251**, 671-5.

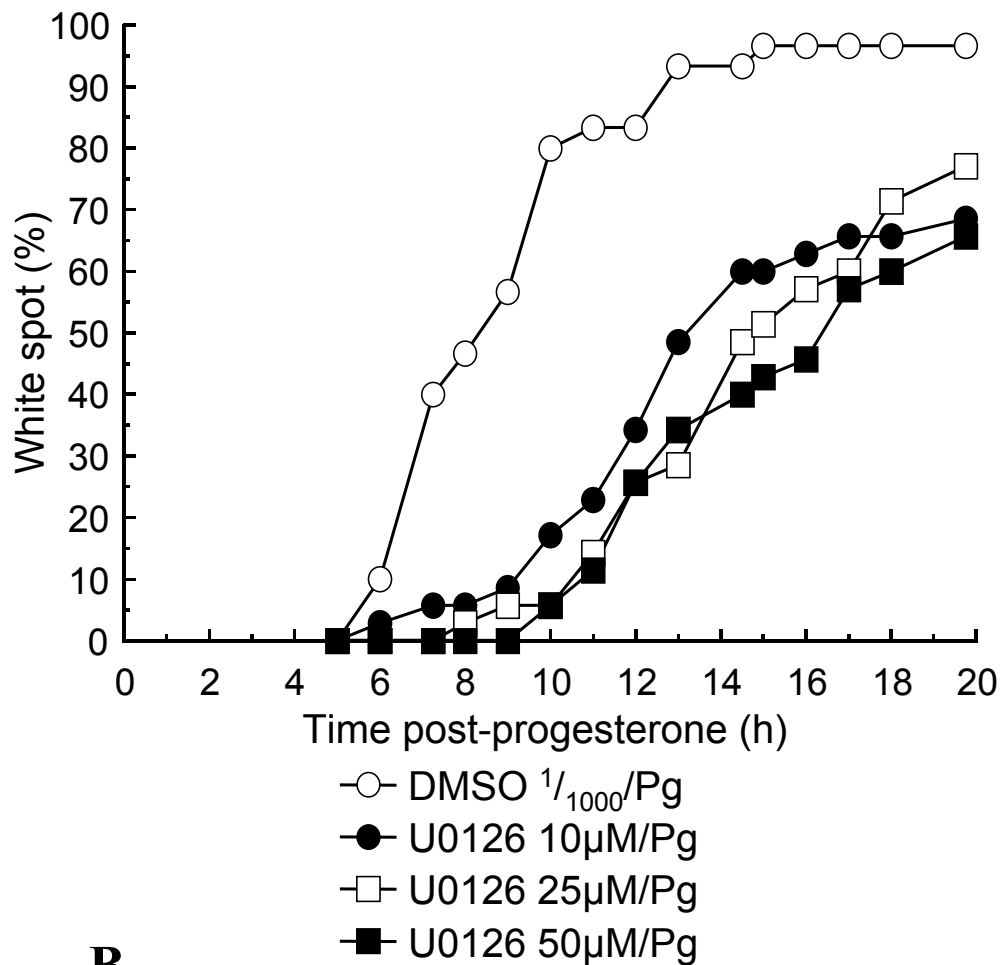
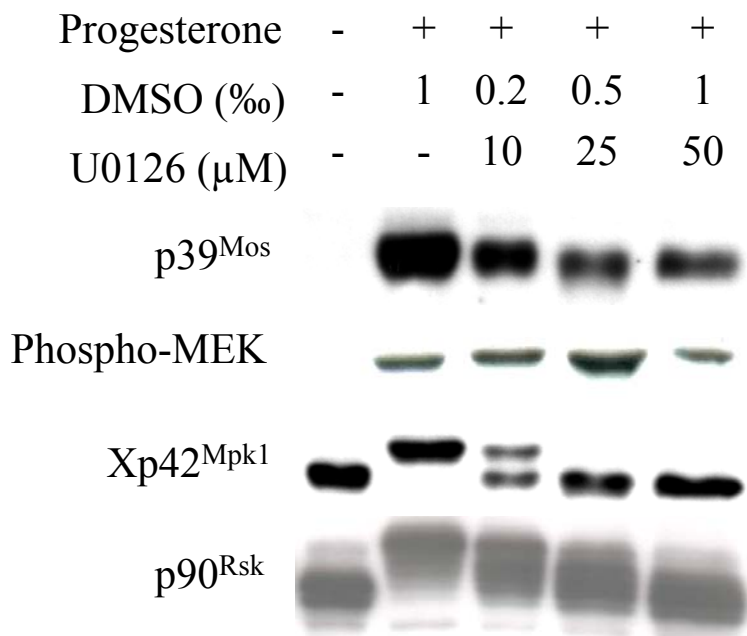
A**B****Figure 1**

Fig. 1. Dose-dependent effects of MEK inhibitor U0126 on progesterone-induced GVBD. (A) Control oocytes were incubated in ND medium containing 1/1000 DMSO (open circles). U0126-Inhibited oocytes were incubated in ND medium containing 10 (black circle), 25 (open square) or 50 μ M U0126 (black square). 1 hour after U0126 addition, oocytes were stimulated with progesterone. White spots were scored every hour and GVBD was assessed by dissection of oocytes (B) Western blot analysis. At the end of treatment (20 hours), 5 oocytes were taken off, homogenized and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, phospho-MEK, p90^{Rsk} and Raf.

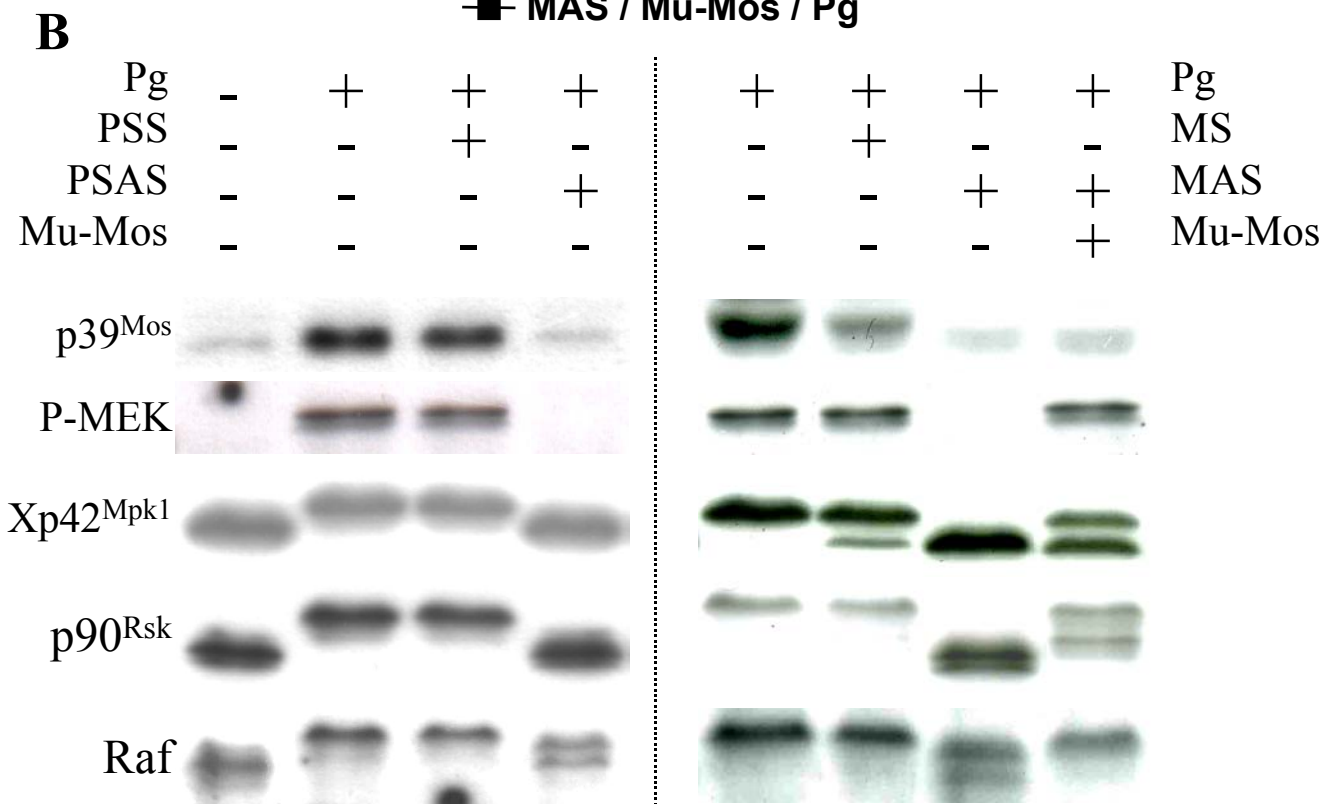
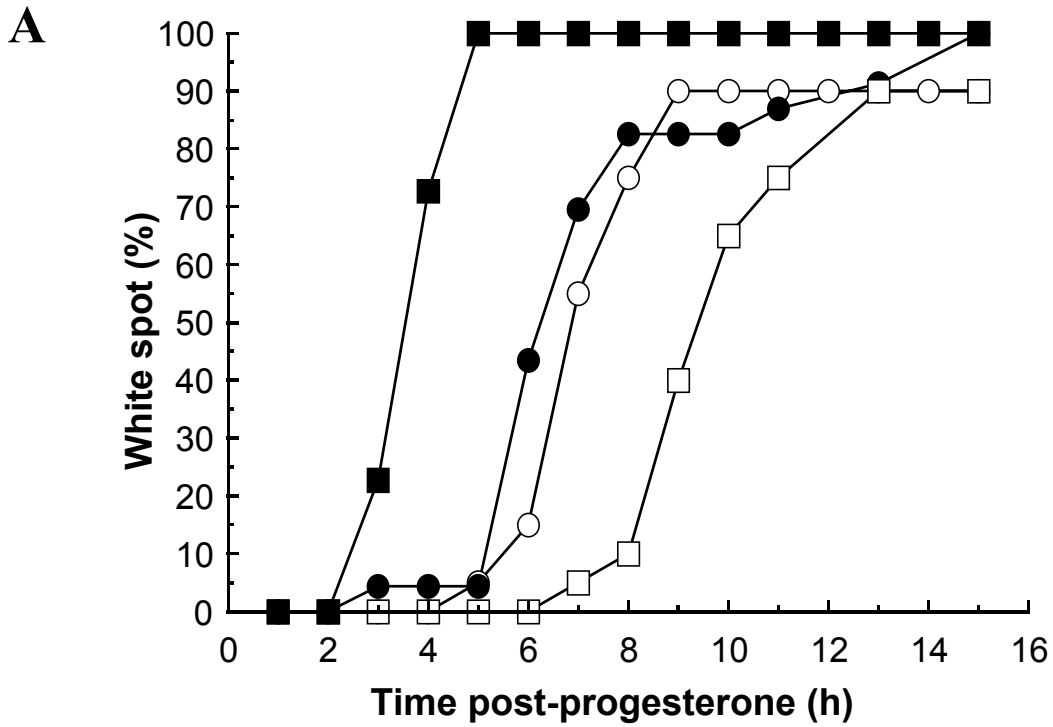


Figure 2

Fig. 2. p39^{Mos} accumulation, MEK1 phosphorylation, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} activation, and Raf full phosphorylation are prevented by p39^{Mos} antisense oligonucleotides in progesterone-stimulated oocytes. (A) Control oocytes were micro-injected with water (H₂O/Pg ; open circles) or p39^{Mos}-sense Morpholinos oligonucleotides (MS/Pg ; black circles). A batch of oocytes were micro-injected with p39^{Mos}-antisense Morpholinos oligonucleotides (MAS/Pg ; open squares). Murine Mos (Mu-Mos) has also been injected in MAS-injected oocytes (MAS / Mu-Mos / Pg, black squares). The latter injection did accelerate GVBD in p39^{Mos}-MAS-injected oocytes while p39^{Mos}-MAS injection alone delayed GVBD. After overnight incubation, oocytes were stimulated by progesterone. Appearance of white spot was monitored every 30 minutes and GVBD was assessed by dissection of oocytes. **(B)** Western blot analysis was performed either on Morpholinos and Phosphorothioate Oligonucleotide-injected oocytes. At the end of treatment (16 hours), 5 oocytes were taken off, homogenized and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, phospho-MEK, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk} and Raf. Murine Mos (Mu-Mos) injection restored Raf and MEK1 phosphorylation but did only partially restore Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} levels of phosphorylation.

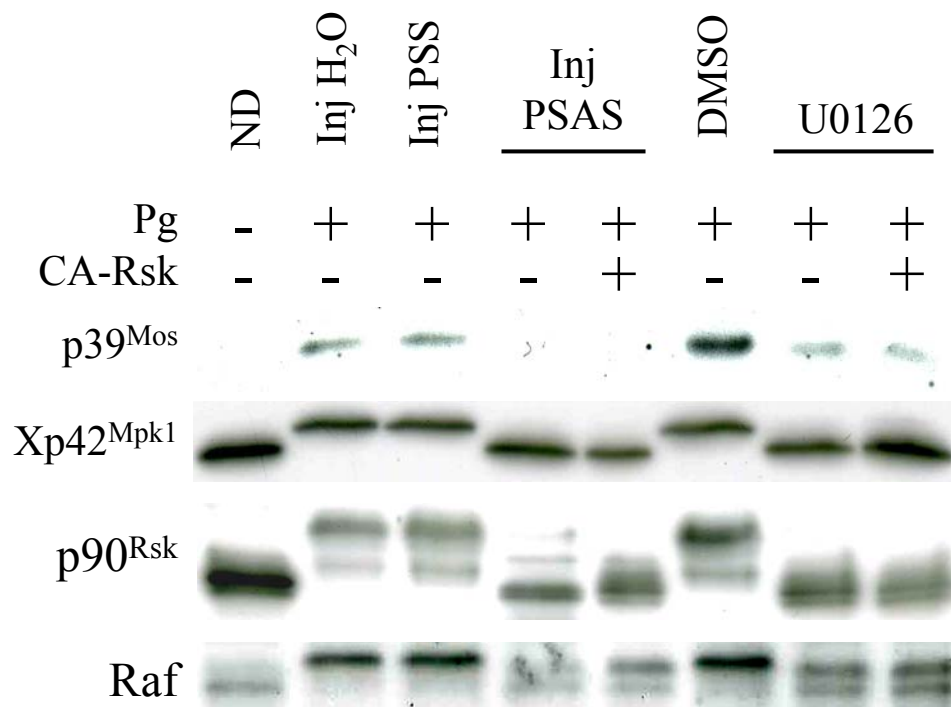


Figure 3

Fig. 3. Effects of p39^{Mos}-antisense oligonucleotides and CA-Rsk injections in progesterone-stimulated oocytes. Western blot analysis. Homogenized oocytes were immunodetected with antibodies against p39^{Mos}, phospho-MEK, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk} and Raf. Constitutively active Rsk (CA-Rsk) injections did not restore the activation of any of the p39^{Mos} – MEK1 – Xp42^{Mpk1} cascade nor affected Raf level of phosphorylation.

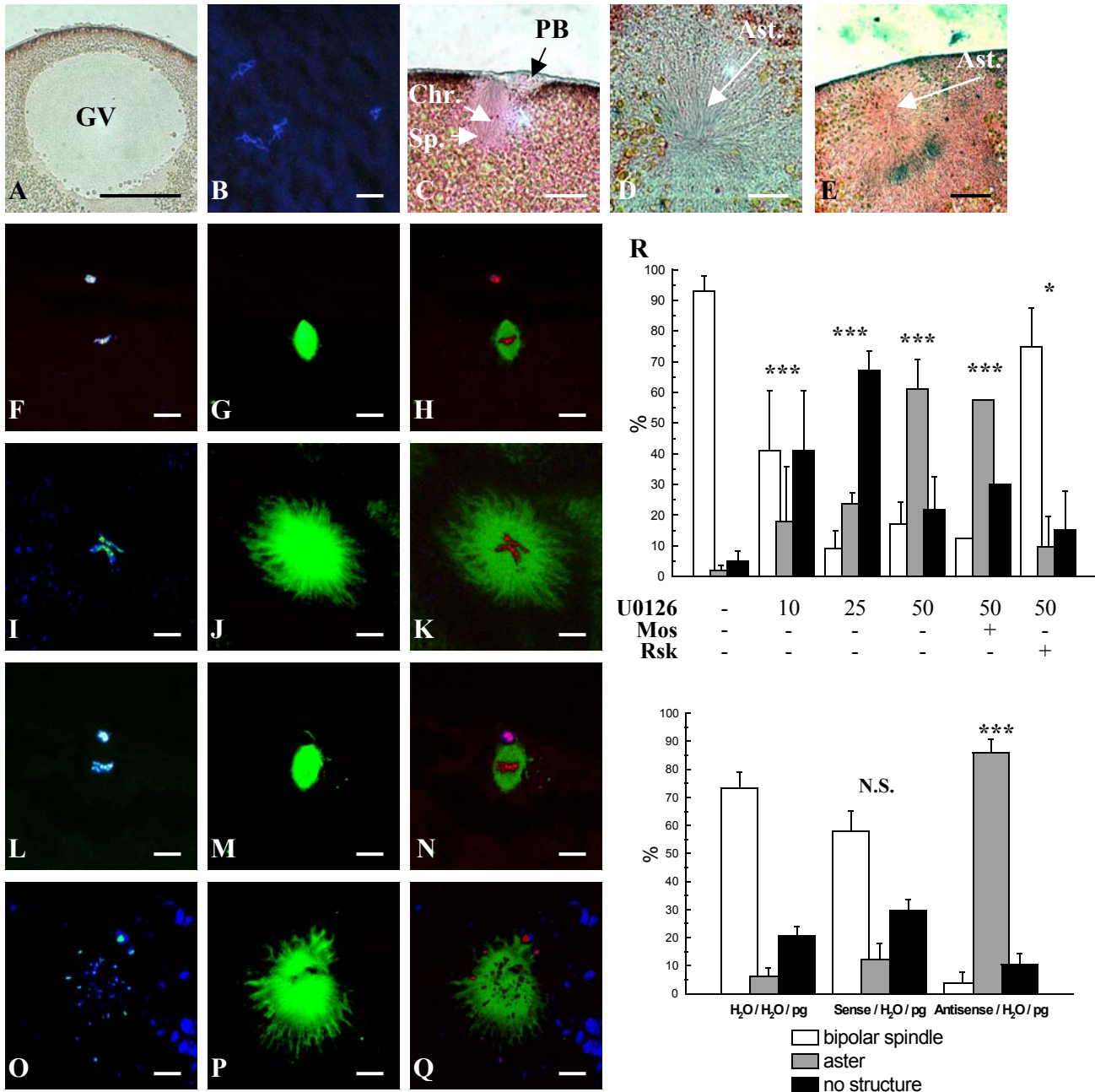


Figure 4

Fig. 4. Effects of U0126 or p39^{Mos}-antisense oligonucleotides on spindle morphogenesis during progesterone-induced maturation. (A-B) Immature non-treated oocytes. A : Germinal vesicle (nuclear red/picro-indigocarmine staining). B : Chromosomes decondensed at prophase I (Hoechst staining). **(C)** metaphase II arrested oocyte exhibits typical bipolar spindle with chromosomes and the first polar body (nuclear red/picro-indigocarmine staining). **(D)** Typical aster-shaped microtubular structure of a U0126-treated oocyte. **(E)** Typical aster-shaped microtubular structure of an antisense-injected oocyte. **(F-H)** Typical bipolar spindle with chromosomes of a control oocyte treated with DMSO 1/1000 and then incubated in progesterone. Polar body remained at vitelline membrane, which was separated from the plasma membrane because of oocyte's sections. F : Hoechst staining. G : anti-tubulin staining of the same figure as F. H : merge of F and G. **(I-K)** Typical aster-shaped microtubular structure with chromosomes of an oocyte treated with 50 μ M U0126 and then incubated in presence of progesterone. I : Hoechst staining. J : anti-tubulin staining of the same figure as I. K : merge of I and J. **(L-N)** Typical bipolar spindle with chromosomes of a control oocyte injected with p39^{Mos} sense oligonucleotides and then incubated in progesterone. L : Hoechst staining. M : anti-tubulin staining of the same figure as L. N : merge of L and M. **(O-Q)** Typical aster-shaped microtubular structure with chromosomes of an oocyte treated with p39^{Mos} antisense oligonucleotides and then incubated in presence of progesterone. O : Hoechst staining. P : anti-tubulin staining of the same figure as O. Q : merge of O and P. Bars represent 15 μ m except for A where bar represents 250 μ m. Ast. : aster-shaped microtubular structure, Chr. : chromosomes, PB : polar body, Sp. : bipolar spindle, GV : germinal vesicle. **(R)** Histogram showing percentages of the different structure types observed in oocytes treated with DMSO or with 10, 25 or 50 μ M U0126 and then incubated in presence of progesterone. Percentage of the different structure types in constitutively active Rsk or murine Mos-injected oocytes treated with 50 μ M U0126 are also shown. Error bars represent SEM values. Significativity toward DMSO/progesterone treatment is indicated. **(S)** Histogram showing percentages of the different structure types observed in oocytes treated with water (H₂O), p39^{Mos}-sense oligonucleotides (sense) or p39^{Mos}-antisense oligonucleotides (antisense) and then incubated in presence of progesterone. White bars show percentages of normal bipolar spindles, grey bars show percentages of aster-shaped microtubular structures and black bars show percentages of oocytes lacking any microtubular structures. Error bars represent SEM values. Significativity toward water/progesterone treatment is indicated.

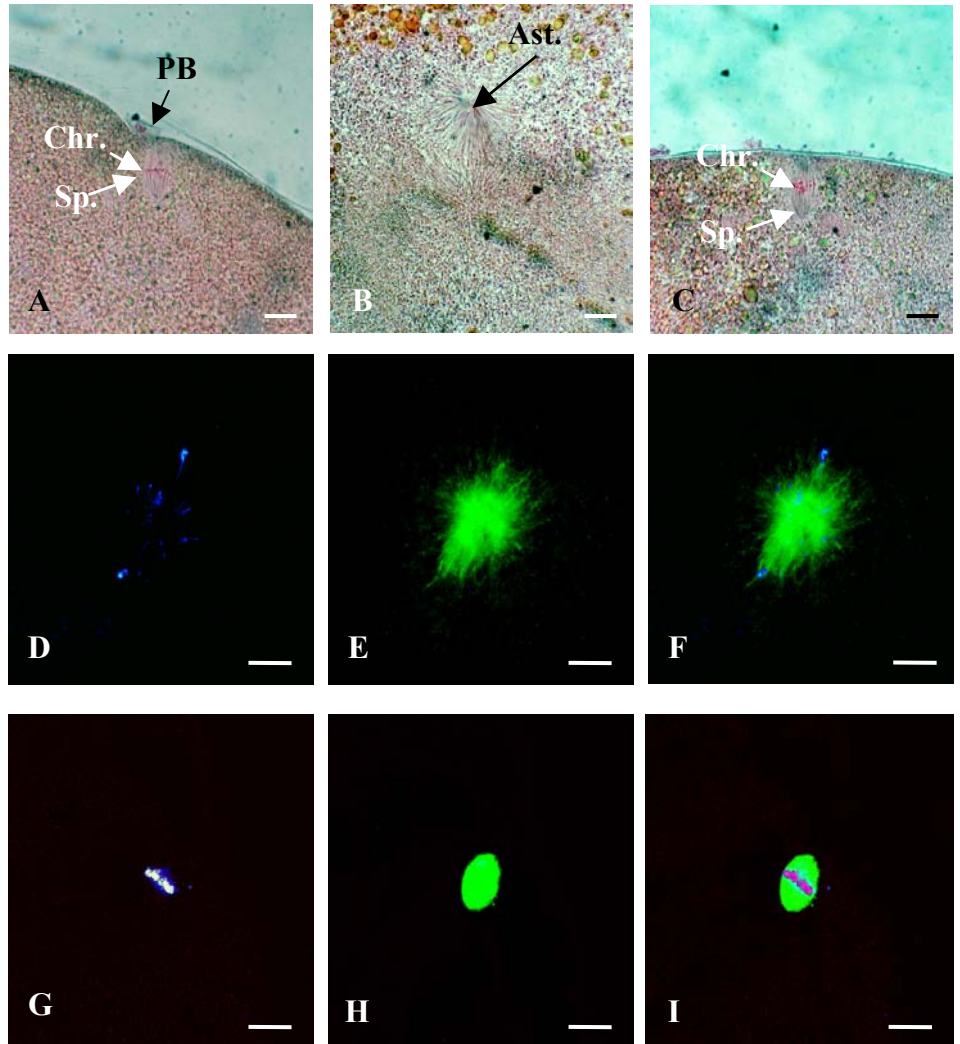
N.S. : non significative ($p > 0.05$); * : significative ($p < 0.05$); ** : very significative ($p < 0.01$); *** : highly significative ($p < 0.001$).

Treatment	Number of oocytes (number of females)	Metaphase spindle	Aster	No structure
DMSO / pg	56 (3)	52	1	3
U0126 10 μ M / pg	28 (3)	12	7	9
U0126 25 μ M / pg	23 (3)	2	6	15
U0126 50 μ M / pg	54 (7)	9	31	14
U0126 50 μ M / Mu-Mos / pg	18 (2)	2	10	6
U0126 50 μ M / CA-Rsk / pg	33 (3)	23	5	5
H ₂ O/pg	34 (3)	25	2	7
MS /pg	33 (5)	18	5	10
MAS / pg	36 (4)	2	30	4
MAS / Mu-Mos / pg	73 (5)	46	16	11
PSS / pg	53 (5)	46	7	0
PSAS / pg	40 (5)	3	31	6
PSAS / Mu-Mos / pg	25 (2)	18	4	3
PSAS / CA-Rsk / pg	35 (3)	6	10	19

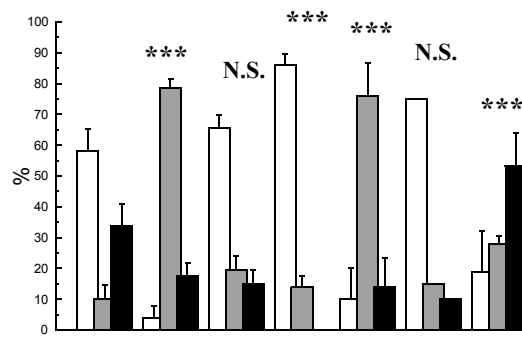
Table 1

Table 1. Effects of U0126, p39^{Mos}-MAS and PSAS oligonucleotides on spindle morphogenesis following progesterone -induced maturation. This table includes bipolar spindle morphogenesis rescue experiments by Mu-Mos, CA-Rsk injection in absence of MAP kinase pathway activation (pg : progesterone ; MS : p39^{Mos}- Sense Morpholino oligonucleotides ; MAS : p39^{Mos}- Antisense Morpholino oligonucleotides ; PSS : p39^{Mos}- Sense Phosphorothioate Oligonucleotides ; PSAS : p39^{Mos}- Antisense Phosphorothioate Oligonucleotides)

Figure 5



J



MS	+	-	-	-	-	-	-
MAS	-	+	+	-	-	-	-
PSS	-	-	-	+	-	-	-
PSAS	-	-	-	-	+	+	+
Mu-Mos	-	-	+	-	-	+	-
CA-Rsk	-	-	-	-	-	-	+

□ bipolar spindle
 ■ aster
 ■ no structure

Fig. 5. Rescue of bipolar spindle morphogenesis in absence of MAP kinase pathway activation by Mu-Mos, MEK or Rsk injection. (A) Metaphase spindle as observed in oocytes injected with 10 ng sense oligonucleotides and stimulated by progesterone after overnight incubation. **(B)** Aster-shaped microtubular structure as observed in oocytes injected with 10 ng antisense oligonucleotides against p39^{Mos} synthesis and stimulated by progesterone after overnight incubation. **(C)** Bipolar spindle with chromosomes as observed in oocytes injected with 10 ng antisense oligonucleotides against p39^{Mos} synthesis, incubated overnight and then injected with constitutively active murine Mos before progesterone treatment. **(D-F)** Typical aster-shaped microtubular structure with chromosomes as observed in oocytes injected with p39^{Mos} antisense oligonucleotides, incubated overnight and then injected with constitutively active Rsk prior to progesterone treatment. E : Hoechst staining. F : anti-tubulin staining of the same figure as E. G : merge of E and F. **(G-I)** Typical bipolar spindle with chromosomes as observed in oocytes treated with 50 μ M U0126, incubated one hour and injected with constitutively active Rsk before progesterone stimulation. H : Hoechst staining. I : anti-tubulin staining of the same figure as H. J : merge of H and I. **(J)** Histogram showing percentages of the different structure types observed in oocytes treated with p39^{Mos}-sense Morpholino oligonucleotides (MS), p39^{Mos}-antisense Morpholino oligonucleotides (MAS), p39^{Mos}-sense phosphorotioates oligonucleotides (PSS) or p39^{Mos}-antisense phosphorotioates oligonucleotides (PSAS) and rescue capacity of murine Mos and constitutively active Rsk injection into oocytes treated either with p39^{Mos}-antisense oligonucleotides (MAS or PSAS) and then incubated in presence of progesterone. White bars show percentages of normal bipolar spindles, grey bars show percentages of aster-shaped microtubular structures and black bars show percentages of oocytes lacking any microtubular structures. Error bars represent SEM values. Significativity toward p39^{Mos}-sense Morpholino oligonucleotides antisense/progesterone treatment is indicated.

N.S. : non significant ($p > 0.05$); * : significant ($p < 0.05$); ** : very significant ($p < 0.01$); *** : highly significant ($p < 0.001$).

Publication 2 :

Xp42^{Mpk1} activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes.

J.Biol.Chem., 2003, **278** (50) : 49714-49720.

Introduction

La progestérone stimule la maturation en activant une voie de signalisation indépendante de $p21^{\text{Ras}}$ alors que l'insuline ou l'IGF1 conduisent à la GVBD via des mécanismes de signalisation $p21^{\text{Ras}}$ -dépendants (Deshpande et Kung, 1987; Korn et coll., 1987). Dans ces conditions, $Xp42^{\text{Mpk1}}$ est phosphorylée et activée. L'activation de $Xp42^{\text{Mpk1}}$ et la GVBD sont inhibées par injection d'oligonucléotides phosphodiester antisens bloquant la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990). Au contraire, dans des ovocytes traités par la progestérone, la prévention de la synthèse et de l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ par injection d'oligonucléotides Morpholino antisens bloque l'activation de $Xp42^{\text{Mpk1}}$ mais la GVBD n'est que retardée (Dupre et coll., 2002a).

La MAPKK kinase Raf est également activée lors de la reprise méiotique stimulée par la progestérone ou par l'insuline. Certains travaux démontrent que son activité est requise pour activer $Xp42^{\text{Mpk1}}$ et permettre la GVBD (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b), tandis que d'autres travaux montrent *in vitro* que Raf est située en aval de $p39^{\text{Mos}}$ et de $Xp42^{\text{Mpk1}}$ (Shibuya et coll., 1996). Dans les cellules somatiques, l'activation Ras-dépendante de la voie ERK dépend de la phosphorylation de Mek1 et 2 par Raf (Morrison et Cutler, 1997; Schaeffer et Weber, 1999). Dans les ovocytes, $p39^{\text{Mos}}$ est responsable de la phosphorylation de Mek1 lors d'une stimulation par la progestérone alors qu'il est admis que Raf activerait Mek1 lors d'une stimulation par l'insuline (Shibuya et coll., 1996; Chesnel et coll., 1997).

Nos résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse d'une implication de $p39^{\text{Mos}}$ dans la morphogenèse du fuseau méiotique, indépendamment de la voie Mek1- $Xp42^{\text{Mpk1}}$ - $p90^{\text{Rsk}}$. Pour vérifier cette hypothèse, la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ a été inhibée par injection d'oligonucléotides phosphorothioates antisens de $p39^{\text{Mos}}$ ($p39^{\text{Mos}}$ -PSAS) dans des ovocytes stimulés par l'insuline. Le résultat attendu était l'activation de la voie Mek1- $Xp42^{\text{Mpk1}}$ - $p90^{\text{Rsk}}$ via Raf indépendamment de la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$. La

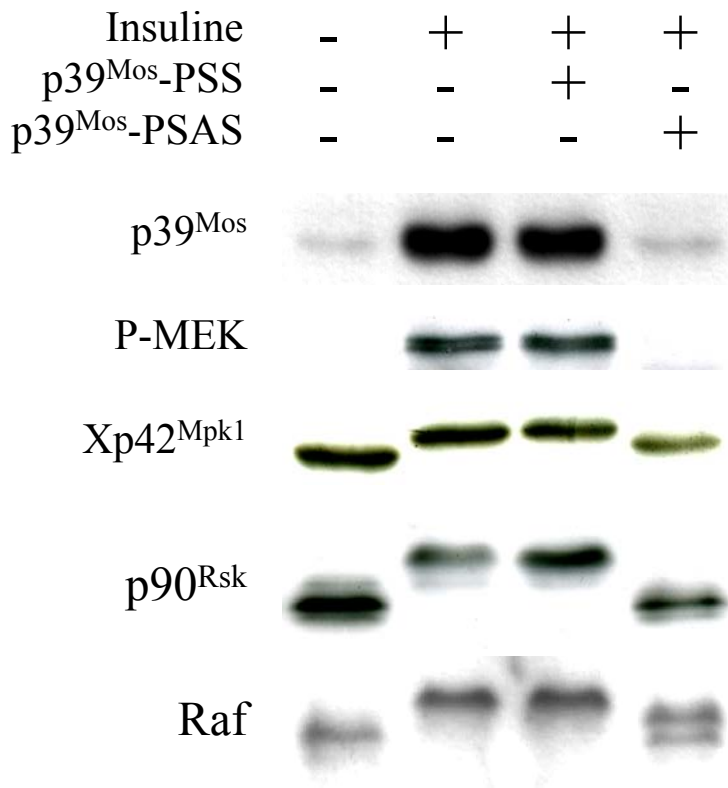


Figure 30 : Effets de l'injection d'oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39^{Mos} (p39^{Mos}-PSAS) sur l'activation de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} par l'insuline

spécificité de l'inhibition a été vérifiée par injection de protéine Mos murine (Mu-Mos). Cette étude a été complétée par l'utilisation d'U0126.

Résultats et discussion

Dans un premier temps, l'efficacité des oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39^{Mos} (p39^{Mos}-PSAS) a été testée en observant leurs effets sur la maturation induite par la progestérone. 10 ng de p39^{Mos}-PSAS ou d'oligonucléotides phosphorothioates sens (p39^{Mos}-PSS) sont injectés dans les ovocytes une nuit avant la stimulation hormonale. Les p39^{Mos}-PSAS ne bloquent jamais la GVBD mais la retardent (Publication 1 ; Publication 2, Fig. 1A). La synthèse de p39^{Mos}, l'activation de Xp42^{Mpk1} et la phosphorylation de p90^{Rsk} sont totalement inhibées. Raf est détectée sous forme partiellement phosphorylée (Publication 2, Fig. 1B). L'injection de protéine Mos murine (Mu-Mos) restaure les profils électrophorétiques identiques aux contrôles sans entraîner de synthèse de p39^{Mos} endogène (Publication 2, Fig. 1B).

En insuline, l'injection de p39^{Mos}-PSAS ne bloque pas mais retarde la reprise méiotique (Publication 2, Fig. 2A). L'accumulation de p39^{Mos} et la phosphorylation de Mek1 sont inhibées (Fig. 30 ; Publication 2, Fig. 2A), aucune activation de Xp42^{Mpk1}, même transitoire, n'est observée (Publication 2, Fig. 2B et Fig.3). Dans les ovocytes traités par les p39^{Mos}-PSAS, Raf est partiellement phosphorylée. Des profils électrophorétiques comparables à ceux des ovocytes témoins matures sont restaurés par l'injection de Mu-Mos. U0126 a les mêmes effets que les p39^{Mos}-PSAS sur la GVBD et la migration électrophorétique de Raf induites par l'insuline sans pour autant bloquer la synthèse et l'accumulation de p39^{Mos} (Publication 2, Fig. 4).

Nos résultats démontrent que la synthèse de p39^{Mos} est nécessaire à l'activation de Xp42^{Mpk1} lors d'une stimulation par l'insuline. Contrairement aux résultats obtenus au moyen d'oligonucléotides phosphodiester antisens de p39^{Mos} (p39^{Mos}-POAS ; (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990)), nous montrons que l'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} n'est pas nécessaire à la GVBD. Comme il a été suggéré pour

Traitement	Nombre d'ovocytes (nombre de femelles)	Fuseau bipolaire	Aster	Pas de structure microtubulaire
PSS / pg	53 (5)	46 (86.0%±3.6)	7 (14.0%±3.6)	0
PSAS / pg	40 (5)	3 (10.0%±10.0)	31 (76.0%±10.8)	6 (14.0%±9.3)
PSS / Ins	32 (3)	21 (66.7%±15.7)	6 (17.9%±13.9)	5 (15.3%±2.1)
PSAS / Ins	28 (3)	1 (4.8%±4.8)	25 (90%±4.9)	2 (5.1%±5.1)

Tableau 5 : Effets des oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39^{Mos} sur la reprise méiotique déclenchée par l'insuline

la progestérone (Dupre et coll., 2002a), les effets des p39^{Mos}-POAS ne seraient pas spécifiques. De plus, nos résultats *in vivo* montrent définitivement que la phosphorylation complète de Raf est sous le contrôle de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} lors d'une stimulation par l'insuline.

Parallèlement à cette analyse biochimique, nous avons entrepris une analyse cytologique des ovocytes injectés de p39^{Mos}-PSAS et stimulés par l'insuline. Les coupes histologiques des ovocytes ne montrent que très rarement un fuseau bipolaire (4,8% ± 4,8). Dans la majorité des cas, des structures microtubulaires de type aster sont observées (Résultats non publiés, Tableau 5). Ces résultats montrent une différence fortement significative ($p < 0.001$) par rapport aux témoins injectés de PSS mais ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus lorsque les ovocytes sont injectés de p39^{Mos}-PSAS et stimulés par la progestérone ($p = 0,45$). La voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} est impliquée dans la morphogénèse du fuseau méiotique, que les stimuli activent des voies Ras-dépendantes ou indépendantes.

Xp42^{Mpk1} Activation Is Not Required for Germinal Vesicle Breakdown but for Raf Complete Phosphorylation in Insulin-stimulated *Xenopus* Oocytes*

Received for publication, July 24, 2003, and in revised form, September 22, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 24, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308067200

Frédéric Baert, Jean-François Bodart‡, Béatrice Bocquet-Muchembled§, Arlette Lescuyer-Rousseau, and Jean-Pierre Vilain

From the Laboratoire de Biologie du Développement UPRES-EA1033, Bâtiment SN3, IFR118, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France

Fully grown G₂-arrested *Xenopus* oocytes resume meiosis *in vitro* upon exposure to hormonal stimulation. Progesterone triggers oocyte meiosis resumption through a Ras-independent pathway that involves a p39^{Mos}-dependent activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinases. Insulin also triggers meiosis resumption through a tyrosine kinase receptor that activates a Ras-dependent pathway leading to the MAP kinases activation. Antisense phosphorothioate oligonucleotides were used to prevent p39^{Mos} accumulation and Erk-like Xp42^{Mpk1} activation during insulin-induced *Xenopus* oocytes maturation. In contrast to previous works, prevention of p39^{Mos}-induced activation of Xp42^{Mpk1} in insulin-treated oocytes did not inhibit but delayed meiotic resumption, like in progesterone-stimulated oocytes. Activations of Xp42^{Mpk1}, the unique Erk of the oocyte, and of its downstream target p90^{Rsk}, were impaired and phosphorylation of the MAPKK kinase Raf was partially inhibited. Similarly, oocytes treated with the MEK inhibitor U0126, stimulated by insulin exhibited delayed germinal vesicle breakdown, absence of Xp42^{Mpk1} activation, and partial phosphorylation of Raf. To summarize, whereas p39^{Mos}-induced activation of MEK/MAPK pathway is dispensable for insulin-induced germinal vesicle breakdown, Xp42^{Mpk1} activation induced by insulin is dependent upon p39^{Mos} synthesis. Raf complete phosphorylation appears to require the MEK/MAPK pathway activation both in progesterone and insulin-stimulated oocytes.

Immature *Xenopus* oocytes are physiologically arrested at the G₂ stage of the first meiotic division. Meiosis resumes after stimulation by the steroid hormone progesterone and is marked by dissolution or breakdown of the germinal vesicle (GVBD),¹ resulting in the formation of a white spot at the animal pole. At the biochemical level, GVBD is initiated

through the activation of maturation-M phase promoting factor (MPF), a protein complex made up of p34^{Cdc2} kinase and cyclin B (1). Progesterone induces mRNA polyadenylation (2, 3) and synthesis of the Ser/Thr kinase p39^{Mos}. Consequently, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, including the MAPK/Erk kinases MEK 1 and 2 and the Erk Xp42^{Mpk1}, is activated. Xp42^{Mpk1} phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (p90^{Rsk}) that in turn inactivates Myt1, a negative regulator of MPF (4).

p39^{Mos} and its downstream targets induce meiotic resumption in the absence of progesterone when microinjected into prophase-arrested *Xenopus* oocytes (5–8). There are conflicting reports regarding the necessity of p39^{Mos} in progesterone-induced GVBD. Whereas injection of phosphodiester antisense oligonucleotides against p39^{Mos} mRNA has been shown to not only inhibit p39^{Mos} accumulation but also progesterone-induced GVBD (9, 10), inhibition of p39^{Mos} synthesis by morpholino antisense oligonucleotides has been shown recently to impair neither resumption of meiosis nor activation of MPF into progesterone-stimulated *Xenopus* oocytes (11). Moreover, other reports show that MEK 1/2 activity is not required for MPF activation induced by progesterone (12, 13).

Insulin and insulin growth factor can also trigger meiotic resumption (14, 15), through a tyrosine kinase receptor (16), inducing the activation of the MEK/MAPK pathway via the GTP-binding protein Ras (17, 18). Xp42^{Mpk1} activation induced by Ras can be impaired by dominant-negative forms of Raf in *Xenopus* oocytes and in oocytes extracts (19, 20), leading to the conclusion that activation of MEK in these cases occurs through Raf activity, like in somatic cells (21). However, p39^{Mos} synthesis and accumulation has also been reported after fibroblast growth factor 1 stimulation in *Xenopus* oocytes expressing fibroblast growth factor receptors (22) and in oocytes treated with insulin (23).

Ras activation is also known to stimulate Raf-independent pathways (for a review in somatic cells, see Ref. 24). In *Xenopus* oocytes, the phosphoinositide 3-kinase pathway (25–27), which leads to activation of protein kinase B/Akt, has been well described because recent data demonstrate a crucial role for protein kinase B/Akt in the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis (28, 29).

Injections in *Xenopus* oocytes of V12 H-Ras (30) and Raf (31) can trigger meiotic resumption without progesterone stimulation, independently of p39^{Mos}. Moreover, dominant-negative forms of Raf can prevent Mos injection-induced GVBD (31). Nevertheless, other results showed that dominant-negative forms of Raf do not block Mos-induced MAPK activation in oocyte extracts (32). In fact, Raf activation subsequently to Mos injection would be under the control of the MAPK pathway

* This work was supported by grants from the French “Ministère de l'Éducation Nationale” (UPRES-EA 1033). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-33-61-16; Fax: 33-3-20-43-40-38; E-mail: Jean-Francois.Bodart@univ-lille1.fr.

§ Present address: Laboratoire de Neuroimmunologie des annélides, CNRS UMR 8017, IFR118, Bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France.

¹ The abbreviations used are: GVBD, germinal vesicle breakdown; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase; MPF, M-phase promoting factor; mu-Mos, murine Mos-purified protein; PO, phosphodiester oligodeoxynucleotides; PS, phosphorothioate oligodeoxynucleotides; Rsk, ribosomal S6 kinase.

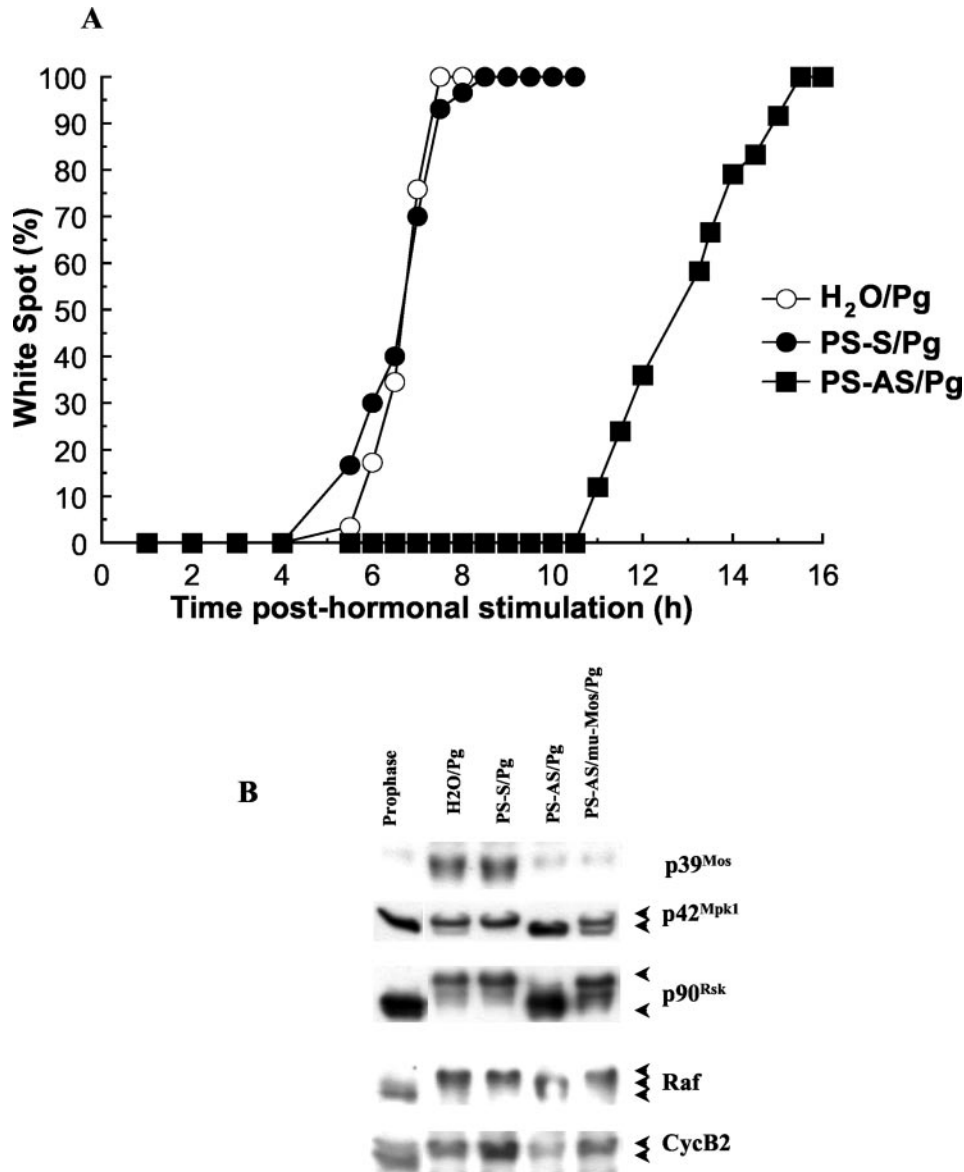


FIG. 1. p39^{Mos} inhibition by antisense phosphorothioate oligonucleotides during progesterone-induced maturation. *A*, time course occurrence of GVBD. Control oocytes were microinjected with water (*H₂O/Pg*; open circles) or sense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (*PS-S/Pg*; black circles). A batch of oocytes were microinjected with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (*PS-AS/Pg*; black squares). After overnight incubation, oocytes were stimulated by progesterone. Appearance of the *white spot* was monitored every 30 min. *B*, Western blot analysis. At the end of the maturation, 3 oocytes were taken off, homogenized, and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2. *Arrows* show phosphorylation states. In immature oocytes (prophase), p39^{Mos} was not detected, p42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, and Raf were found under their non-phosphorylated isoforms (*down arrows*) and cyclin B2 was found as a doublet of two isoforms. In control mature oocytes injected with water (*H₂O/Pg*), p39^{Mos} was synthesized and Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2 were found under their completely phosphorylated isoforms (*up arrows*). PS-S injection (*PS-S/Pg*) had no effects compared with water-injected oocytes (*H₂O/Pg*). PS-AS injection abolished p39^{Mos} synthesis, resulting in total inhibition of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylations and partial inhibition of Raf phosphorylation. It did not prevent cyclin B2 phosphorylation but we observed lower amounts of cyclin B2. Ability of a purified mu-Mos to overcome the effects of inhibition of p39^{Mos} synthesis was tested by injecting mu-Mos in PS-AS-treated oocytes just before hormonal stimulation (*PS-AS/mu-Mos/Pg*). Injection of mu-Mos restored normal phosphorylation of Raf, Xp42^{Mpk1}, and p90^{Rsk} and normal amounts of cyclin B2 compared with control mature oocytes.

itself (32). Despite all of these results, the hypothesis that p39^{Mos} might be dispensable to GVBD and MAP kinase activation induced by insulin has not yet been tested in *Xenopus* oocytes.

Therefore, we assessed the role of p39^{Mos} and activation of the Erk-Rsk pathway in maturation induced by insulin stimulation of immature *Xenopus* oocytes using phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides (PS-AS) to prevent p39^{Mos} synthesis and accumulation. Here, we show that activation of Xp42^{Mpk1} induced by p39^{Mos} is not essential for MPF activation and GVBD induced by insulin. These observations also highlight that the active MEK1/2-Xp42^{Mpk1} pathway is necessary for full activation of Raf, independently of p39^{Mos} accumulation.

MATERIALS AND METHODS

Handling of Oocytes—Adult *Xenopus* females were purchased from the University of Rennes I, France. After anesthesia with 1 g/liter MS222 (tricaine methanesulfonate, 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, pH 7.5 (NaOH)). Full-grown stage VI oocytes (33) were isolated and follicles were removed by collagenase treatment for 30 min (1 mg/ml collagenase A, Roche Applied Science), followed by manual microdissection. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments.

Experimental Conditions—Phosphorothioate deoxyoligonucleotides were purchased by Eurogentec. The sequence of the antisense against p39^{Mos} mRNA (PS-AS) was AAGGCATTGCTGTGTGACTCGCTGAAC. As a control we used the inverted sequence GTTTCAGCGAGTCTC-

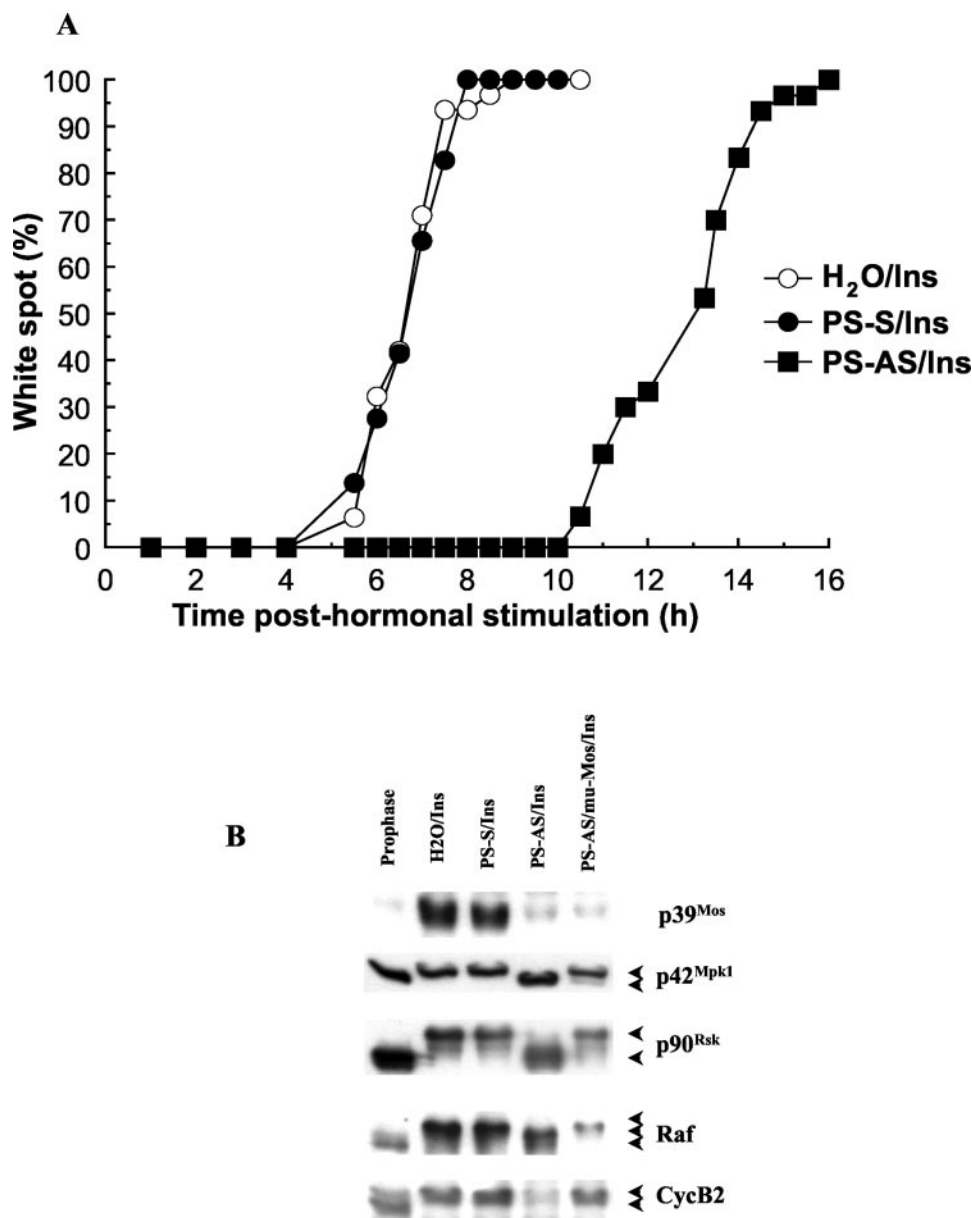


FIG. 2. p39^{Mos} inhibition by antisense phosphorothioate oligonucleotides during insulin-induced maturation. *A*, time course occurrence of GVBD. Control oocytes were microinjected with water (*H₂O/Ins*; open circles) or sense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (*PS-S/Ins*; black circles). A batch of oocytes were microinjected with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (*PS-AS/Ins*; black squares). After overnight incubation, oocytes were stimulated with insulin. Appearance of the white spot was monitored every 30 min. *B*, Western blot analysis. At the end of the maturation, 3 oocytes were taken off, homogenized, and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2. Arrows show phosphorylation states. In immature oocytes (prophase), p39^{Mos} was not detected, p42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, and Raf were found under their non-phosphorylated isoforms (down arrows) and cyclin B2 was found as a doublet of two isoforms. In control mature oocytes injected with water (*H₂O/Ins*), p39^{Mos} was synthesized and Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2 were found under their completely phosphorylated isoforms (up arrows). PS-S injection (*PS-S/Ins*) had no effect compared with water-injected oocytes (*H₂O/Ins*). PS-AS injection abolished p39^{Mos} synthesis, resulting in total inhibition of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylations and partial inhibition of Raf phosphorylation. It did not prevent cyclin B2 phosphorylation but we observed lower amounts of cyclin B2. Ability of a purified mu-Mos to overcome the effects of inhibition of p39^{Mos} synthesis was tested by injecting mu-Mos in PS-AS-treated oocytes just before hormonal stimulation (*PS-AS/mu-Mos/Ins*). Injection of mu-Mos restored normal phosphorylation of Raf, Xp42^{Mpk1}, and p90^{Rsk} and normal amounts of cyclin B2 compared with control mature oocytes.

ACACAGCAATGCCTT designed as sense oligonucleotides (PS-S) or 20 nl of RNase-free water. 10 ng (20 nl) were microinjected into each oocyte by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). Oocytes were then incubated in OR2 medium (82 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM HEPES, pH 7.5) overnight at 20 °C before insulin (1 μM) or progesterone (4 μg/ml; Sigma) treatment.

Purified murine Mos protein (mu-Mos) was kindly provided by Dr. Vande Woude and Dr. Ahn. 37.5 ng (50 nl) were injected into PS-AS-injected oocytes just before hormonal treatment. Control oocytes were injected with 50 nl of water.

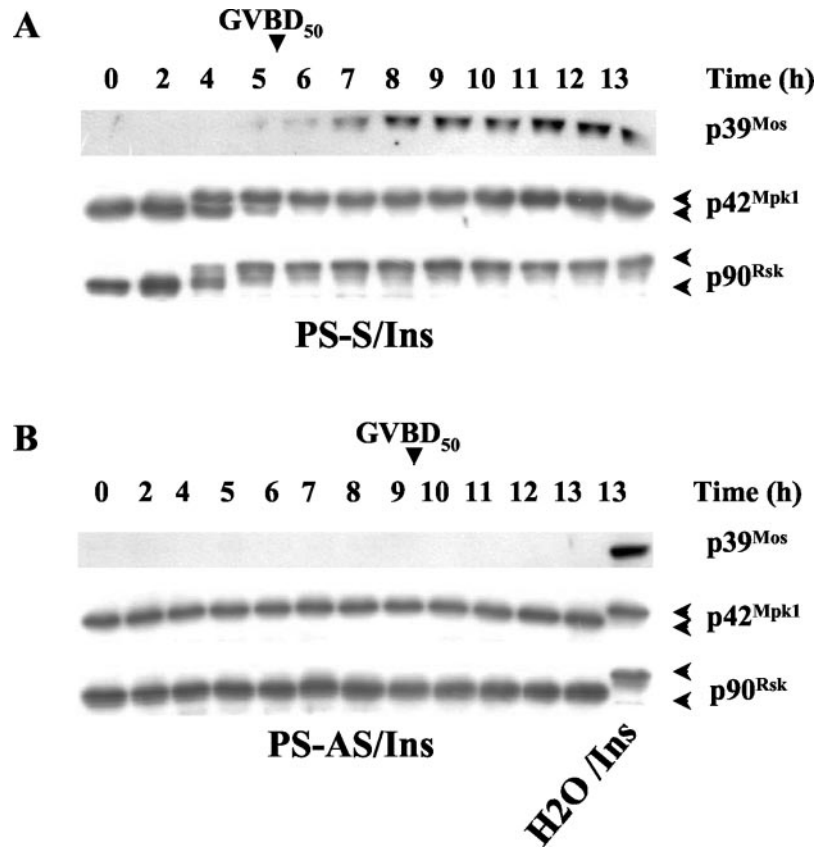
U0126 (Promega) was made soluble in Me₂SO to obtain a stock solution at 50 mM and was used at a final concentration of 50 μM.

Treatment began 1 h before insulin or progesterone addition. Control oocytes were treated with Me₂SO, 1/1000.

Batches were constituted from 30 to 60 oocytes that were observed every half-hour and scored for the appearance of white spot. GVBD₅₀ (time at which 50% of the oocytes showed a white spot) were estimated. The value in hours of GVBD₅₀ can be variable from one female to another. Each experiment was performed on at least 3 females. 3 oocytes were taken off at each time point for kinetic biochemical analysis or at the end of the maturation, respecting the ratio of the white spot, and conserved at -20 °C until homogenization (see below).

Electrophoresis and Western Blotting—Oocytes were taken off and homogenized in homogenization buffer (34) and then centrifuged for 5 min at 10,000 × *g* (4 °C) to eliminate yolk platelets. Proteins were then

FIG. 3. Insulin never activates the MAP kinase pathway in the absence of p39^{Mos} synthesis. Oocytes were microinjected with PS-S or PS-AS, incubated overnight in OR2 medium and then, stimulated by insulin. Each hour, 3 oocytes were taken off, homogenized, and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, and p90^{Rsk}, as described under "Materials and Methods." Time at which GVBD₅₀ had occurred is illustrated. **A**, 4 h after hormonal stimulation, phosphorylated forms of both Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} appeared. Only phosphorylated forms are observed around GVBD₅₀ time. **B**, 4 h after GVBD₅₀, no phosphorylated forms of both Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} could be detected. The last well (*H₂O/Ins*) shows control oocytes injected with water, incubated overnight, and then stimulated by insulin. Oocytes were taken off 13 h after stimulation.



separated by 10% mini-SDS-PAGE for p39^{Mos} immunodetection, by 12.5% mini-SDS-PAGE for Raf and cyclin B2 immunodetection, or by 17.5% modified mini-SDS-PAGE (23) for Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} immunodetection. Such gels allowed good discrimination between active and inactive proteins (35). Primary antibodies were diluted at 1/1000 in Tris-buffered saline. Xp42^{Mpk1} was detected using the monoclonal antibody D-2 (Santa Cruz Biotechnology). Cyclin B2 detection was performed using the rabbit polyclonal antibody JG103 (a gift of Dr. J. Gannon, ICRF, South Mimms, United Kingdom). p39^{Mos} was detected using the polyclonal antibody C238 (Santa Cruz Biotechnology) and p90^{Rsk} detection was performed using the polyclonal antibody C21 (Santa Cruz Biotechnology). Raf was detected using the polyclonal antibody C20 (Santa Cruz Biotechnology). Signals were revealed using the ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences).

RESULTS

p39^{Mos} Inhibition by Antisense Phosphorothioate Oligonucleotides during Progesterone-induced Maturation—We have first investigated the effects of PS-AS oligodeoxynucleotides against p39^{Mos} mRNA on progesterone-induced GVBD. Compared with classical phosphodiester oligodeoxynucleotides (PO), phosphorothioate oligodeoxynucleotides (PS) have a sulfur atom instead of an oxygen in the phosphate group, resulting in better nuclease resistance. This extends *in vivo* longevity of PS and allows better specificity. 10 ng of PS-AS were injected in each oocyte. Control oocytes were injected either with water or 10 ng of PS-S. Oocytes were then incubated overnight at 20 °C in OR2 medium before stimulation by progesterone. In our hands, inhibition of p39^{Mos} synthesis by PS-AS injection did not block GVBD but strongly delayed it (Fig. 1A). To verify if MPF was activated despite of inhibition of p39^{Mos} synthesis, cyclin B2 phosphorylation was assessed, because the latter is relevant for MPF activity (36, 37). In prophase-arrested oocytes, cyclin B2 is detected as a doublet of two isoforms, corresponding to the non-phosphorylated form of the protein whereas, upon hormonal stimulation, cyclin B2 is only detected under its sole phosphorylated form. Inhibition of translation of p39^{Mos} did not affect phosphorylation of cyclin B2. However,

detected amounts of cyclin B2 were drastically lower in antisense-injected oocytes than in control injected either with water or with sense oligonucleotides (Fig. 1B).

We verified on Western blot the activation of the MAP kinase pathway by detecting p39^{Mos} synthesis, the phosphorylation of Xp42^{Mpk1}, and the hyperphosphorylation of p90^{Rsk}. Phosphorylation of Xp42^{Mpk1} is a marker for its activation, which is confirmed by the hyperphosphorylation of p90^{Rsk}. In PS-AS-injected oocytes, p39^{Mos} was minimally detectable and Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} remained unactivated as demonstrated by the absence of an electrophoretic shift, whereas water or sense injection had no or little effect (Fig. 1B). In parallel, shifting up of Raf was also partially inhibited following PS-AS treatment (Fig. 1B). Indeed, on Western blot, Raf was detected in immature oocytes under its non-phosphorylated form. In mature oocytes injected with water or with PS-S, Raf was detected under a shifted up phosphorylated form. But in PS-AS-treated oocytes, progesterone stimulation resulted in detection of Raf as an intermediary shift between non-phosphorylated and completely phosphorylated forms (Fig. 1B). To control for eventual nonspecific effects of PS-AS, purified mu-Mos protein was injected before progesterone stimulation into PS-AS-injected oocytes. We observed that mu-Mos was able to revert all the effects of PS-AS on progesterone treatment (Fig. 1B). Although PS-AS injection appeared to strongly prevent p39^{Mos} accumulation, a small amount of Mos may still accumulate in PS-AS-injected oocytes either stimulated by insulin or progesterone (Figs. 1 and 2). However, it failed to activate Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} because we were unable to detect activated isoforms of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk}.

Our results show that phosphorylation of Xp42^{Mpk1} and of its downstream target p90^{Rsk} induced by progesterone are dependent upon p39^{Mos} synthesis. Moreover, progesterone-induced GVBD occurs even when activation of these pathways are almost completely suppressed.

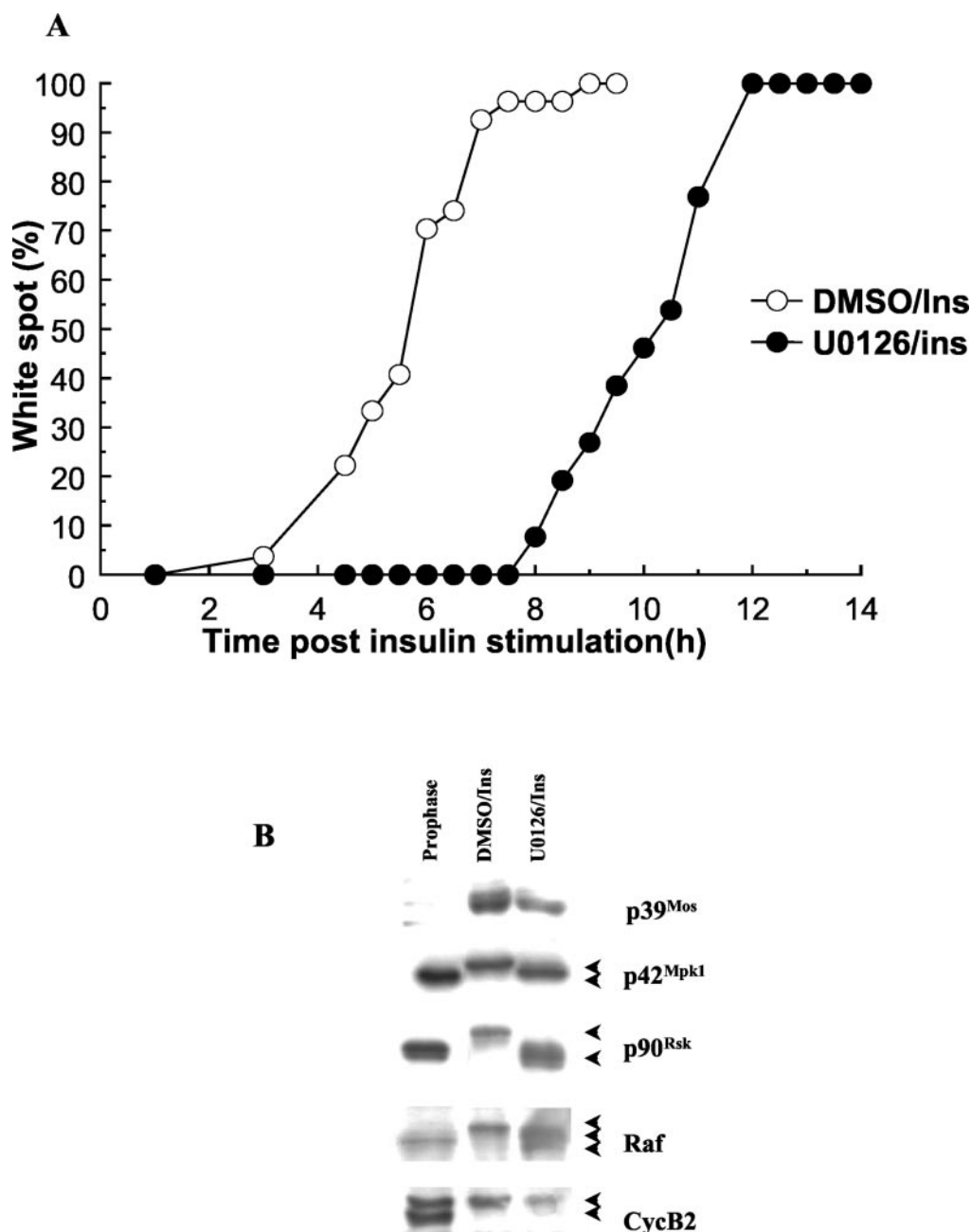


FIG. 4. **Effects of MEK inhibitor U0126 on insulin-induced maturation.** Control oocytes were incubated in OR2 medium containing 1/1000 Me₂SO (*DMSO/Ins*; open circles). U0126-inhibited oocytes were incubated in OR2 medium containing 50 μ M U0126 (*U0126/Ins*; black circles). 1 h after beginning the incubation, insulin was added to the medium. **A**, time course occurrence of GVBD. Appearance of the *white spot* was monitored every hour. **B**, Western blot analysis. At the end of maturation, 3 oocytes were taken off, homogenized, and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2. *Arrows* show phosphorylation states. In immature oocytes (prophase), p39^{Mos} was not detected, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, and Raf were found under their non-phosphorylated isoforms (*down arrows*) and cyclin B2 was found as a doublet of two isoforms. In control mature oocytes incubated in Me₂SO (*DMSO/Ins*), p39^{Mos} was synthesized and Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, Raf, and cyclin B2 were found under their completely phosphorylated isoforms (*up arrows*). U0126 treatment resulted in total inhibition of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylations and partial inhibition of Raf phosphorylation. It did not prevent cyclin B2 phosphorylation but we observed lower amounts of cyclin B2. At last, U0126 did not prevent synthesis of p39^{Mos}.

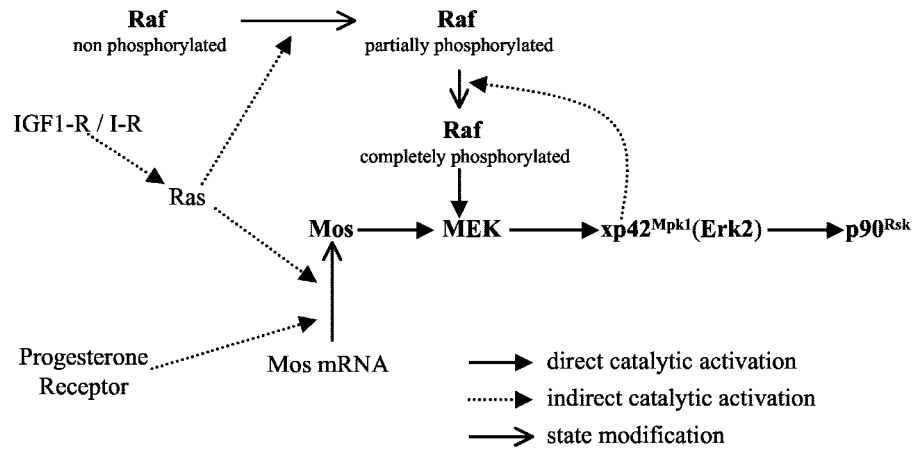
p39^{Mos} Inhibition by Antisense Phosphorothioate Oligonucleotides during Insulin-induced Maturation—To test the effects of the inhibition of p39^{Mos} accumulation on GVBD and Raf phosphorylation induced by insulin, oocytes were injected with 10 ng of PS-AS and incubated overnight before stimulation by insulin. Minimal accumulation of p39^{Mos} but no activation of Xp42^{Mpk1} nor p90^{Rsk}, even transitory, was observed (Figs. 2B and 3). Injection of PS-S had little or no effect on the rate or extent of GVBD in comparison to control oocytes injected with deionized water. In contrast, injection of PS-AS significantly delayed GVBD (Fig. 2A). GVBD₅₀ of PS-S-injected oocytes was

1.12 ± 0.02 -fold of GVBD₅₀ of control oocytes, whereas GVBD₅₀ of PS-AS-injected oocytes happened almost two times later than in control water-injected oocytes (1.92 ± 0.09 GVBD₅₀).

Inhibition of p39^{Mos} synthesis by PS-AS did not prevent phosphorylation of cyclin B2 (Fig. 2B) but delayed it (not shown). Nevertheless, amounts of cyclin B2 detected in matured oocytes injected with PS-AS were dramatically lower than in control and immature oocytes (Fig. 2B).

To control for eventual nonspecific effects of PS-AS, we injected purified mu-Mos protein just before insulin stimulation into oocytes that had been treated with PS-AS. We observed

FIG. 5. Model for the MAP kinase pathways activation during insulin and progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes (modified after Shibuya, Ref. 32). Both insulin and progesterone pathways require p39^{Mos} synthesis to promote phosphorylation of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk}. In both cases, partial Raf phosphorylation can occur independently of this MAP kinase pathway but achievement of Raf phosphorylation requires activity of the p39^{Mos}/Xp42^{Mpk1} pathway.



that mu-Mos was able to revert the effects of PS-AS on insulin treatment. GVBD delay was abolished (data not shown), electrophoretic shifts of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were observed demonstrating their phosphorylation and normal amounts of cyclin B2 were detected as in control oocytes (Fig. 2B).

Surprisingly, phosphorylation of Raf was partially inhibited by p39^{Mos} synthesis inhibition in insulin-stimulated oocytes injected with PS-AS (Fig. 2B). Complete phosphorylation was restored by injection of purified mu-Mos protein that also restored Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} activation (Figs. 1B and 2B).

To determine whether complete phosphorylation of Raf is dependent upon MAP kinase activity, oocytes were treated with MEK inhibitor U0126 and stimulated by insulin. Whereas U0126 prevented insulin-induced activation of both Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} (Fig. 4B), it did not prevent insulin-induced GVBD. Rather, GVBD was delayed (1.82 GVBD₅₀ of control oocytes; Fig. 4A). In accordance with the previous results, U0126 also reduced cyclin B2 amounts but did not prevent cyclin B2 phosphorylation (Fig. 4B).

Partial inhibition of Raf phosphorylation in PS-AS-injected oocytes appeared to result from the absence of Xp42^{Mpk1} activity rather than the consequence of p39^{Mos} absence itself. Indeed, when U0126-treated oocytes were stimulated with insulin, it triggered p39^{Mos} synthesis even if Xp42^{Mpk1} activation was prevented. In such conditions, Raf phosphorylation was partial, even in the presence of p39^{Mos}, suggesting that complete phosphorylation of Raf is dependent upon Xp42^{Mpk1} activity or its downstream effectors (Fig. 4B).

These results suggest first that p39^{Mos} is required for insulin-induced activation of MAPK and that insulin can induce GVBD independently of MEK/MAPK activation. Second, activity of the MAP kinases pathway, following p39^{Mos} activation, is required for complete phosphorylation of the MAPKK kinase Raf.

DISCUSSION

Two contradictory approaches have been used before ours to prevent p39^{Mos} synthesis and accumulation during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes: first, PO-AS against p39^{Mos} mRNA were used, which completely inhibited GVBD (9, 10). Second, morpholino strategy revealed that the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway was not required for progesterone-induced GVBD and that PO-AS inhibition of maturation resulted from a nonspecific effect (11). In our hands, injection of PS-AS against p39^{Mos} mRNA, followed by progesterone stimulation, greatly diminished p39^{Mos} accumulation and Xp42^{Mpk1} activation as shown by the absence of phosphorylation of both Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk}. However, PS-AS were unable to block GVBD, according to results obtained with morpholinos (Ref. 11 and data not shown) and suggesting that, like morpholino

oligonucleotides, PS-AS do not have nonspecific effects. We cannot exclude the possibility that the minimal amount of p39^{Mos} may influence GVBD as has been shown to occur previously (38).

Results obtained with PO-AS strategy that were used to prevent p39^{Mos} accumulation in insulin-stimulated oocytes have to be reconsidered. Injection of such PO-AS resulted in complete inhibition of GVBD (9, 10). We assessed the effects of the more specific PS-AS on insulin-induced maturation. In contrast to PO-AS (9, 10), PS-AS injection did not block insulin-induced GVBD. However, insulin failed to activate Xp42^{Mpk1} independently of p39^{Mos}. This observation was surprising because p39^{Mos} and Raf have been shown in cell-free extracts to independently act to stimulate the Xp42^{Mpk1} pathway (32). Moreover, dominant-negative forms of Raf inhibit Xp42^{Mpk1} activation induced by oncogenic Ras protein both in *Xenopus* oocytes and in oocyte extracts (19, 32, 39, 40). All these observations led to the conclusion that, during Ras-induced meiotic resumption, Xp42^{Mpk1} is under control of Raf. In opposite, following progesterone stimulation, which is independent of Ras, Xp42^{Mpk1} is under the control of p39^{Mos} (11). In contrast to these views, our results indicate that p39^{Mos} is required for Xp42^{Mpk1} activation following stimulation of the tyrosine kinase receptor by insulin (Fig. 5). Results obtained by inhibition of Raf with dominant-negative forms might be explained by the fact that dominant-negative forms were truncated from their catalytic domains but still contained the Ras-binding domain. Also, these dominant-negative forms may have an inhibitory effect directly on Ras (32).

Most strikingly, Xp42^{Mpk1} activation by p39^{Mos} but not p39^{Mos} itself appeared to be necessary for complete phosphorylation of Raf because PS-AS partially prevented Raf phosphorylation. Total phosphorylation of Raf was rescued by injection of exogenous mu-Mos protein. Raf has been shown to be activated in response to Ras activity after growth factor stimulation in somatic cells (for a review, see Ref. 21) and it has been proposed that the human oncogenic pathway involved Raf/MEK1/Xp42^{Mpk1} cascade (10, 19, 41, 42). Insulin-induced activation of Ras might account for partial phosphorylation of Raf observed in PS-AS-injected oocytes. However, interaction between Ras and Raf have been demonstrated to be insufficient to stimulate Raf activity *in vitro* (43, 44). Our results in *Xenopus* oocytes suggest that Raf activation is a multistep process involving activation of Xp42^{Mpk1} activity (Fig. 5).

In PS-AS-treated oocytes, MPF activation as assessed by cyclin B2 phosphorylation, and GVBD were both delayed but not prevented in contrast to results obtained with PO-AS (9, 10). As well, U0126 treatment resulted in such a delay in GVBD and did not prevent MPF activation. p90^{Rsk} and its

upstream activator Xp42^{Mpk1} have been suggested to indirectly activate pre-MPF by inhibiting Myt1 activity (4), and their activities, if not necessary for GVBD, are required for timely maturation to occur. In addition, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} have been demonstrated to be responsible for suppression of replication between meiosis I and II and in cyclin B2 stabilization at metaphase II (11, 45). Thus, absence of activity of these proteins could explain the decrease of the cyclin B2 level in the cells.

As observed in U0126-treated oocytes, p39^{Mos} synthesis induced by insulin is mainly controlled, if not totally, by a Xp42^{Mpk1}-independent mechanism. In contrast to reported involvement of MAPK in a feedback loop that controls p39^{Mos} synthesis (46), our results strengthen the observations that MPF-dependent mechanisms might positively regulate p39^{Mos} synthesis (47, 48). Indeed, p39^{Mos} accumulation can be observed in U0126-treated oocytes stimulated to resume meiosis either with progesterone (13) or by egg cytoplasm injection.² MPF could exert its positive control on p39^{Mos} accumulation by phosphorylating and stabilizing the p39^{Mos} oncoprotein (49) or by phosphorylating directly or indirectly the cytoplasmic polyadenylation element-binding protein whose activation is necessary for p39^{Mos} mRNA polyadenylation. Indeed, p39^{Mos} mRNA polyadenylation has been shown to be a crucial step in p39^{Mos} synthesis (3). Then, insulin is able to induce p39^{Mos} accumulation in U0126-treated oocytes through activation of MPF independently of Xp42^{Mpk1}.

Alternate pathways that can be induced by Ras independently of Raf (50) might explain MPF activation observed in the absence of Xp42^{Mpk1} activity. The best candidate is the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway (27–29, 51). Akt has been shown to be acting through phosphorylation of Myt1 (52).

Nevertheless, involvement of MAPK family members in insulin-induced G₂/M transition other than Xp42^{Mpk1} should not be discarded because p38^{MAPK} have been involved in proliferation in many cell types (53) and because c-Jun kinase is activated during oocytes maturation (54). Then, both might be able to indirectly activate pre-MPF stored in prophase-arrested oocytes by the above mentioned mechanisms.

To conclude, our results showed that *Xenopus* oocyte provides us the first known model of the tyrosine kinase receptor signaling pathway implying the proto-oncogene p39^{Mos} in the MAP kinases pathway activation. It gives us unique opportunities for analyzing linear pathways and interdependences of complex signal transduction of Ras-dependent and independent pathways.

Acknowledgments—We gratefully thank Dr. N. Duesbery for critical reading of the manuscript and helpful discussions. We also thank Dr. G. Vande Woude and Dr. Ahn for providing the mu-Mos protein and Dr. J. Gannon for the generous gift of the anti-cyclin antibodies. We are also grateful to Dr. A.-F. Antoine, Dr. E. Browaeys, and Dr. K. Cailliau for reading the manuscript.

REFERENCES

- Nurse, P., Masui, Y., and Hartwell, L. (1998) *Nat. Med.* **4**, 1103–1106
- Sheets, M. D., Wu, M., and Wickens, M. (1995) *Nature* **374**, 511–516
- Barkoff, A., Ballantyne, S., and Wickens, M. (1998) *EMBO J.* **17**, 3168–3175
- Palmer, A., Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1998) *EMBO J.* **17**, 5037–5047
- Yew, N., Mellini, M. L., and Vande Woude, G. F. (1992) *Nature* **355**, 649–652
- Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R. S., Erikson, E., and Maller, J. L. (1995) *Dev. Biol.* **168**, 677–682
- Huang, W., Kessler, D. S., and Erikson, R. L. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 237–245
- Gross, S. D., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46099–46103
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., and Vande Woude, G. F. (1988) *Nature* **335**, 519–525
- Barrett, C. B., Schroetke, R. M., Van der Hoorn, F. A., Nordeen, S. K., and Maller, J. L. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 310–315
- Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R., and Haccard, O. (2002) *EMBO J.* **21**, 4026–4036
- Fisher, D. L., Brassac, T., Galas, S., and Doree, M. (1999) *Development* **126**, 4537–4546
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y. W., and Maller, J. L. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 430–438
- El-Etr, M., Schorderet-Slatkine, S., and Baulieu, E. E. (1979) *Science* **205**, 1397–1399
- Grigorescu, F., Baccara, M. T., Rouard, M., and Renard, E. (1994) *Horm. Res.* **42**, 55–61
- Zhu, L., Ohan, N., Agazie, Y., Cummings, C., Farah, S., and Liu, X. J. (1998) *Endocrinology* **139**, 949–954
- Deshpande, A. K., and Kung, H. F. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1285–1288
- Korn, L. J., Siebel, C. W., McCormick, F., and Roth, R. A. (1987) *Science* **236**, 840–843
- Fukuda, M., Gotoh, Y., Kosako, H., Hattori, S., and Nishida, E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 33097–33101
- Chie, L., Amar, S., Kung, H. F., Lin, M. C., Chen, H., Chung, D. L., Adler, V., Ronai, Z., Friedman, F. K., Robinson, R. C., Kovac, C., Brandt-Rauf, P. W., Yamaizumi, Z., Michl, J., and Pincus, M. R. (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45**, 441–449
- Kolch, W. (2000) *Biochem. J.* **351**, 289–305
- Cailliau, K., Browaeys-Poly, E., and Vilain, J. P. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1538**, 228–233
- Chesnel, F., Bonnet, G., Tardivel, A., and Boujard, D. (1997) *Dev. Biol.* **188**, 122–133
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C. J. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 147–154
- Liu, X. J., Sorisky, A., Zhu, L., and Pawson, T. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3563–3570
- Deuter-Reinhard, M., Apell, G., Pot, D., Klippel, A., Williams, L. T., and Kavanaugh, W. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2559–2565
- Lopez-Hernandez, E., and Santos, E. (1999) *FEBS Lett.* **451**, 284–288
- Andersen, C. B., Roth, R. A., and Conti, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18705–18708
- Andersen, C. B., Sakae, H., Nedachi, T., Kovacina, K. S., Clayberger, C., Conti, M., and Roth, R. A. (2003) *Biochem. J.* **369**, 227–238
- Dupre, A., Suziedelis, K., Valuckaitis, R., de Gunzburg, J., Ozon, R., Jessus, C., and Haccard, O. (2002) *Oncogene* **21**, 6425–6433
- Muslin, A. J., MacNicol, A. M., and Williams, L. T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4197–4202
- Shibuya, E. K., Morris, J., Rapp, U. R., and Ruderman, J. V. (1996) *Cell Growth Differ.* **7**, 235–241
- Dumont, J. N. (1972) *J. Morphol.* **136**, 153–179
- Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A. C., Lew, J., and Wang, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13279–13288
- Bodart, J. F., Bechar, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J. P., and Flament, S. (1999) *Exp. Cell Res.* **253**, 413–421
- Hochegger, H., Klotzbucher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M., and Hunt, T. (2001) *Development* **128**, 3795–3807
- Bodart, J. F., Gutierrez, D. V., Nebreda, A. R., Buckner, B. D., Resau, J. R., and Duesbery, N. S. (2002) *Dev. Biol.* **245**, 348–361
- Peter, M., Labbe, J. C., Doree, M., and Mandart, E. (2002) *Development* **129**, 2129–2139
- Fabian, J. R., Morrison, D. K., and Daar, I. O. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 645–652
- Radziwill, G., Steinhilber, U., Aitken, A., and Moelling, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 20–26
- Nebreda, A. R., Porras, A., and Santos, E. (1993) *Oncogene* **8**, 467–477
- Pomerance, M., Thang, M. N., Tocque, B., and Pierre, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3179–3186
- Traverse, S., Cohen, P., Paterson, H., Marshall, C., Rapp, U., and Grand, R. J. (1993) *Oncogene* **8**, 3175–3181
- Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1993) *Nature* **364**, 308–313
- Bodart, J. F., Flament, S., and Vilain, J. P. (2002) *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 570–574
- Howard, E. L., Charlesworth, A., Welk, J., and MacNicol, A. M. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1990–1999
- Ballantyne, S., Daniel, D. L., Jr., and Wickens, M. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 1633–1648
- Frank-Vaillant, M., Jessus, C., Ozon, R., Maller, J. L., and Haccard, O. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 3279–3288
- Castro, A., Peter, M., Magnaghi-Jaulin, L., Vigneron, S., Galas, S., Lorca, T., and Labbe, J. C. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 2660–2671
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossmann, K. L., Clark, G. J., and Der, C. J. (1998) *Oncogene* **17**, 1395–1413
- Hehl, S., Stoyanov, B., Oehrl, W., Schonherr, R., Wetzker, R., and Heinemann, S. H. (2001) *Biochem. J.* **360**, 691–698
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada, S. S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2002) *Nat. Cell. Biol.* **4**, 111–116
- Nebreda, A. R., and Porras, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257–260
- Bagowski, C. P., and Ferrell, J. E., Jr. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 1176–1182

² C. Sellier and J.-F. Bodart, unpublished observations.

Conclusions et perspectives

Inhibiteur	Effet	Effet sur la GVBD		Références
		Progestérone	Insuline	
α corps anti-Ras	Inactive Ras	Aucun	Inhibition	Deshpande et Kung, 1987 Korn et coll., 1987
DN Raf	Inactive Ras et Raf	Inhibition	N.D.	Muslin et coll., 1993
		Retard	N.D.	Fabian et coll., 1993
p39 ^{Mos} -POAS	Inhibe l'accumulation p39 ^{Mos}	Inhibition	Inhibition	Sagata et coll., 1988 Barrett et coll., 1990
p39 ^{Mos} -MAS	Inhibe l'accumulation p39 ^{Mos}	Retard	N.D.	Dupré et coll., 2002
Geldanamycine	Inhibe p39 ^{Mos}	Retard	Inhibition	Fisher et coll., 1999
LF	Clive et inactive l'ensemble des Mek	Inhibition	N.D.	Duesbery et coll., 1998 Bodart et coll., 2002a Chopra et coll., 2003
PD98059	Inhibe Mek 1 et 2	Inhibition	N.D.	Cross et Smythe, 1998
U0126	Inhibe Mek 1 et 2	Retard	N.D.	Gross et coll., 2000
α corps anti-Erk	Inactive les MAP kinases	Inhibition	N.D.	Gotoh et Nishida, 1995
ARNm MKP1	Inactive Xp42 ^{Mpk1}	Inhibition	N.D.	Gotoh et coll., 1995 Howard et coll., 1999
ARNm MKP3	Déphosphoryle Xp42 ^{Mpk1}	Retard	N.D.	Fisher et coll., 1999

Tableau 3 : Effets de différents inhibiteurs des voies MAP kinase sur la reprise méiotique des ovocytes de xénope

α corps : anticorps ; DN : Dominant négatif ; LF : Facteur létal de la toxine de l'anthrax ; MAS Mos : oligonucléotides antisens Morpholino contre la synthèse de p39^{Mos} ; N.D. : Non déterminé ; POAS Mos : oligonucléotides antisens phosphodiester contre la synthèse de p39^{Mos}

Rôle des voies MAP kinases dans la reprise méiotique des ovocytes de xénope

Le rôle des voies MAP kinases est actuellement très controversé. Certaines expériences montrent que l'inhibition de la voie $p39^{Mos}$ -Mek1-Xp42^{Mpk1} bloque totalement l'activité MPF et la GVBD. Selon d'autres expériences, l'inhibition des voies MAP kinases n'entraîne qu'un retard de l'activité MPF et de la GVBD (Tableau 3).

La stratégie d'inhibition de la synthèse de $p39^{Mos}$ par des oligonucléotides antisens a conduit à des résultats très contrastés en fonction des modifications portées par les oligonucléotides. En comparant les effets d'oligonucléotides antisens de type phosphodiester au Morpholino, Dupré et collaborateurs (Dupre et coll., 2002a) ont conclu que les effets des oligonucléotides phosphodiester antisens de $p39^{Mos}$ utilisés jusqu'à présent (Sagata et coll., 1988; Barrett et coll., 1990) n'inhibent pas seulement la synthèse de $p39^{Mos}$. L'injection d'oligonucléotides antisens de $p39^{Mos}$ de type Morpholino (Dupré et coll., 2002; Publication 1) ou de type phosphorothioate (Publications 1 et 2), bloque sans ambiguïté la synthèse et l'accumulation de $p39^{Mos}$ ainsi que l'activation de Xp42^{Mpk1}. Dans toutes ces conditions, la GVBD n'est jamais inhibée mais elle est retardée. Bien que l'injection de $p39^{Mos}$ soit suffisante pour activer $p34^{Cdc2}$ et la GVBD, la voie $p39^{Mos}$ -Mek1-Xp42^{Mpk1} n'est pas nécessaire à l'activation du MPF et la GVBD. Les travaux réalisés avec la geldanamycine et U0126 confirment que l'inhibition de la voie $p39^{Mos}$ -Mek1-Xp42^{Mpk1} ne bloque pas la GVBD. L'inhibition partielle de la GVBD observée en présence de geldanamycine est vraisemblablement due à un effet non spécifique de l'inhibiteur. Quelle que soit la stratégie d'inhibition utilisée, l'activation de Xp42^{Mpk1} et l'hyperphosphorylation de $p90^{Rsk}$ sont toujours complètement inhibées. Contrairement à ces derniers résultats, Dupré et collaborateurs observent une phosphorylation partielle de $p90^{Rsk}$ en dépit de l'absence de phosphorylation de Xp42^{Mpk1} (Dupre et coll., 2002a). Des résultats similaires obtenus dans les ovocytes

Conclusions et perspectives

de souris suggèrent que p90^{Rsk} pourrait être activée indépendamment de MAP kinase (Kalab et coll., 1996).

Les résultats de Dupré et collaborateurs, ainsi que les nôtres, démontrent définitivement que la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} n'est pas nécessaire à l'activation du MPF et à la GVBD en présence de progestérone ou d'insuline. Cependant, le LF bloque complètement la GVBD (Duesbery et coll., 1998; Bodart et coll., 2002b) : il clive et inhibe toutes les MAPK kinases. Il a été montré que la phosphatase Mkp1/CL100 déphosphoryle préférentiellement Jnk et p38^{MAPK} tout en ayant une action plus faible sur Erk 1 et 2 (Franklin et Kraft, 1995; Liu et coll., 1995b; Raingeaud et coll., 1995; Chu et coll., 1996; Groom et coll., 1996; Gupta et coll., 1996; Franklin et Kraft, 1997). Mkp1/CL100 est donc susceptible d'inhiber toutes les voies MAP kinases de l'ovocyte. Selon ces résultats, l'inhibition de toutes les voies MAP kinases préviendrait complètement la reprise méiotique. Les voies MAP kinases seraient requises pour l'activation du MPF et la réalisation de la GVBD. La voie de Xp42^{Mpk1} mènerait à l'inhibition de Myt1 (Palmer et coll., 1998) et la voie de Xp38y mènerait à l'activation de Cdc25 (Perdiguero et coll., 2003).

Activation de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} : rôle de p39^{Mos} et de Raf

Il était généralement admis que Raf était la MEK kinase responsable de l'activation de la voie Mek1-Xp42Mpk1 lorsque les ovocytes sont stimulés par l'insuline (Shibuya et coll., 1996; Chesnel et coll., 1997). Sagata et collaborateurs (Sagata et coll., 1988) ont démontré que l'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} bloque complètement l'activation de la voie MAP kinase et la GVBD en insuline. Ces travaux n'ont pourtant jamais été remis en question contrairement à ceux réalisés en progestérone (Dupre et coll., 2002a). Nos travaux démontrent clairement que l'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} prévient l'activation de Xp42^{Mpk1} et la phosphorylation de p90^{Rsk} lorsque les ovocytes sont stimulés par la voie Ras-dépendante de l'insuline. En insuline comme en progestérone, l'activation de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} est donc dépendante de la synthèse et de l'accumulation de p39^{Mos}.

Raf est également phosphorylée pendant la maturation des ovocytes stimulés par l'insuline ou par la progestérone (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b). Nous montrons que l'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} ou de Mek1 entraîne une même réduction partielle de la mobilité électrophorétique de Raf. La mobilité électrophorétique de Raf reflète son état de phosphorylation et son état d'activation (Fabian et coll., 1993b; Muslin et coll., 1993b; Chesnel et coll., 1997). Nos résultats démontrent que la phosphorylation de Raf est partiellement dépendante de la cascade p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}. Nos résultats ne confortent pas l'hypothèse d'une implication de Raf dans l'activation de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1}.

Pour aborder ce problème, nous avons étudié l'état de phosphorylation de Mek1 qui est la cible potentielle de p39^{Mos} et de Raf. L'inhibition de la synthèse de p39^{Mos} bloque complètement la phosphorylation de Mek1 alors que Raf1 n'est que partiellement phosphorylée. La forme partiellement phosphorylée de Raf est donc incapable d'induire la phosphorylation de Mek1. En U0126, la phosphorylation partielle de Raf présente le même profil électrophorétique que celui observé lorsque la synthèse de p39^{Mos} est abolie. Dans ces conditions, Mek1 est phosphorylée alors que p39^{Mos} s'accumule dans les ovocytes mais en quantité plus faible (publication 1). La forme partiellement phosphorylée de Raf étant incapable de phosphoryler Mek1, nous pouvons conclure que p39^{Mos} accumulée en présence d'U0126 est suffisante pour phosphoryler Mek1. Dans les ovocytes de xénope, U0126, inhibiteur de MEK, ne supprime pas la phosphorylation de Mek1 et donc exercerait son effet en bloquant l'activité de cette dernière. Enfin, lorsque la synthèse de p39^{Mos} est supprimée, l'injection de CA-Rsk ne permet pas de restaurer la phosphorylation totale de Raf. Celle-ci serait donc sous le contrôle direct de Mek1 ou de Xp42^{Mpk1}. Les phosphorylations de Raf sont donc sous le contrôle de deux voies : une voie indépendante de l'activation de la cascade p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} qui reste à déterminer ; la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} qui conduit à l'obtention d'un profil électrophorétique complet tel qu'il est observé dans des ovocytes matures. L'implication de Mek1 ou de Xp42^{Mpk1} dans la phosphorylation complète de Raf pourra être résolue par injection

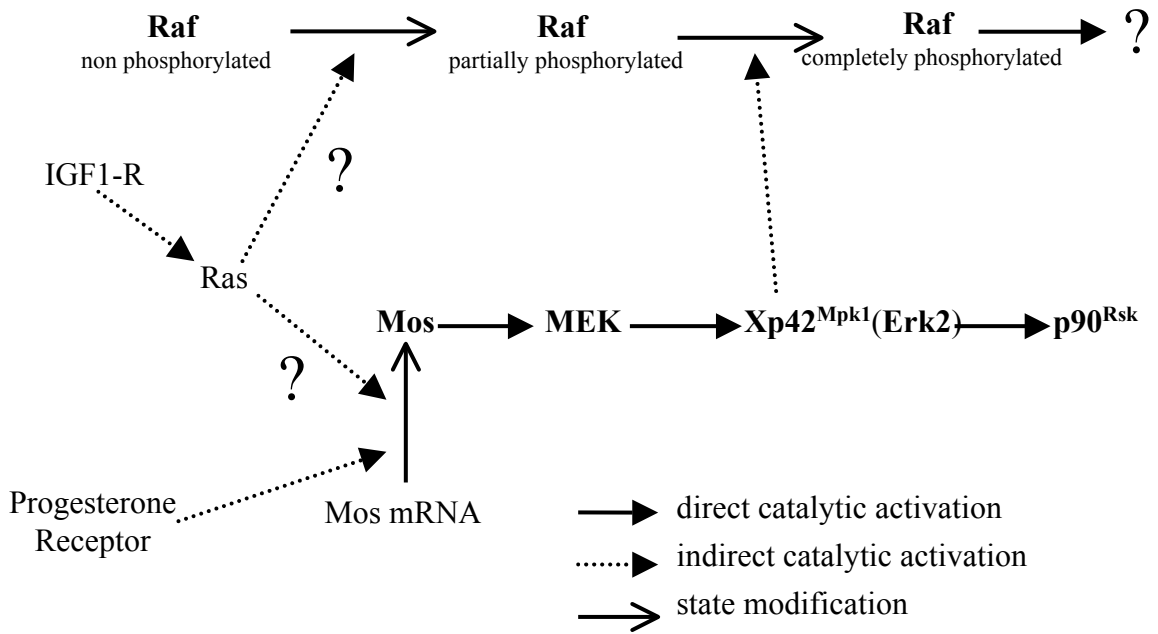


Figure 31 : Schéma d'activation de la voie MEK1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans les ovocytes de xénope

de Xp42^{Mpk1} constitutivement active dans des ovocytes traités par les oligonucléotides phosphorothioates antisens ou par U0126.

Les activations de Mek1 et de Xp42^{Mpk1} sont dépendantes de la synthèse de p39^{Mos} que la reprise de la méiose soit stimulée par des voies Ras-dépendante ou Ras-indépendante (Fig. 31). Ces résultats rapprochent le modèle des ovocytes de xénope de celui des ovocytes de souris dans lesquels Raf n'est pas activée et où Mos est seule responsable de l'activation de la voie ERK (Verlhac et coll., 1996).

Au cours de la maturation des ovocytes de xénope, le rôle de Raf n'est donc pas d'activer la voie MAP kinase et reste à déterminer. Les effets d'un inhibiteur spécifique de Raf, l'inhibiteur I de Raf (5-iodo-3-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)méthylène]-2-indolinone ; Calbiochem) pourraient être étudiés sur la reprise de la méiose. Enfin, une analyse du profil de spectrométrie de masse de Raf en fonction de sa phosphorylation devrait permettre d'identifier les sites de phosphorylations de Raf par les membres de la voie MAP kinase.

La voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} et la morphogenèse du fuseau dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

La reprise méiotique des ovocytes de xénope peut se dérouler jusqu'à la GVBD en absence d'activité de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} (Fisher et coll., 1999a; Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002b; Dupre et coll., 2002a) ; Publication 1 et 2). Nous avons utilisé ce contexte pour étudier les rôles des différents membres de cette cascade dans la morphogenèse du fuseau méiotique.

Toutes nos stratégies d'inhibition de la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} (geldanamycine, U0126, oligonucléotides Morpholino ou phosphorothioates antisens de p39^{Mos}) ont abouti au même résultat : il n'y a jamais de fuseau bipolaire, une ou plusieurs structures de type astral, constituées de microtubules associés à des chromosomes, sont le plus souvent observées. Les asters sont majoritairement localisés dans le cytoplasme de l'ovocyte et très rarement à la membrane. L'inhibition de la voie

traitement	Mos	Xp42 ^{Mpk1}	Rsk	Résultat cytologique
S/DMSO	+	+	+	Fuseau
U0126	+	-	-	Aster
U0126/Mos	+	-	-	Aster
U0126/Rsk	+	-	+	Fuseau
p39 ^{Mos} -AS	-	-	-	Aster
p39 ^{Mos} -AS/Rsk	-	-	+	Aster
p39 ^{Mos} -AS/Mos	+	+	+	Fuseau

(La maturation est stimulée par la progestérone)

Tableau 6 : Importance des membres de la voie p39^{Mos}-MEK1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la morphogenèse du fuseau méiotique des ovocytes de xénope

Conclusions et perspectives

p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} provoque la décondensation des chromosomes, la réplication de l'ADN et l'entrée dans le cycle des ovocytes (Gross et coll., 2000; Dupre et coll., 2002a; Kotani et Yamashita, 2002). Ces résultats pourraient expliquer que dans un certain nombre d'ovocytes nous n'ayons observé aucune structure microtubulaire (Publications 1 et 2). Nos résultats confirment ceux obtenus chez le xénope où aucun fuseau méiotique n'apparaît à la membrane des ovocytes dans lesquels la voie p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1} est inhibée (Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002b; Dupre et coll., 2002a). Des ovocytes de *Rana Japonica* traités par U0126 ne montrent jamais de MTOC organisé ni de fuseau bipolaire. Une recondensation suit la décondensation partielle des chromosomes. Les microtubules sont dispersés dans le cytoplasme sous forme d'asters (Kotani et Yamashita, 2002).

Nous avons précisé les implications respectives de certains des membres de la cascade p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} dans la morphogenèse du fuseau méiotique. Malgré l'accumulation et l'activité de p39^{Mos}, l'inhibition de Mek1 empêche la bipolarisation du fuseau. Dans ces ovocytes, l'injection de Rsk constitutivement active (CA-Rsk) suffit à restaurer un fuseau bipolaire (Publication 1). p90^{Rsk} est donc indispensable à la bipolarité du fuseau. Lorsque la synthèse de p39^{Mos} est inhibée, l'injection d'une protéine Mu-Mos restaure la formation d'un fuseau méiotique normal. Au contraire, l'injection de CA-Rsk est inefficace (Publication 1). Ces observations nous amènent à conclure que p39^{Mos} ou p90^{Rsk}, seules, sont incapables de promouvoir la formation d'un fuseau de métaphase normal. Toutes deux seraient requises dans l'établissement de l'axe bipolaire du fuseau méiotique. L'implication de p39^{Mos} dans la morphogenèse du fuseau pourrait dépendre de l'activité de Xp42^{Mpk1}. Des injections d'une protéine Erk thiophosphorylée (Haccard et coll., 1995). dans des ovocytes injectés de p39^{Mos}-PSAS permettront de déterminer si Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} sont capables d'induire la formation d'un fuseau bipolaire normal en absence de p39^{Mos}.

Les cibles de la voie MAP kinases impliquées dans la morphogenèse du fuseau méiotique restent à identifier. Des travaux récents ont montré que l'injection d'anticorps dirigés contre les protéines associées aux microtubules XMap215 et

Conclusions et perspectives

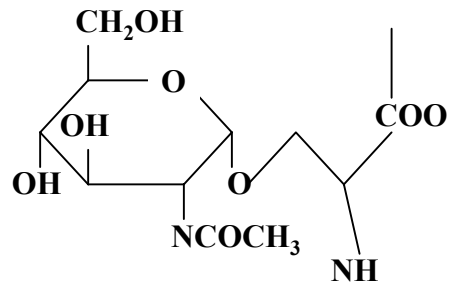
XKcm1 provoque l'absence de fuseau bipolaire et l'apparition de structures de type aster associées aux chromosomes (Becker et coll., 2003). La ressemblance de ces structures avec celles que nous avons observées suggère que ces protéines associées aux microtubules pourraient être régulée par la voie des MAP kinases.

Annexes

Modulation of O-GlcNAc glycosylation during
Xenopus oocyte maturation

J. Cell. Biochem., 2004, **93**(5) : 999-1010

Résidu séryl-*O*-GlcNAc :



Résidu thréonyl-*O*-GlcNAc :

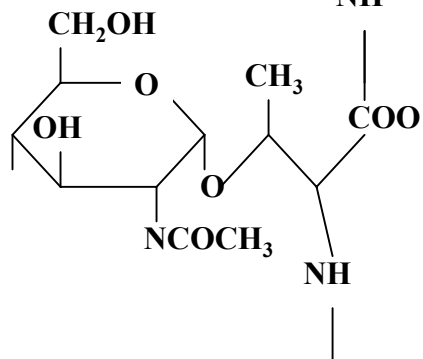


Figure 32 : Modifications d'un résidu sérine et d'un résidu thréonine par *O*-N-acétylglucosaminylation

Introduction

La O-N-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc) est le principal type de O-glycosylation observé dans les compartiments cytosolique et nucléaire des cellules eucaryotes (revue, Wells et coll., 2001). Elle consiste en l'addition d'un unique résidu de N-acétyleglucosamine sur les groupements hydroxyles de la sérine ou de la thréonine (Fig. 32). L'enzyme responsable du transfert est la O-N-Acétyleglucosaminyltransférase (OGT). Le retrait du groupement O-GlcNAc est catalysé par la β -N-Acétyleglucosaminidase (O-GlcNAcase : (Wells et coll., 2003)). Contrairement à la phosphorylation, le rôle de la O-GlcNAc dans la régulation des protéines est peu connu. Comme la phosphorylation, la O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique : des expériences de « pulse-chase » réalisées sur des cytokératines (Chou et coll., 1992) ou sur l' $\alpha\beta$ -cristalline (Roquemore et coll., 1996) ont montré que le « turn-over » de la O-GlcNAc est beaucoup plus rapide que celui de la protéine modifiée. La O-GlcNAc et la phosphorylation seraient en compétition sur des sites communs (Haltiwanger et coll., 1998; Griffith et Schmitz, 1999; Lefebvre et coll., 1999). La O-GlcNAc serait impliquée dans les mécanismes d'interaction protéine-protéine.

Des modifications de l'état de glycosylation semblent être associées à la régulation du cycle cellulaire : dans les lymphocytes T, les niveaux de O-GlcNAc varient rapidement après la stimulation de l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire (Kearse et Hart, 1991). Dans la lignée cellulaire de colon HT29, l'arrêt mitotique provoqué par l'acide okadaïque ou le nocodazole entraîne une augmentation du niveau de O-GlcNAc des kératines (Haltiwanger et Philipsberg, 1997).

Les premiers travaux réalisés dans les ovocytes de xénope ont montré que l'injection de galactosyltransférase est toxique (Fang et Miller, 2001). Le niveau de O-GlcNAc diminuerait durant la maturation des ovocytes de xénope (Slawson et coll., 2002). Cependant, la glutamine fructose-6-phosphate amido-transférase 1 (GFAT1), qui est l'enzyme clef dans la synthèse de la glucosamine, est régulée négativement par l'accumulation d'AMPc (Ray et coll., 1992; Han et Kudlow, 1997). Dans les ovocytes

de xénope, le taux d'AMPc et l'activité de la PKA chutent lors de la reprise de la méiose. Il est donc étonnant que Slawson et ses collaborateurs aient observé une diminution de l'activité O-GlcNAc (Slawson et coll., 2002). A l'inverse de ces observations, les conditions expérimentales que nous avons utilisées ont mis en évidence une augmentation globale de la O-GlcNAc pendant la maturation. Nos expériences d'injection de GlcNAc libre suggèrent que la O-GlcNAc interviendrait dans des interactions de type protéine-protéine impliquées dans la dynamique de la reprise méiotique.

Résultats et Discussion

Des extraits immatures et matures d'ovocytes de xénope ont été soumis à une β -élimination et les saccharides peracétylés obtenus ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Lors de la reprise de la méiose, nous avons observé une augmentation globale ($\times 4,51 \pm 0,32$) de la O-GlcNAc (Publication annexe, Fig. 1B) qui serait due en partie à un accroissement de l'activité de la O-GlcNAc transférase (Dr. T. Lefebvre : communication personnelle). Sur les immunoempreintes, l'utilisation de la lectine de germe de blé WGA (Wheat germ agglutinin) permet d'identifier une modification majeure de la O-GlcNAc sur deux protéines de 66 et 97 kDa (Publication annexe, Fig. 1A). La O-GlcNAc de la protéine de 97 kDa n'apparaît que dans les ovocytes matures. La protéine de 66 kDa est déjà O-glycosylée dans les ovocytes immatures ; son niveau de O-GlcNAc augmente lorsque les ovocytes sont stimulés par la progestérone (Publication annexe, Fig. 1C). Ces protéines ne sont pas nucléaires puisqu'elles sont toujours présentes dans les ovocytes énucléés (Publication annexe, Fig. 2). Nous avons ensuite étudié les modifications de O-GlcNAc des protéines totales au cours de la maturation en prélevant des ovocytes, 0, 2, 4, 6, 8 et 16 heures après l'addition de progestérone (Publication annexe, Fig. 3). La O-GlcNAc des protéines de 97 kDa et de 150 kDa augmente jusqu'à atteindre un maximum 6 à 8 heures après la stimulation. A 16 heures, la O-GlcNAc a diminué mais reste supérieure à celle

observée dans les ovocytes immatures. Une protéine de 30 kDa est O-GlcNAc dans les ovocytes immatures, puis cette O-GlcNAc diminue au cours de la maturation.

Les ovocytes injectés de Cdc25 présentent les mêmes profils de O-GlcNAc que les ovocytes stimulés par la progestérone (Publication annexe, Fig. 6). La O-GlcNAc induite lors de l'injection de Cdc25 est indépendante de la synthèse protéique hormis pour la protéine de 97kDa, dont la O-GlcNAc diminue sensiblement en présence de cycloheximide.

Nous avons émis l'hypothèse que la protéine O-GlcNAc de 97 kDa serait la β -caténine. La β -caténine est O-GlcNAc dans les cellules en culture (Zhu et coll., 2001; Vosseller et coll., 2002) et n'est détectée que dans des ovocytes matures (Fisher et coll., 1999b). Dans des extraits totaux d'ovocytes, un anticorps anti- β -caténine reconnaît cette protéine au même niveau que celui de la protéine O-GlcNAc de 97 kDa (Publication annexe, Fig. 6B : puis 1 à 4). Après enrichissement des protéines O-GlcNAc sur des billes couplées à la WGA, l'anticorps anti- β -caténine reconnaît la protéine de 97kDa (Publication annexe, Fig. 6B). L'immunoprécipitation des protéines O-GlcNAc par l'anticorps RL2 donne un résultat identique (Publication annexe, Fig. 6C). Dans les ovocytes immatures, la β -caténine est phosphorylée par la kinase GSK-3 β , phosphorylation qui provoque sa dégradation par le protéasome. L'inactivation de GSK-3 β durant la reprise méiotique permet l'accumulation de la β -caténine (Fisher et coll., 1999b). Le taux de β -caténine augmente dans des ovocytes immatures et matures incubés en présence de chlorure de Lithium (LiCl), inhibiteur de GSK3 (Hedgepeth et coll., 1997; Davies et coll., 2000; Davies et coll., 2001). La quantité de β -caténine détectée dans des extraits totaux ou enrichis en O-GlcNAc par passage sur billes de WGA est plus importante lors d'un traitement par le LiCl. Le traitement par le LiCl permet de détecter la β -caténine même dans des ovocytes immatures (Publication annexe, Fig. 6B). L'ensemble de ces observations permet de conclure que la protéine de 97 kDa modifiée par O-GlcNAc est la β -caténine.

L'augmentation de la O-GlcNAc concomitante à l'accroissement de la phosphorylation semble contredire l'hypothèse d'une compétition entre O-GlcNAc et

phosphorylation sur des sites identiques. Cependant, cette hypothèse ne peut pas être écartée dans la mesure où la O-glycosylation a été appréhendée de manière globale. Par exemple, la O-GlcNAc de certaines protéines, comme celle de 30 kDa, diminue au cours de la maturation. Dans les ovocytes immatures la β -caténine est phosphorylée puis dégradée. Dans les ovocytes matures, elle n'est plus phosphorylée, elle est O-GlcNAc et n'est pas dégradée.

Les variations de O-GlcNAc pourraient également réguler les interactions protéines-protéines. La O-GlcNAc du facteur de transcription Sp1 inhibe son interaction avec TAF110 (facteur associé à la protéine de liaison à la « TATA box » : (Roos et coll., 1997). Afin de tester l'hypothèse d'une perturbation des interactions protéines-lectines, nous avons injecté de la GlcNAc libre dans les ovocytes une heure avant l'application de progestérone. L'injection témoin de galactose n'a pas d'influence sur la reprise méiotique par rapport aux ovocytes témoins injectés d'eau. Au contraire, l'injection de GlcNAc libre retarde d'environ quatre heures la GVBD₅₀ (Publication annexe, Fig. 4A). L'analyse cytologique n'a révélé aucune altération des événements morphologiques de la méiose : la GVBD, la condensation des chromosomes et la formation du fuseau se déroulent normalement en présence de GlcNAc libre. L'injection de GlcNAc libre ne modifie pas la O-GlcNAc des protéines observées sur immunoempreinte après révélation par la WGA (Publication annexe, Fig. 4B). L'activité de la O-GlcNAc transférase n'est pas affectée par la présence de GlcNAc libre (Haltiwanger et coll., 1990).

En conclusion, notre étude démontre une variation de la O-N-acétylglucosaminylation au cours de la maturation des ovocytes de xénope. Parmi les protéines O-GlcNAc, certaines pourraient intervenir dans la régulation de la transition G2/M, d'autres participeraient à la préparation de l'ovocyte à la fécondation et aux premières étapes du développement embryonnaire. La O-GlcNAc semble en effet influencer la dynamique de la reprise méiotique via des interactions protéiques puisque l'injection de GlcNAc libre retarde la maturation déclenchée par la progestérone. Ces protéines O-GlcNAc restent à identifier. Lors de la reprise méiotique, la β -caténine est O-GlcNAc, cette O-GlcNAc pourrait être l'un des facteurs

responsables de la stabilisation de la β -caténine qui est nécessaire au processus de dorsalisation de l'embryon. La nature et le rôle des équilibres entre phosphorylation et O-GlcNAc restent à déterminer.

Modulation of O-GlcNAc Glycosylation During *Xenopus* Oocyte Maturation

Tony Lefebvre,^{1*} Frédéric Baert,² Jean-François Bodart,² Stéphane Flament,³ Jean-Claude Michalski,¹ and Jean-Pierre Vilain²

¹Unité Mixte de Recherches 8576 du CNRS, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 118, USTL, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²UPRES-EA, 1033, Laboratoire de Biologie du Développement, IFR 118, USTL, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

³UPRES-EA, 3442, Génétique, Signalisation, Différenciation, Faculté des sciences, Université de Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

Abstract O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) glycosylation is a post-translational modification, which is believed antagonises phosphorylation. We have studied the O-GlcNAc level during *Xenopus* oocyte meiotic resumption, taking advantage of the high synchrony of this model which is dependent upon a burst of phosphorylation. Stimulation of immature stage VI oocytes using progesterone was followed by a 4.51 ± 0.32 fold increase in the GlcNAc content, concomitantly to an increase in phosphorylation, notably on two cytoplasmic proteins of 66 and 97 kDa. The increase of O-GlcNAc for the 97 kDa protein, which we identified as β -catenin was partly related to its accumulation during maturation, as was demonstrated by the use of the protein synthesis inhibitor—cycloheximide. Microinjection of free GlcNAc, which inhibits O-glycosylated proteins–lectins interactions, delayed the progesterone-induced maturation without affecting the O-GlcNAc content. Our results suggest that O-GlcNAc glycosylation could regulate protein–protein interactions required for the cell cycle kinetic. *J. Cell. Biochem.* 93: 999–1010, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: oocyte; *Xenopus*; maturation; O-GlcNAc; beta-catenin

O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) glycosylation is the major glycosylation type found within the nucleus and the cytosolic compartment of eukaryota [for review, see Wells

et al., 2001]. O-GlcNAc consists in the addition of a single residue of *N*-acetylglucosamine to the hydroxyl groups of serine and threonine. This type of glycosylation shares similar features with protein phosphorylation [Haltiwanger et al., 1997], and the occurrence of an antagonism between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation was demonstrated. The existence of a direct competition between O-GlcNAc and phosphate to occupy the same sites on proteins was reported [Haltiwanger et al., 1998; Griffith and Schmitz, 1999; Lefebvre et al., 1999]. The emergence of an O-GlcNAc/phosphorylation balance leads to the question of its biological significance: if the role of phosphorylation is well documented and generally contributes to the regulation of the protein activity, the particular role of O-GlcNAc glycosylation is still not well understood. For example, whereas the reciprocity between O-GlcNAc and O-Phosphate on the carboxyl terminal domain (CTD) of RNA polymerase II was studied in detail, the phosphorylation of the CTD is associated with

Abbreviations used: O-GlcNAc, O-linked *N*-acetylglucosamine; GVBD, germinal vesicle breakdown; PNGase F, peptide *N*-glycosidase F; WGA, wheat germ agglutinin; PNA, peanut agglutinin; TBS, tris buffered saline; BSA, bovine serum albumin; AMP, adenosine 5'-monophosphate; MPF, maturation promoting factor; MAPK, mitogen activated protein kinase; CHX, cycloheximide.

Tony Lefebvre and Frédéric Baert are co-authors.

Grant sponsor: Genopole of Lille; Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique; Grant sponsor: Université des Sciences et Technologies de Lille; Grant sponsor: Comité du Nord de la Ligue contre le Cancer.

*Correspondence to: Tony Lefebvre, UGSF/CNRS, UMR 8576, cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

E-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

Received 28 August 2002; Accepted 11 June 2004

DOI 10.1002/jcb.20242

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

promoter clearance, stabilization of elongation complexes and with the involvement of the mRNA processing machinery—the function of O-GlcNAc glycosylation of the CTD remains speculative [Comer and Hart, 2001].

Changes in the level of glycosylation in several nuclear and cytoplasmic proteins were observed during the mitogenic activation of both T-lymphocytes and T-cell hybridoma. In T-lymphocytes, O-GlcNAc levels change rapidly after stimulation to enter the cell cycle [Kearse and Hart, 1991]. In the human colon cell line HT 29, mitotic arrest with either okadaic acid or the microtubule destabilizing agent nocodazole, causes an increase in the O-GlcNAc levels of keratins [Haltiwanger and Philipsberg, 1997]. These observations suggest that O-GlcNAc glycosylation might be involved in the cell cycle regulation, while no other data corroborated this assumption. Many of the nuclear pore complexes, which are modified by single series of O-GlcNAc, are phosphorylated in a cell cycle specific manner, though the levels of O-GlcNAc remain constant [Miller et al., 1999]. Other experiments were led to investigate into the role of O-GlcNAc during the cell division process through the microinjection of galactosyltransferase (GalT) into *Xenopus* oocytes arrested in prophase I. However, injected GalT was toxic for oocytes stimulated to resume meiosis [Fang and Miller, 2001].

Xenopus oocyte offers opportunities to study the M-phase regulation that is highly controlled by specific kinases and phosphatases. Full-grown *Xenopus* stage VI oocytes are arrested at the prophase of the first division of meiosis in a G₂-like state. In response to progesterone, oocytes undergo germinal vesicle breakdown (GVBD), chromosomes condensation, and spindle formation. The end of the first division of meiosis is attested by the extrusion of the first polar body. The second division resumes, but it is arrested at metaphase [Hausen and Riebesell, 1991]. This process, also called maturation, is characterized by the simultaneous activation of two pathways. On one hand, the M-phase Promoting Factor (MPF; p34Cdc2/Cyclin B) that regulates both the entry and exit of the M-phase is activated through the dephosphorylation of its catalytic subunit by a dual-specificity phosphatase Cdc25 [Masui, 2001]. On the other hand, the activation of the Mos/MEK/Xp42Mpk1 Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) cascade depends upon Mos

accumulation; and the effects of this pathway are mainly mediated through p90Rsk [Gotoh and Nishida, 1995; Gross et al., 2000].

Since phosphorylation is well known as means to regulate the cell cycle progression and since O-GlcNAc could antagonize phosphorylation, we assumed that O-GlcNAc variations could also occur during the meiosis resumption and that O-glycosylated proteins—lectins interactions might influence the G₂/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. Thus, we studied the O-GlcNAc level during *Xenopus* oocyte maturation, taking advantage of the high and natural synchrony of this model [Ferrell, 1999]. Moreover, we observed the O-GlcNAc glycosylation of several proteins during maturation. Among them, we identified β -catenin which is phosphorylated by the Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and lead to its degradation. In return, the stabilization of β -catenin through the inactivation of GSK3 is essential for the dorsal determination in *Xenopus* embryos [Heasman et al., 1994]. Moreover, we have shown that the microinjection of free GlcNAc delayed progesterone-induced maturation, thereby suggesting a role for O-GlcNAc mediated interaction in the cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

Handling of Oocytes

Stage VI *Xenopus* oocytes were isolated and prepared as previously described [Flament et al., 1996]. Briefly, prophase I-arrested oocytes were obtained from animals that were not primed with any gonadotropins. Defolliculated oocytes were kept in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.5). Progesterone was added at a final concentration of 10 μ M. Percentages of maturation were marked by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte and GVBD was confirmed via microscopically examination after the dissection of heat-fixed oocytes. For biochemical analysis, oocytes were homogenized in β glycerophosphate, 60 mM; paranitrophenylphosphate, 15 mM; MOPS, 25 mM; EGTA, 15 mM; MgCl₂, 15 mM; DTT, 2 mM; sodium orthovanadate, 1 mM; NaF, 1 mM and proteases inhibitors; pH 7.2 [Flament et al., 1996] and centrifuged at 10,000 g for 10 min to eliminate yolk and membranous pellet. All the experiments were performed at least in duplicate.

Enucleation

Immature oocytes were pricked at the animal pole and placed in ND96 diluted four times. Under such conditions, the germinal vesicle that is located in the animal hemisphere went out of the cell. Enucleated oocytes were then replaced in normal ND96 for recovery, at least 1 h prior to treatment.

To check the efficiency of oocytes enucleation, we used an antibody raised against p62 (sc-1916, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a nuclear pore specific protein. After nitrocellulose saturation with milk, the antibody was used at a dilution of 1:1,000 overnight at 4°C, and the horseradish peroxidase-coupled anti-goat secondary antibody was used at a dilution of 1:2,000 for 1 h (Dako, Glostrup, Denmark).

Cytological Analysis

Oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (7 µm thick) were stained with nuclear red to detect nuclear structures and chromosomes and with picroindigo-carmin, which reveals cytoplasmic and microtubular structures. This method is precise enough to detect spindles and condensed chromosomes, even if they are not located near the plasma membrane [Flament et al., 1996].

Western Blotting

Analysis of the O-GlcNAc content. The proteins were run on a 10% SDS-PAGE and were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane. Blots were saturated in 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween, pH 8.0) for 45 min and washed three times for 15 min with TBS-Tween. Before wheat germ agglutinin (WGA) staining, samples were systematically digested with PNGase F in order to remove N-linked oligosaccharides by direct incubation of the nitrocellulose sheets in 5–20 ml Phosphate Buffer (pH 7.5–50 mM) containing 2,500–10,000 U PNGase F overnight [Lefebvre et al., 1999]. Desialylation was performed with formic acid pH 2.0, for 30 min at 80°C. Proteins were analyzed for their O-GlcNAc status via Western blotting using horseradish peroxidase-coupled WGA (HRP-WGA) was incubated in TBS-Tween (1:10,000) for 1 h, and horseradish peroxidase was de-

tected with ECL (Amersham Biosciences, Saclay, France). In the same way, the occurrence of O-glycans was assessed by the use of peanut agglutinin (PNA).

The anti-O-GlcNAc antibody (RL2, Affinity Bioreagents, Golden, CO) was used at a dilution of 1:1,000 over night at 4°C, after the nitrocellulose sheets were saturated with milk. The horseradish peroxidase-coupled anti-mouse secondary antibody was used for 1 h at a dilution of 1:10,000 (Amersham Biosciences). For immunoprecipitation, we used RL2 at a dilution of 1:200 for 2 h at 4°C, and protein G sepharose was finally added for 1 h at 4°C for the recovery of the O-GlcNAc proteins.

The phosphorylation status of proteins extracted from G₂ and M-phase arrested oocytes has been analyzed using an anti-phosphoserine (1:200 dilution, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Alkaline phosphatase coupled anti-mouse antibody was used as the secondary antibody.

Analysis of β-catenin content. Oocyte homogenates were prepared and proteins were submitted to Western blot analysis as previously reported [Bodart et al., 1999]. β-catenin was detected using antibody H102 (Santa Cruz Biotechnology) (1:500). After washes in TBS, horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG antiserum (1:5,000 in 2.5% of non-fatty milk in TBS) was incubated for 1 h. In order to inhibit GSK-3β, oocytes were transferred to ND96 containing 20 mM LiCl [Fisher et al., 1999] before homogenization or progesterone addition.

Analysis of the O-GlcNAc content using gas phase chromatography. Mature and immature oocytes extracts were submitted to a reductive β-elimination in 0.1 M NaOH and 1 M potassium borohydride at 65°C overnight. The reaction was stopped by addition of ice-cold acetic acid under vigorous stirring until the pH value of 5.0 was reached. The β-eliminated material was dried several times under vacuum with anhydrous methanol in order to remove borate in its methyl ester form. The released saccharides were peracetylated in anhydride acetic for 4 h at 95°C, dried and finally extracted in chloroform (the extraction with chloroform was performed twice, and this volume was washed four times with water). After drying under nitrogen and adding 100 µl of chloroform, 2 µl of the peracetyled saccharides were analyzed using gas liquid chromatography

[Lefebvre et al., 2001]. Analysis was performed on a BPX column (30 m × 0.32 mm) at an initial temperature of 150°C, with a gradient of 3°C/min to 230°C, then with a gradient of 5°C/min to 250°C, and finally with a plateau of 5 min at 250°C.

Oocyte microinjection. Microinjections were performed in the equatorial region of the oocytes, using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). Free GlcNAc or Gal microinjections were performed in order to obtain a final concentration of 10 nmol per oocyte. To trigger the MPF activation and GVBD, GST-Cdc25A was injected into immature oocytes at a final concentration of 1.2 μM.

RESULTS

O-GlcNAc Content in Immature Versus Mature Oocytes

In a first set of experiments, immature oocytes (G₂-like phase-arrested) and mature oocytes (metaphase II-arrested) obtained after treatment with 10 μM progesterone during 16 h, were compared for their O-GlcNAc content. After treatments with PNGase F for deglycosylation of the N-linked glycans and formic acid for desialylation, proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and checked for the presence of O-GlcNAc using WGA staining (Fig. 1Aa). A competition assay with an excess of free GlcNAc was done in conjunction with WGA (Fig. 1Ab). In this case, staining by WGA disappeared, demonstrating that it was specifically bound to O-GlcNAc proteins. We showed that the progesterone treatment induced an increase in the O-GlcNAc content of several different proteins in the *Xenopus* oocyte. Two proteins of 97 and 66 kDa were mainly concerned (Fig. 1Aa). PNA was used after formic acid desialylation to assess the absence of contaminant O-Glycans (Fig. 1Ac). Finally, the confirmation that the glycosylation borne by the proteins of 97 and 66 kDa was actually O-GlcNAc was done with a specific anti-O-GlcNAc antibody (RL2, Fig. 1Ae). It is to be noted that WGA stained more bands than the anti-O-GlcNAc antibody RL2 (compare panels a and e). This observation is not new and has already been reported [Comer et al., 2001]. The WGA lectin and the RL2 monoclonal antibody did not stained exactly the same motif: the lectin only needs the saccharide moiety for the binding, whereas the RL2 antibody needs not only the saccharide,

but also a peptidic backbone. In these conditions, if the peptidic environment of the protein is too different from the peptidic environment against which this antibody was originally raised [Snow et al., 1987], the recognition might not occur.

We performed the characterization and the quantification of the GlcNAc release after the β-elimination of the two extracts and the analysis of the peracetylated released saccharides via gas phase chromatography (Fig. 1B). The integration of the relevant GlcNAc peak areas (Fig. 1Ba) showed a 4.51 ± 0.32 fold increase in the O-GlcNAc content in mature oocytes (the calculated values were normalized to an equal protein amount assayed using the Bradford method).

In order to compare the O-GlcNAc profile with the phosphorylation status of immature and matured oocytes, we performed Western blotting using WGA, anti-phosphoserine and anti-O-GlcNAc antibodies. These profiles show that the induction of oocyte maturation with progesterone induces an increase both on the O-GlcNAc (Fig. 1Cc,Cd) and on the phosphorylation (Fig. 1Cb) status of proteins. We must note that interestingly, the two proteins of particular interest, i.e., 66 and 97 kDa, also appear to be phosphorylated and that this phosphorylation was increased by the G₂/M transition, especially for the 97 kDa one (arrowheads).

WGA staining on mature enucleated oocytes extracts demonstrated that a majority of proteins exhibiting O-GlcNAc modulation during maturation were localized in the cytoplasm (Fig. 2A). Indeed, we did not observe any difference in the O-GlcNAc proteins profile between the total oocyte and the enucleated oocyte. This result is interesting as many kinases/phosphatases that are involved during meiosis are also cytosolic components. The enucleation efficiency was demonstrated using an antibody raised against a specific nuclear pore protein, p62. The latter was not detected in enucleated oocytes extracts, confirming the absence of any nuclear components (Fig. 2C). Then, O-GlcNAc glycosylation observed in enucleated oocytes as well as in intact cells are representative of cytosolic proteins, and not nuclear proteins.

O-GlcNAc Modified Proteins During the Maturation Process

In a second set of experiments, modifications of cellular proteins' O-GlcNAc levels during

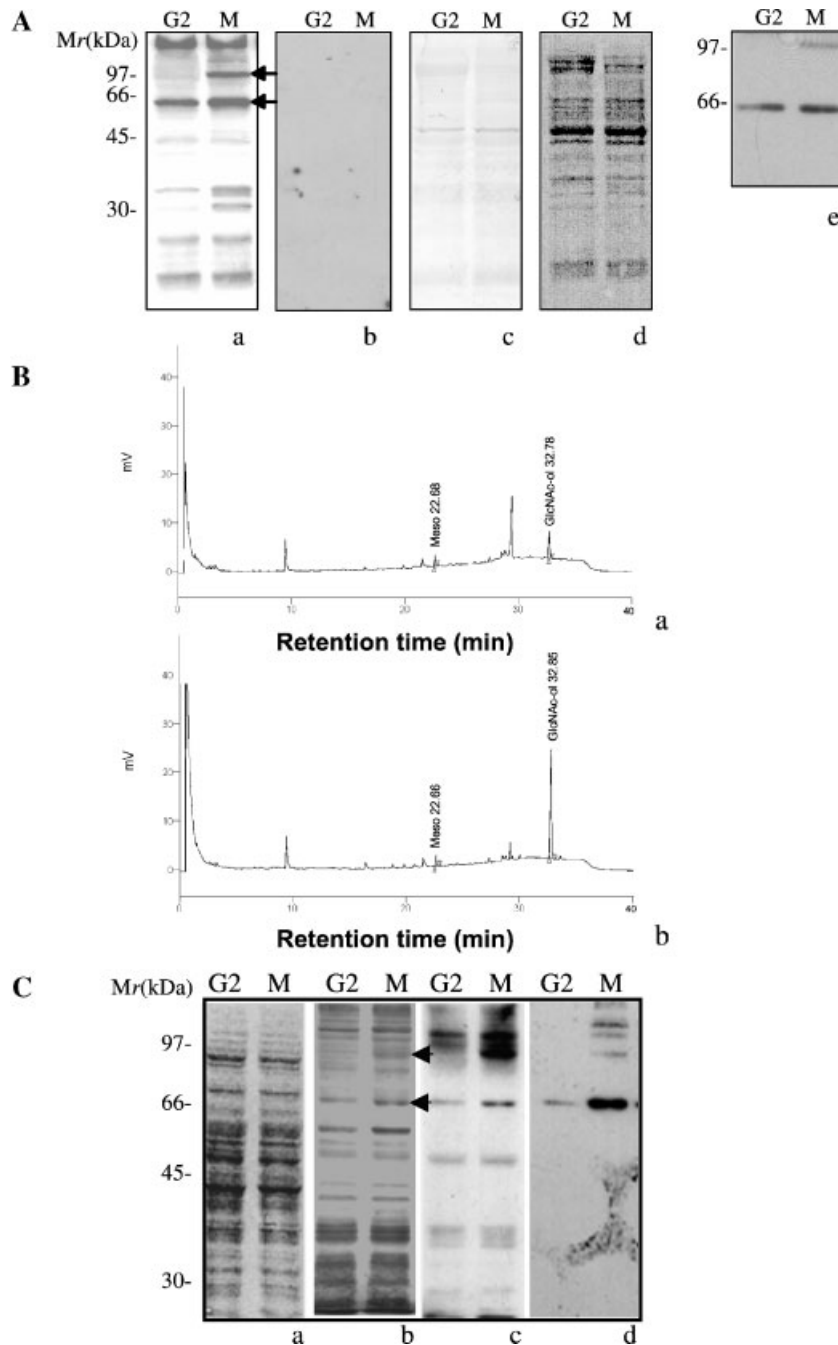


Fig. 1. O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) content analysis of immature and mature oocytes. **A:** Immature (G₂) and mature (M) oocytes were homogenised in lysis buffer. After PNGase F and formic acid treatment, proteins were run on a 10% SDS-PAGE. **Aa:** The blot was then analyzed for the O-GlcNAc content by wheat germ agglutinin (WGA) staining. It revealed an increase in the O-GlcNAc content and especially on two proteins of 97 and 66 kDa (Aa, arrows). **Ab:** In the presence of an excess of free GlcNAc, no more staining was observed with WGA, which demonstrated the specificity for O-GlcNAc. **Ac:** Peanut agglutinin (PNA) staining was done to assess the absence of contaminant O-Glycans. **Ad:** Red ponceau staining showing equality of the quantity of proteins in the lanes. **Ae:** To definitely assert the presence of O-GlcNAc glycosylation, we also used

RL2, a specific antibody raised against O-GlcNAc. **B:** The same extracts were submitted to a reductive β -elimination and the peracetylated released saccharides were analyzed and quantified by gas phase chromatography (**Ba**, immature oocytes; **Bb**, mature oocytes). The peak corresponding to peracetylated GlcNAc-ol is indicated. Mesoinositol (Meso) was used as an internal standard. After integration, the GlcNAc peak area of mature oocytes appeared to be 4.51 ± 0.32 times more important than the peak area of immature oocytes. **C:** The phosphorylation status of immature and mature oocytes was tested using an anti-phosphoserine directed antibody (**Cb**) in conjunction with peroxidase-labeled WGA (**Cc**) and with the anti-O-GlcNAc antibody (**Cd**). The panel Ca shows the ponceau red staining.

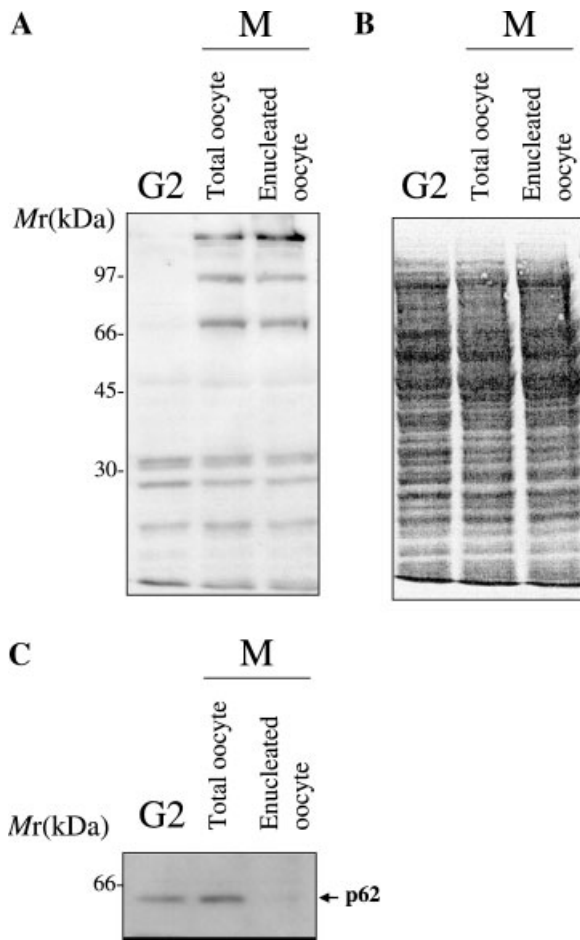


Fig. 2. Localization of the proteins that have their O-GlcNAc modulated during maturation. **A:** WGA staining and **(B)** ponceau red staining. Stage VI oocytes were manually enucleated before treatment with progesterone. The lysates were further analyzed for their O-GlcNAc content as described in Figure 1. Following progesterone stimulation, changes in O-GlcNAc glycosylation occurred in these enucleated oocytes (compare with immature oocytes: G₂) as was already observed in Figure 1Aa. The profile was not different from those observed in mature nucleated oocytes (total oocyte). **C:** We assessed for correct enucleation of oocytes using an antibody raised against p62, a specific nuclear pore protein. Lack of p62 staining confirmed the absence of any nuclear components.

meiosis were monitored. Kinetic maturation experiments were performed on oocytes after a hormonal stimulation using progesterone: oocytes were taken out at different times and homogenized. Numerous proteins (indicated with arrows in Fig. 3) showed modifications of their O-GlcNAc content during the meiosis resumption. For example, proteins at 150 and at 97 kDa reached a maximum in O-GlcNAc glycosylation 6–8 h after the progesterone addition. Then, their O-GlcNAc level decreased at the end of the maturation. The 66 kDa protein

was already O-GlcNAc glycosylated before the progesterone treatment, but this O-glycosylation increased 2 h after the progesterone application and then sharply decreased until the end of meiosis. Lastly, the O-GlcNAc glycosylation of a 30 kDa protein decreased during maturation and increased at the end of the maturation process.

Free GlcNAc Injection Delays Maturation in *Xenopus* Oocytes

Since oocyte maturation was accompanied by a modulation in O-GlcNAc glycosylation, the potentially inhibiting effect of free GlcNAc on maturation stages was evaluated after the microinjection of this monosaccharide into oocytes (Fig. 4). GlcNAc could not enter the hexosamine biosynthetic pathway, contrary to glucose or glucosamine, and thus could not take part in the synthesis of UDP-GlcNAc for the O-GlcNAc events. Besides, it is well-known that O-GlcNAc transferase is unaffected by GlcNAc [Haltiwanger et al., 1990]. After the microinjection of free GlcNAc, we observed that maturation was delayed. From the three experiments reported in Figure 4, we concluded that GVBD₅₀ (the time required for 50% of the oocytes to undergo GVBD) occurred 4 h later than in control oocytes injected with water (Fig. 4A). As a negative control, free galactose was microinjected before the progesterone treatment and it did not delay maturation, and such treated oocytes exhibited the same kinetics of GVBD than water-injected oocytes. As was expected, WGA staining did not show any significant differences in the O-GlcNAc content among oocytes in the three batches (Fig. 4B).

In order to determine the position in the cell cycle of GlcNAc injected oocytes, a cytological analysis was performed 4 h after the GVBD₅₀ of control oocytes injected with galactose. The latter exhibited a metaphase II spindle with condensed chromosomes, located on the plasma membrane, and a polar body (Fig. 5A), as water-injected oocytes did (data not shown). At the same time, cytological sections of GlcNAc-injected oocytes showed either oocytes with a typical metaphase II block (Fig. 5B) or oocytes with a metaphase I spindle and no polar body (Fig. 5C). Thus, though GlcNAc injection delayed progesterone-induced maturation, it did not seem to alter the condensation of chromosomes or the meiotic spindle morphogenesis.

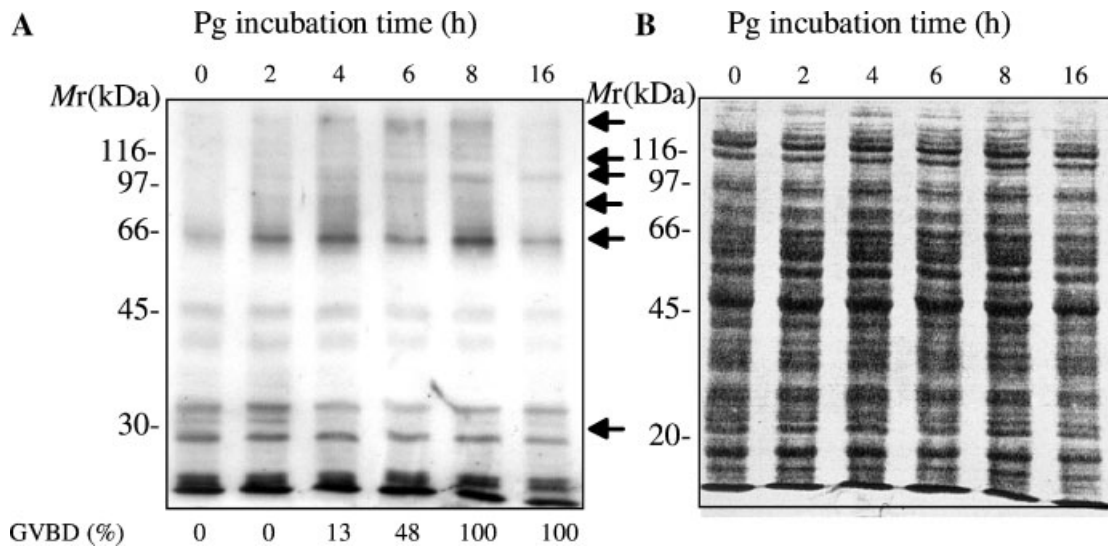


Fig. 3. O-GlcNAc glycosylation during the maturation process. The O-GlcNAc content of oocytes at different times of the maturation was analyzed as indicated in Figure 1. The WGA staining is shown in Figure 3A, and ponceau red staining in Figure 3B. Arrows indicate the main profile changes observed by WGA staining. The evolution of O-GlcNAc glycosylation was not similar for all proteins. The 97 kDa protein showed a maximum in O-GlcNAc glycosylation 6–8 h after the progester-

one addition. Then, the latter decreased but remained higher than in immature oocytes. The 66 kDa protein was already glycosylated in immature oocytes and this glycosylation increased as early as 2 h after the progesterone application; it sharply decreased at the end of the maturation. The 30 kDa protein showed an O-glycosylated profile in immature oocytes, and this glycosylation decreased after the progesterone treatment.

Synthesized β -catenin Is O-GlcNAc Modified During *Xenopus* Oocyte Maturation

In order to check whether the increase in the O-GlcNAc content observed during maturation was related to an increase in the synthesis of the corresponding proteins, oocytes were induced to mature in the presence of cycloheximide (CHX,

50 μ g/ml) a protein synthesis inhibitor. Since progesterone-induced maturation is dependent upon protein synthesis, maturation was triggered by micro-injection of GST-Cdc25A in this set of experiments. Cdc25 is a dual specificity phosphatase that directly dephosphorylates and activates p34^{Cdc2}, the catalytic subunit of the M-phase promoting factor. Results are

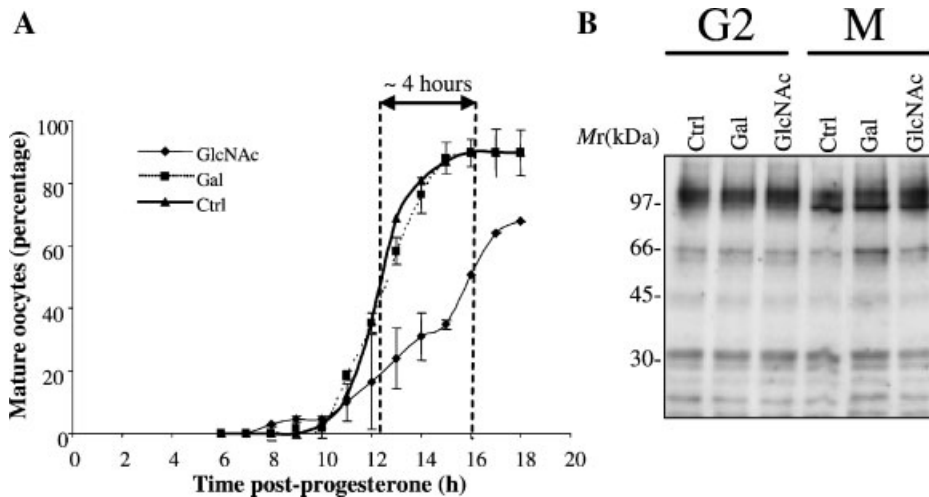


Fig. 4. Effect of GlcNAc microinjection on oocyte maturation. **A:** The progesterone treatment was performed after the control microinjection of either water (- \blacktriangle -) or free galactose (- \blacksquare -) or after the microinjection of free GlcNAc (- \blacklozenge -). Maturation was assessed using white spot examination. The results are from three

different experiments. **B:** WGA staining of oocytes extracts. The injection of either Gal or GlcNAc did not modify the O-GlcNAc profile in immature oocytes (G₂). This did not inhibit the occurrence of the changes of O-GlcNAc glycosylation usually observed in mature oocytes (M).

described in Figure 6A. In the absence of CHX, the injection of Cdc25A induced the changes in O-GlcNAc usually observed following progesterone stimulation (see Fig. 1Aa). The same changes were still observed in the presence of

CHX for most of the proteins, except for the protein with an apparent molecular weight of 97 kDa, which was just slightly glycosylated. So, based on the observations that the O-GlcNAc glycosylation of the 97 kDa protein was related in part to its accumulation during maturation (i.e., its synthesis) and according to its apparent molecular weight, we assumed that the protein was β -catenin. This hypothesis was reinforced by the description of the O-GlcNAc modification of β -catenin [Zhu et al., 2001]. In fully grown immature oocytes, the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) is active, and it must be inactivated to allow maturation [Fisher et al., 1999]. This kinase is responsible for β -catenin phosphorylation, which is the signal for its degradation using the proteasome pathway. The inactivation of GSK-3 β allows β -catenin to accumulate in mature oocytes [Fisher et al., 1999]. O-GlcNAc proteins were enriched on agarose beads-coupled WGA, run on SDS-PAGE, transferred and stained with the anti- β -catenin antibody. As shown with the RL2 antibody (Fig. 6B), after WGA-enrichment, β -catenin was better detected in mature oocytes (M-phase) compared to immature oocytes (G₂-phase). LiCl, also known as a GSK-3 β inhibitor, was used to accumulate β -catenin [Hedgepeth et al., 1997; Davies et al., 2000; Davies et al., 2001]. When oocytes were treated with LiCl, we found greater amounts of glycosylated β -catenin both in mature and immature oocytes. To confirm that the identity of the 97 kDa-protein was actually β -catenin, we performed immunoprecipitations with the anti-O-GlcNAc RL2 antibody on immature and mature extracts. The immunoprecipitated proteins were separated on a 10% SDS-PAGE, electrotransferred on nitrocellulose and stained with an anti- β -catenin antibody (Fig. 6C). These immunoprecipitations clearly showed the accumulation of β -catenin during the maturation process and

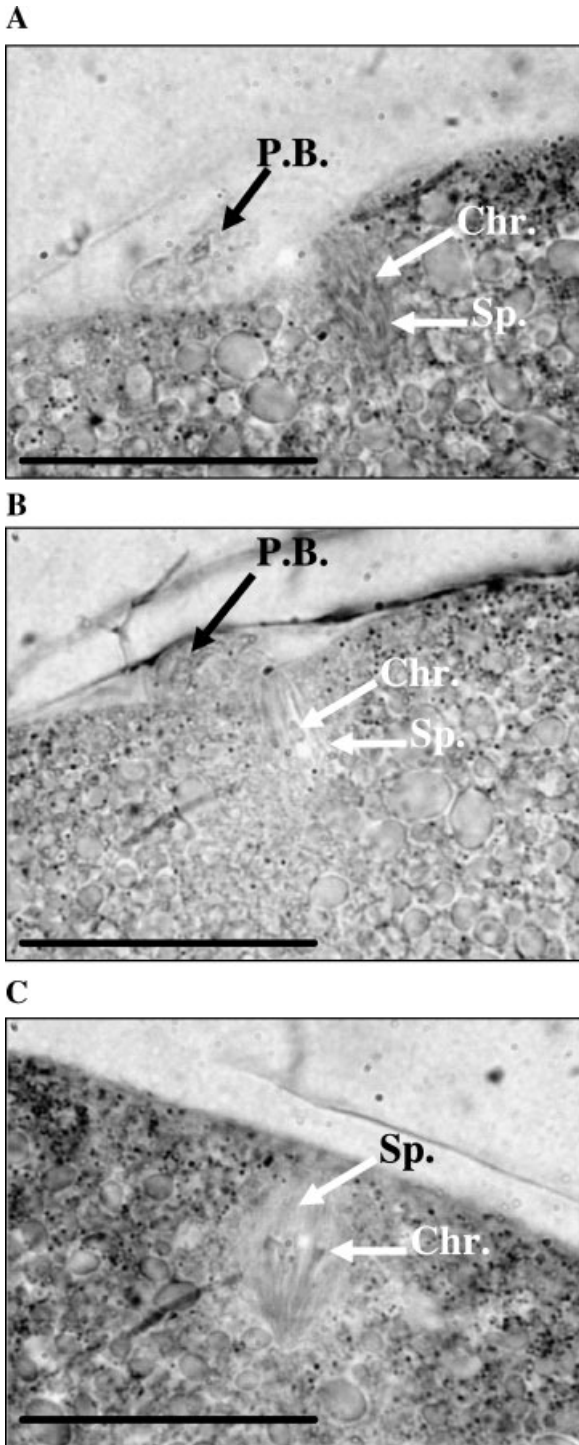


Fig. 5. Effects of free GlcNAc injection on the cytological events of the maturation. In this experiment, oocytes were fixed 4 h after control oocytes reached the GVBD₅₀ stage. **A:** Galactose-injected oocytes showing the usual aspect of mature oocytes with a polar body and a metaphase spindle with condensed chromosomes (arrows). **B:** Free GlcNAc injected oocytes showing a metaphase II status as in A. This was observed in 50% oocytes. **C:** Free GlcNAc injected oocytes with an unachieved maturation. Here is shown an example with a metaphase I spindle with condensed chromosomes but no polar body. Chr., condensed chromosomes; P.B., polar body; Sp., spindle. bar represents 50 μm.

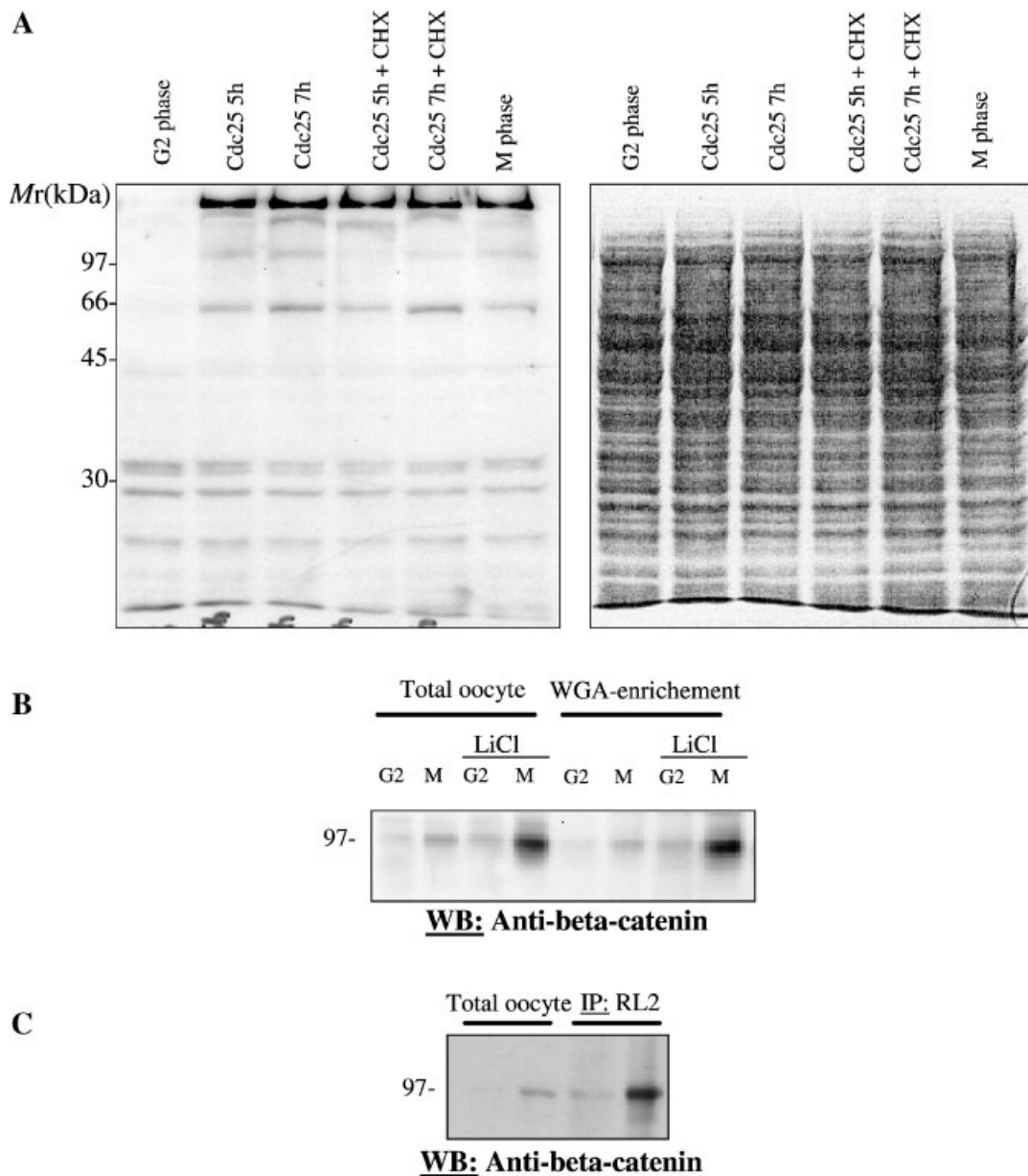


Fig. 6. Inhibition of protein synthesis and identification of the 97 kDa protein as β -catenin. **A:** Maturation was performed in the presence of the protein synthesis inhibitor, cycloheximide (CHX) and was triggered using microinjection of GST-Cdc25A. Oocytes were analyzed 5 and 7 h after the injection (**A**). **A: Left panel** represents the WGA staining as described in Figure 1A whereas the **right panel** represents the ponceau red staining. Cdc25 injection induced an increase in the O-GlcNAc glycosylation as was previously observed with progesterone. Except for the 97 kDa protein, the glycosylation was independent from the protein synthesis as CHX had no effect on it. **B:** Anti- β -catenin

staining. β -catenin was strongly detected in the WGA-enriched fraction, proving that β -catenin was still present after WGA precipitation. The GSK-3 β inhibitor, LiCl, induced an increase in the amount of β -catenin which was observed not only in total homogenates but also following WGA enrichment (G₂, immature oocytes; M, mature oocytes). **C:** Immunoprecipitation was performed with the anti-O-GlcNAc antibody (RL2) on the two extracts (G₂ and M), the bound proteins were separated on a 10% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose and then stained with the anti- β -catenin.

concomitantly its O-GlcNAc glycosylation. This identification of β -catenin prompted us to make a further experiment. It seemed particularly interesting to investigate into the inhibition of

the β -catenin phosphorylation on the O-GlcNAc glycosylation of the protein. These points unambiguously demonstrate that the 97 kDa glycosylated protein is β -catenin.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate into the O-GlcNAc level of cellular proteins during *Xenopus* oocyte maturation. *Xenopus* oocytes were widely used to study the regulation of the M-phase entry that is triggered by well-characterized and well-conserved pathways of phosphorylations and dephosphorylations [Nebreda and Ferby, 2000]. Several reports have suggested that phosphorylation could be antagonized on the same site, or on an adjacent site, through O-GlcNAc glycosylation [Torres and Hart, 1984; Comer and Hart, 2000; Comer and Hart, 2001]. Hence, resumption of meiosis in oocytes, according to the phosphorylation/dephosphorylation cascade, might be accompanied by a modulation of the O-GlcNAc content of individual proteins, which could play a part in the cell cycle progression.

Unexpectedly, we observed that progesterone-induced oocyte maturation is correlated with an increase of O-GlcNAc glycosylation. Indeed, when Western blots were analyzed after WGA staining, several proteins exhibited an increase in their O-GlcNAc glycosylation in M-phase (mature) oocytes versus G₂-phase (immature) ones. The major changes were mainly shown by two proteins of 66 and of 97 kDa (the O-GlcNAc glycosylation for these two proteins was confirmed with the RL2 antibody). These observations were confirmed by gas phase chromatography, which showed a global increase in the O-GlcNAc content in mature oocytes ($\times 4.51 \pm 0.32$). This increase may be partly due to an increase in the O-GlcNAc transferase (OGT) activity: measurements performed on the OGT activity have shown a slight increase in this activity during the maturation process (data not shown). Similar changes in the O-GlcNAc content were observed when the M-phase entry was triggered by the microinjection of Cdc25 that is a direct activator of p34^{Cdc2}. The importance of the O-GlcNAc glycosylation-mediated phenomenon for oocyte maturation was strongly suggested by the noticeable delay observed in the maturation process following the microinjection of free GlcNAc (4 h delay).

The conclusion drawn from these results seems to disagree with a competition between phosphorylation and O-GlcNAc for the same sites. Indeed, since maturation is mainly associated with a burst in phosphorylation due to the activation of many kinases (Mos, MEK1,

p42^{Erk2}, p90^{rsk}, p34^{Cdc2}, Cdc25C, Plx1, Plkk1; for review, see [Nebreda and Ferby, 2000]), we could have expected to observe a decrease in the O-GlcNAc content. However, such a conclusion should be qualified. First, because the analyses that were performed during time-course experiments showed that the changes in O-GlcNAc were rather complex. For instance, a protein of 30 kDa showed a transient decrease in its O-GlcNAc glycosylation. Secondly, even if a burst of phosphorylation accompanies G₂/M transition in *Xenopus* oocytes, kinases such as PKA or GSK-3 β have to be inhibited for cell cycle progression [Maller and Krebs, 1977; Fisher et al., 1999]. Interestingly, we characterized the protein of 97 kDa as β -catenin. In immature oocytes, when β -catenin is phosphorylated by GSK-3 β , this protein is degraded by an ubiquitin ligase-proteasome system [Aberle et al., 1997; Orford et al., 1997]. Following the progesterone stimulation, GSK-3 β is inhibited, β -catenin is synthesized but no longer proteolysed and it consequently accumulates [Fisher et al., 1999]. Later, β -catenin accumulates on the future dorsal side of the *Xenopus* embryo due to the two-cell stage [Larabell et al., 1997]. We found high amounts of glycosylated β -catenin in mature oocytes as well as following treatments with the GSK3 inhibitor, LiCl. This result confirmed the O-GlcNAc glycosylation of β -catenin recently reported in MCF-7, MDA-MB-468, and MDCK cells as well as in 3T3-L1 adipocytes [Zhu et al., 2001; Vosseler et al., 2002]. In the oocyte, the increase in the O-GlcNAc content resulted from the accumulation and stabilization of the protein as was demonstrated by experiments using cycloheximide. This apparent correlation between the glycosylation of β -catenin and its stabilization is in line with the O-glycosylation of the Sp1 transcription factor since it was demonstrated that reduced O-GlcNAc of Sp1 increased the proteasome susceptibility [Han and Kudlow, 1997]. So, at least in the case of β -catenin, the increase in O-GlcNAc might be correlated to a decrease in phosphorylation.

We assumed that O-GlcNAc could promote interactions between several components required for the G₂/M transition and subsequent cytological events during oocyte meiosis. These interactions could be disturbed by the presence of high amounts of free GlcNAc in the oocyte and a similar approach was used by Fang and Miller [2001]. Such a role for the modulation of the

protein–protein interaction by O-GlcNAc has already been suggested. For example proteins that link the cytoskeleton to cellular membranes are O-GlcNAc modified but the exact function of O-GlcNAc in these interactions remains obscure [Hagman et al., 1992; Cole and Hart, 1999]. The best-known example is the interaction between Sp1, the TATA-binding-protein-associated factor (TAF110) and holo-Sp1. It was suggested that the removal of O-GlcNAc from an interaction domain was a signal for the protein association [Roos et al., 1997]. In this example O-GlcNAc may thereby prevent untimely and ectopic interactions. Conversely, our findings suggest that O-GlcNAc promotes protein–protein interactions that are involved in the cell cycle kinetic but not in spindle morphogenesis, nor chromosomes condensation.

As a conclusion, this study provides new evidence of the dynamic feature of the O-GlcNAc glycosylation during a cellular process and particularly during the cell cycle. Further experiments are required to investigate into the role of the O-glycosylation-phosphorylation balance in the cell cycle control. The role of O-GlcNAc might be important not only in the resumption of meiosis but also in the events that follow maturation: fertilization and early development. So, the role of the O-glycosylation of β -catenin is interesting since it is an important factor in the Wnt signaling pathway [Akiyama, 2000].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Yann Guerardel and Mr. Yves Leroy for their technical assistance with gas liquid chromatography. We also thank Ms. Arlette Rousseau for her help in the handling and preparation of oocytes. We are grateful to Dr. Willy Morelle for the final reading of the article and for English corrections.

REFERENCES

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797–3804.
- Akiyama T. 2000. Wnt/ β -catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:273–282.
- Bodart JF, B chard D, Bertout M, Gannon J, Rousseau A, Vilain JP, Flament S. 1999. Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B2 and p39^{Mos} proteolysis. *Exp Cell Res* 253:413–421.
- Cole RN, Hart GW. 1999. Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked *N*-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J Neurochem* 73: 418–428.
- Comer FI, Hart GW. 2000. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem* 275:29179–29182.
- Comer FI, Hart GW. 2001. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40:7845–7852.
- Comer FI, Vosseler K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW. 2001. Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked *N*-acetylglucosamine. *Anal Biochem* 293:169–177.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95–105.
- Davies G, Jiang WG, Mason MD. 2001. The interaction between beta-catenin, GSK3beta and APC after mitogen induced cell-cell dissociation, and their involvement in signal transduction pathways in prostate cancer. *Int J Oncol* 18:843–847.
- Fang B, Miller MW. 2001. Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked *N*-acetyl-D-glucosamine: A potential role for O-GlcNAc during cell division. *Exp Cell Res* 263:243–253.
- Ferrell JE, Jr. 1999. *Xenopus* oocyte maturation: New lessons from a good egg. *BioEssays* 21:833–842.
- Fisher DL, Morin N, Doree M. 1999. A novel role for glycogen synthase kinase-3 in *Xenopus* development: Maintenance of oocyte cell cycle arrest by a beta-catenin-independent mechanism. *Development* 126:567–576.
- Flament S, Browaeys E, Rodeau JL, Bertout M, Vilain JP. 1996. *Xenopus* oocyte maturation: Cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int J Dev Biol* 40:471–476.
- Gotoh Y, Nishida E. 1995. The MAP kinase cascade: Its role in *Xenopus* oocytes, eggs, and embryos. *Prog Cell Cycle Res* 1:287–297.
- Griffith LS, Schmitz B. 1999. O-linked *N*-acetylglucosamine levels is upregulated in Alzheimer brains. *Eur J Biochem* 262:824–831.
- Gross SD, Schwab MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Qian YW, Maller JL. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90 (Rsk). *Curr Biol* 10:430–438.
- Hagman J, Grob M, Burger MM. 1992. The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J Biol Chem* 267:14424–14428.
- Haltiwanger RS, Philipsberg GA. 1997. Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked *N*-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-Glycans on proteins from HT-29 cells. *J Biol Chem* 272:8752–8758.
- Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW. 1990. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins, identification of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine: Peptide β -*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 265:2563–2568.
- Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D, Medina L, Moloney D, Philipsberg G, Scartozzi R. 1997. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins:

- Regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 231:237–242.
- Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. 1998. Modulation of O-linked *N*-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-*b-N*-acetylglucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosaminopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate. *J Biol Chem* 273:3611–3617.
- Han I, Kudlow JE. 1997. Reduced O-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17:2550–2558.
- Hausen P, Riebesell M. 1991. The early development of *Xenopus laevis*. An atlas of histology. Berlin: Springer-Verlag.
- Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrear P, Kintner C, Yoshida-Noro C, Wilie C. 1994. Overexpression of cadherins and under-expression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79:791–803.
- Hedgepeth CH, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VMY, Klein PS. 1997. Activation of the Wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185: 82–91.
- Kearse KP, Hart GW. 1991. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1701–1717.
- Larabell CA, Torres M, Rowning BA, Yost C, Miller JR, Wu M, Kimelman D, Moon RT. 1997. Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in β -catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 136:1123–1136.
- Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, Michalski JC. 1999. Effect of okadaic acid on O-linked *N*-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1472: 71–81.
- Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC. 2001. Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as Heat-shock proteins. *Biochem J* 360:179–188.
- Maller JL, Krebs EG. 1977. Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulation subunit and inhibition by catalytic subunit 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase. *J Biol Chem* 252:1712–1718.
- Masui Y. 2001. From oocytes maturation to the in vitro cell cycle: The history of discoveries of maturation-promoting factor (MPF) and cytostatic factor (CSF). *Differentiation* 69:1–17.
- Miller MW, Caracciolo MR, Berlin WR, Hanover JA. 1999. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch Biochem Biophys* 367:51–60.
- Nebreda AR, Ferby I. 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol* 12:666–675.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman A, Byers SW. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 272:24735–24738.
- Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. 1997. O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks the removal of O-GlcNAc. *Mol Cell Biol* 17:6472–6480.
- Snow CM, Senior A, Gerace L. 1987. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol* 104:1143–1156.
- Torres CR, Hart GW. 1984. Topography and distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes, evidence of O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259:3308–3317.
- Vosseler K, Wells L, Lane MD, Hart GW. 2002. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5313–5318.
- Wells L, Vosseler K, Hart GW. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: Signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291:2376–2378.
- Zhu W, Leber B, Andrews DW. 2001. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 20:5999–6007.

Références

- Abrieu, A., M. Doree and D. Fisher (2001).** "The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes." J Cell Sci **114**(Pt 2): 257-67.
- Abrieu, A., T. Lorca, J. C. Labbe, N. Morin, S. Keyse and M. Doree (1996).** "MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts." J Cell Sci **109** (Pt 1): 239-46.
- Adachi, Y., M. Luke and U. K. Laemmli (1991).** "Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation." Cell **64**(1): 137-48.
- Adamczewski, J. P., M. Rossignol, J. P. Tassan, E. A. Nigg, V. Moncollin and J. M. Egly (1996).** "MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH." Embo J **15**(8): 1877-84.
- Alexandru, G., W. Zachariae, A. Schleiffer and K. Nasmyth (1999).** "Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage." Embo J **18**(10): 2707-21.
- Andersen, C. B., R. A. Roth and M. Conti (1998).** "Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **273**(30): 18705-8.
- Andersen, C. B., H. Sakaue, T. Nedachi, K. S. Kovacina, C. Clayberger, M. Conti and R. A. Roth (2003).** "Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." Biochem J **369**(Pt 2): 227-38.
- Andersen, S. S. (1999).** "Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary view." Bioessays **21**(1): 53-60.
- Andersen, S. S. (2000).** "Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18." Trends Cell Biol **10**(7): 261-7.
- Andersen, S. S., A. J. Ashford, R. Tournebize, O. Gavet, A. Sobel, A. A. Hyman and E. Karsenti (1997).** "Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18." Nature **389**(6651): 640-3.
- Andersen, S. S. and E. Karsenti (1997).** "XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle." J Cell Biol **139**(4): 975-83.
- Andresson, T. and J. V. Ruderman (1998).** "The kinase Eg2 is a component of the *Xenopus* oocyte progesterone-activated signaling pathway." Embo J **17**(19): 5627-37.

- Araki, K., K. Naito, S. Haraguchi, R. Suzuki, M. Yokoyama, M. Inoue, S. Aizawa, Y. Toyoda and E. Sato (1996).** "Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase." Biol Reprod **55**(6): 1315-24.
- Aroca, P., E. Santos and M. G. Kazanietz (2000).** "Recombinant C1b domain of PKCdelta triggers meiotic maturation upon microinjection in *Xenopus laevis* oocytes." FEBS Lett **483**(1): 27-32.
- Bagowski, C. P., J. W. Myers and J. E. Ferrell, Jr. (2001a).** "The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **276**(40): 37708-14.
- Bagowski, C. P., W. Xiong and J. E. Ferrell, Jr. (2001b).** "c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway." J Biol Chem **276**(2): 1459-65.
- Bai, W. L., B. Singh, W. L. Karshin, R. A. Shonk and R. B. Arlinghaus (1991).** "Phosphorylation of v-mos Ser 47 by the mitotic form of p34cdc2." Oncogene **6**(10): 1715-23.
- Ballantyne, S., D. L. Daniel, Jr. and M. Wickens (1997).** "A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation." Mol Biol Cell **8**(8): 1633-48.
- Bandyopadhyay, A., J. Bandyopadhyay, H. H. Choi, H. S. Choi and H. B. Kwon (1998).** "Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (*Rana dybowskii*) oocyte maturation." Gen Comp Endocrinol **109**(3): 293-301.
- Barbacid, M. (1987).** "ras genes." Annu Rev Biochem **56**: 779-827.
- Barkoff, A., S. Ballantyne and M. Wickens (1998).** "Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs." Embo J **17**(11): 3168-75.
- Barkoff, A. F., K. S. Dickson, N. K. Gray and M. Wickens (2000).** "Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation." Dev Biol **220**(1): 97-109.
- Barrett, C. B., R. M. Schroetke, F. A. Van der Hoorn, S. K. Nordeen and J. L. Maller (1990).** "Ha-rasVal-12,Thr-59 activates S6 kinase and p34cdc2 kinase in *Xenopus* oocytes: evidence for c-mos-dependent and -independent pathways." Mol Cell Biol **10**(1): 310-5.
- Baulieu, E. E., F. Godeau, M. Schorderet and S. Schorderet-Slatkine (1978).** "Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium." Nature **275**(5681): 593-8.

Références

- Bayaa, M., R. A. Booth, Y. Sheng and X. J. Liu (2000).** "The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12607-12.
- Becker, B. E., S. J. Romney and D. L. Gard (2003).** "XMAP215, XKCM1, NuMA, and cytoplasmic dynein are required for the assembly and organization of the transient microtubule array during the maturation of *Xenopus* oocytes." Dev Biol **261**(2): 488-505.
- Belle, R., O. Minella, P. Cormier, J. Morales, R. Poulhe and O. Mulner-Lorillon (1995).** "Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase." Prog Cell Cycle Res **1**: 265-70.
- Berra, E., M. T. Diaz-Meco, I. Dominguez, M. M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, R. S. Chapkin and J. Moscat (1993).** "Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction." Cell **74**(3): 555-63.
- Bhatt, R. R. and J. E. Ferrell, Jr. (1999).** "The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity." Science **286**(5443): 1362-5.
- Bhattacharya, S., L. Chen, J. R. Broach and S. Powers (1995).** "Ras membrane targeting is essential for glucose signaling but not for viability in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2984-8.
- Birchmeier, C., D. Broek and M. Wigler (1985).** "ras proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes." Cell **43**(3 Pt 2): 615-21.
- Blondeau, J. P. and E. E. Baulieu (1984).** "Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes." Biochem J **219**(3): 785-92.
- Bodart, J. F., S. Flament and J. P. Vilain (2002a).** "Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium." Mol Reprod Dev **61**(4): 570-4.
- Bodart, J. F., D. V. Gutierrez, A. R. Nebreda, B. D. Buckner, J. R. Resau and N. S. Duesbery (2002b).** "Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes." Dev Biol **245**(2): 348-61.
- Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker and M. P. Wymann (1998).** "Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK." Science **282**(5387): 293-6.
- Booher, R. N., R. J. Deshaies and M. W. Kirschner (1993).** "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins." Embo J **12**(9): 3417-26.

- Borgne, A., A. C. Ostvold, S. Flament and L. Meijer (1999).** "Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition." J Biol Chem **274**(17): 11977-86.
- Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu and M. H. Cobb (1990).** "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." Science **249**(4964): 64-7.
- Brachet, J., F. Hanocq and P. Van Gansen (1970).** "A cytochemical and ultrastructural analysis of in vitro maturation in amphibian oocytes." Dev Biol **21**(1): 157-95.
- Brandeis, M., I. Rosewell, M. Carrington, T. Crompton, M. A. Jacobs, J. Kirk, J. Gannon and T. Hunt (1998).** "Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4344-9.
- Bravo, R., C. Otero, C. C. Allende and J. E. Allende (1978).** "Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(3): 1242-6.
- Brizuela, L., G. Draetta and D. Beach (1987).** "p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase." Embo J **6**(11): 3507-14.
- Browaeys-Poly, E., K. Cailliau and J. P. Vilain (2000).** "Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma." Eur J Biochem **267**(20): 6256-63.
- Browaeys-Poly, E., K. Cailliau and J. P. Vilain (2001).** "Transduction cascades initiated by fibroblast growth factor 1 on *Xenopus* oocytes expressing MDA-MB-231 mRNAs. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma." Cell Signal **13**(5): 363-8.
- Browaeys-Poly, E., V. Fafeur, J. P. Vilain and K. Cailliau (2004).** "ERK2 is required for FGF1-induced JNK1 phosphorylation in *Xenopus* oocyte expressing FGF receptor 1." Biochim Biophys Acta **in press**.
- Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse and J. Pouyssegur (1999).** "Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry." Embo J **18**(3): 664-74.

Références

- Budde, P. P., A. Kumagai, W. G. Dunphy and R. Heald (2001).** "Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts." J Cell Biol **153**(1): 149-58.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2001).** "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-7.
- Burke, B. and L. Gerace (1986).** "A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis." Cell **44**(4): 639-52.
- Burns, R. G., K. Islam and R. Chapman (1984).** "The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2:tubulin interaction." Eur J Biochem **141**(3): 609-15.
- Cantley, L. C., K. R. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller and S. Soltoff (1991).** "Oncogenes and signal transduction." Cell **64**(2): 281-302.
- Carazo-Salas, R. E., G. Guarguaglini, O. J. Gruss, A. Segref, E. Karsenti and I. W. Mattaj (1999).** "Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation." Nature **400**(6740): 178-81.
- Carnero, A., F. Dolfi and J. C. Lacal (1994).** "ras-p21 activates phospholipase D and A2, but not phospholipase C or PKC, in *Xenopus laevis* oocytes." J Cell Biochem **54**(4): 478-86.
- Carnero, A. and J. C. Lacal (1993).** "Phospholipase-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: mitogenic activity of generated metabolites." J Cell Biochem **52**(4): 440-8.
- Carnero, A. and J. C. Lacal (1998).** "Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway." FEBS Lett **422**(2): 155-9.
- Carnero, A., M. Liyanage, S. Stabel and J. C. Lacal (1995).** "Evidence for different signalling pathways of PKC zeta and ras-p21 in *Xenopus* oocytes." Oncogene **11**(8): 1541-7.
- Casey, P. J., P. A. Solski, C. J. Der and J. E. Buss (1989).** "p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(21): 8323-7.
- Castro, A., M. Peter, L. Magnaghi-Jaulin, S. Vigneron, S. Galas, T. Lorca and J. C. Labbe (2001).** "Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes." Mol Biol Cell **12**(9): 2660-71.

- Cheatham, B. and C. R. Kahn (1995).** "Insulin action and the insulin signaling network." Endocr Rev **16**(2): 117-42.
- Chen, M. and J. A. Cooper (1995).** "Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase." Mol Cell Biol **15**(9): 4727-34.
- Chen, R. H., J. C. Waters, E. D. Salmon and A. W. Murray (1996).** "Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores." Science **274**(5285): 242-6.
- Chesnel, F., G. Bonnac, A. Tardivel and D. Boujard (1997).** "Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes." Dev Biol **188**(1): 122-33.
- Choi, T., S. Rulong, J. Resau, K. Fukasawa, W. Matten, R. Kuriyama, S. Mansour, N. Ahn and G. F. Vande Woude (1996).** "Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4730-5.
- Chou, C. F., A. J. Smith and M. B. Omary (1992).** "Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18." J Biol Chem **267**(6): 3901-6.
- Chou, C. K., T. J. Dull, D. S. Russell, R. Gherzi, D. Lebwohl, A. Ullrich and O. M. Rosen (1987).** "Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin." J Biol Chem **262**(4): 1842-7.
- Chu, Y., P. A. Solski, R. Khosravi-Far, C. J. Der and K. Kelly (1996).** "The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation." J Biol Chem **271**(11): 6497-501.
- Chuang, L. M., S. F. Hausdorff, M. G. Myers, Jr., M. F. White, M. J. Birnbaum and C. R. Kahn (1994).** "Interactive roles of Ras, insulin receptor substrate-1, and proteins with Src homology-2 domains in insulin signaling in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **269**(44): 27645-9.
- Chuang, L. M., M. G. Myers, Jr., J. M. Backer, S. E. Shoelson, M. F. White, M. J. Birnbaum and C. R. Kahn (1993a).** "Insulin-stimulated oocyte maturation requires insulin receptor substrate 1 and interaction with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Cell Biol **13**(11): 6653-60.

- Chuang, L. M., M. G. Myers, Jr., G. A. Seidner, M. J. Birnbaum, M. F. White and C. R. Kahn (1993b).** "Insulin receptor substrate 1 mediates insulin and insulin-like growth factor I-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5172-5.
- Chung, D. L., P. W. Brandt-Rauf, I. B. Weinstein, S. Nishimura, Z. Yamaizumi, R. B. Murphy and M. R. Pincus (1992).** "Evidence that the ras oncogene-encoded p21 protein induces oocyte maturation via activation of protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1993-6.
- Cicirelli, M. F. and L. D. Smith (1985).** "Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes." Dev Biol **108**(1): 254-8.
- Cicirelli, M. F., N. K. Tonks, C. D. Diltz, J. E. Weiel, E. H. Fischer and E. G. Krebs (1990).** "Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in *Xenopus* oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5514-8.
- Clarke, P. R., I. Hoffmann, G. Draetta and E. Karsenti (1993).** "Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts." Mol Biol Cell **4**(4): 397-411.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp and C. J. Marshall (1994).** "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." Cell **77**(6): 841-52.
- Cross, D. A. and C. Smythe (1998).** "PD 98059 prevents establishment of the spindle assembly checkpoint and inhibits the G2-M transition in meiotic but not mitotic cell cycles in *Xenopus*." Exp Cell Res **241**(1): 12-22.
- Curmi, P. A., C. Nogues, S. Lachkar, N. Carelle, M. P. Gonthier, A. Sobel, R. Lidereau and I. Bieche (2000).** "Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours." Br J Cancer **82**(1): 142-50.
- Daar, I. O., G. A. White, S. M. Schuh, D. K. Ferris and G. F. Vande Woude (1991).** "tpr-met oncogene product induces maturation-producing factor activation in *Xenopus* oocytes." Mol Cell Biol **11**(12): 5985-91.
- Davies, G., W. G. Jiang and M. D. Mason (2001).** "The interaction between beta-catenin, GSK3beta and APC after mitogen induced cell-cell dissociation, and their involvement in signal transduction pathways in prostate cancer." Int J Oncol **18**(4): 843-7.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano and P. Cohen (2000).** "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.

Références

- Davis, D. and S. E. Sadler (1992).** "Analysis of the p21 ras system during development of meiotic competence in *Xenopus laevis* oocytes." *Dev Biol* **149**(1): 1-7.
- De Bondt, H. L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgan and S. H. Kim (1993).** "Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2." *Nature* **363**(6430): 595-602.
- De Brabander, M., G. Geuens, J. De Mey and M. Joniau (1981).** "Nucleated assembly of mitotic microtubules in living PTK2 cells after release from nocodazole treatment." *Cell Motil* **1**(4): 469-83.
- de Carcer, G., M. do Carmo Avides, M. J. Lallena, D. M. Glover and C. Gonzalez (2001).** "Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability." *Embo J* **20**(11): 2878-84.
- de Moor, C. H. and J. D. Richter (1997).** "The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6419-26.
- Denko, N., J. Stringer, M. Wani and P. Stambrook (1995).** "Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras." *Somat Cell Mol Genet* **21**(4): 241-53.
- Denko, N. C., A. J. Giaccia, J. R. Stringer and P. J. Stambrook (1994).** "The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5124-8.
- Derua, R., I. Stevens, E. Waelkens, A. Fernandez, N. Lamb, W. Merlevede and J. Goris (1997).** "Characterization and physiological importance of a novel cell cycle regulated protein kinase in *Xenopus laevis* oocytes that phosphorylates cyclin B2." *Exp Cell Res* **230**(2): 310-24.
- Desai, A., H. W. Deacon, C. E. Walczak and T. J. Mitchison (1997).** "A method that allows the assembly of kinetochore components onto chromosomes condensed in clarified *Xenopus* egg extracts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12378-83.
- Descombes, P. and E. A. Nigg (1998).** "The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts." *Embo J* **17**(5): 1328-35.
- Deshpande, A. K. and H. F. Kung (1987).** "Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins." *Mol Cell Biol* **7**(3): 1285-8.
- Deuter-Reinhard, M., G. Apell, D. Pot, A. Klippel, L. T. Williams and W. M. Kavanaugh (1997).** "SIP/SHIP inhibits *Xenopus* oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase." *Mol Cell Biol* **17**(5): 2559-65.

- Dickson, K. S., A. Bilger, S. Ballantyne and M. P. Wickens (1999).** "The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation." Mol Cell Biol **19**(8): 5707-17.
- Dominguez, I., M. T. Diaz-Meco, M. M. Municio, E. Berra, A. Garcia de Herreros, M. E. Cornet, L. Sanz and J. Moscat (1992).** "Evidence for a role of protein kinase C zeta subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes." Mol Cell Biol **12**(9): 3776-83.
- Doree, M. and T. Hunt (2002).** "From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?" J Cell Sci **115**(Pt 12): 2461-4.
- Drury, K. C. and S. Schorderet-Slatkine (1975).** "Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*." Cell **4**(3): 269-74.
- Duckworth, B. C., J. S. Weaver and J. V. Ruderman (2002).** "G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16794-9.
- Dudler, T. and M. H. Gelb (1996).** "Palmitoylation of Ha-Ras facilitates membrane binding, activation of downstream effectors, and meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **271**(19): 11541-7.
- Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppa, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull and G. F. Vande Woude (1998).** "Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor." Science **280**(5364): 734-7.
- Dumont, J. N. (1972).** "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." J Morphol **136**(2): 153-79.
- Dunphy, W. G. and A. Kumagai (1991).** "The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity." Cell **67**(1): 189-96.
- Dupre, A., C. Jesus, R. Ozon and O. Haccard (2002a).** "Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." Embo J **21**(15): 4026-36.
- Dupre, A., K. Suziedelis, R. Valuckaite, J. de Gunzburg, R. Ozon, C. Jesus and O. Haccard (2002b).** "*Xenopus* H-RasV12 promotes entry into meiotic M phase and cdc2 activation independently of Mos and p42(MAPK)." Oncogene **21**(42): 6425-33.
- Ebina, Y., E. Araki, M. Taira, F. Shimada, M. Mori, C. S. Craik, K. Siddle, S. B. Pierce, R. A. Roth and W. J. Rutter (1987).** "Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes

Références

- insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(3): 704-8.
- El-Etr, M., S. Schorderet-Slatkine and E. E. Baulieu (1979).** "Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin." Science **205**(4413): 1397-9.
- Endicott, J. A., M. E. Noble and J. A. Tucker (1999).** "Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 738-44.
- Erikson, E. and J. L. Maller (1985).** "A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 742-6.
- Erikson, E. and J. L. Maller (1989).** "In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during *Xenopus* oocyte maturation." J Biol Chem **264**(23): 13711-7.
- Erikson, E. and J. L. Maller (1991).** "Purification and characterization of ribosomal protein S6 kinase I from *Xenopus* eggs." J Biol Chem **266**(8): 5249-55.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt (1983).** "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-96.
- Fabian, J. R., I. O. Daar and D. K. Morrison (1993a).** "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase." Mol Cell Biol **13**(11): 7170-9.
- Fabian, J. R., D. K. Morrison and I. O. Daar (1993b).** "Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes." J Cell Biol **122**(3): 645-52.
- Fan, H. Y., C. Tong, L. Lian, S. W. Li, W. X. Gao, Y. Cheng, D. Y. Chen, H. Schatten and Q. Y. Sun (2003).** "Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization." Biol Reprod **68**(3): 968-77.
- Fang, B. and M. W. Miller (2001).** "Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for O-GlcNAc during cell division." Exp Cell Res **263**(2): 243-53.
- Fang, G., H. Yu and M. W. Kirschner (1998a).** "The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation." Genes Dev **12**(12): 1871-83.

Références

- Fang, G., H. Yu and M. W. Kirschner (1998b).** "Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1." Mol Cell **2**(2): 163-71.
- Faruki, S., M. Doree and E. Karsenti (1992).** "cdc2 kinase-induced destabilization of MAP2-coated microtubules in Xenopus egg extracts." J Cell Sci **101** (Pt 1): 69-78.
- Faure, S., N. Morin and M. Doree (1998).** "Inactivation of protein kinase A is not required for c-mos translation during meiotic maturation of Xenopus oocytes." Oncogene **17**(10): 1215-21.
- Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle and J. M. Trzaskos (1998).** "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase." J Biol Chem **273**(29): 18623-32.
- Featherstone, C. and P. Russell (1991).** "Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase." Nature **349**(6312): 808-11.
- Fellous, A., M. Kubelka, C. Thibier, F. Taieb, O. Haccard and C. Jessus (1994).** "Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of Xenopus oocytes." Int J Dev Biol **38**(4): 651-9.
- Ferby, I., M. Blazquez, A. Palmer, R. Eritja and A. R. Nebreda (1999).** "A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes." Genes Dev **13**(16): 2177-89.
- Ferrell, J. E., Jr. (1999).** "Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg." Bioessays **21**(10): 833-42.
- Ferrell, J. E., Jr., M. Wu, J. C. Gerhart and G. S. Martin (1991).** "Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs." Mol Cell Biol **11**(4): 1965-71.
- Fesquet, D., P. J. Fitzpatrick, A. L. Johnson, K. M. Kramer, J. H. Toyn and L. H. Johnston (1999).** "A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast." Embo J **18**(9): 2424-34.
- Fesquet, D., J. C. Labbe, J. Derancourt, J. P. Capony, S. Galas, F. Girard, T. Lorca, J. Shuttleworth, M. Doree and J. C. Cavadore (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**(8): 3111-21.

- Finidori-Lepicard, J., S. Schorderet-Slatkine, J. Hanoune and E. E. Baulieu (1981).** "Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes." Nature **292**(5820): 255-7.
- Fisher, D. L., T. Brassac, S. Galas and M. Doree (1999a).** "Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes." Development **126**(20): 4537-46.
- Fisher, D. L., E. Mandart and M. Doree (2000).** "Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes." Embo J **19**(7): 1516-24.
- Fisher, D. L., N. Morin and M. Doree (1999b).** "A novel role for glycogen synthase kinase-3 in *Xenopus* development: maintenance of oocyte cell cycle arrest by a beta-catenin-independent mechanism." Development **126**(3): 567-76.
- Fisher, R. P. and D. O. Morgan (1994).** "A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase." Cell **78**(4): 713-24.
- Fortune, J. E., P. W. Concannon and W. Hansel (1975).** "Ovarian progesterone levels during in vitro oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*." Biol Reprod **13**(5): 561-7.
- Franklin, C. C. and A. S. Kraft (1995).** "Constitutively active MAP kinase kinase (MEK1) stimulates SAP kinase and c-Jun transcriptional activity in U937 human leukemic cells." Oncogene **11**(11): 2365-74.
- Franklin, C. C. and A. S. Kraft (1997).** "Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells." J Biol Chem **272**(27): 16917-23.
- Frank-Vaillant, M., O. Haccard, C. Thibier, R. Ozon, Y. Arlot-Bonnemains, C. Prigent and C. Jesus (2000).** "Progesterone regulates the accumulation and the activation of Eg2 kinase in *Xenopus* oocytes." J Cell Sci **113** (Pt 7): 1127-38.
- Frank-Vaillant, M., C. Jesus, R. Ozon, J. L. Maller and O. Haccard (1999).** "Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in *Xenopus* oocytes in response to progesterone." Mol Biol Cell **10**(10): 3279-88.
- Fraschini, R., E. Formenti, G. Lucchini and S. Piatti (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**(5): 979-91.
- Freeman, R. S., A. N. Meyer, J. Li and D. J. Donoghue (1992).** "Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mos protein

Références

- kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor." J Cell Biol **116**(3): 725-35.
- Freeman, R. S., K. M. Pickham, J. P. Kanki, B. A. Lee, S. V. Pena and D. J. Donoghue (1989).** "Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of Xenopus oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5805-9.
- Fukasawa, K. and G. F. Vande Woude (1995).** "Mos overexpression in Swiss 3T3 cells induces meiotic-like alterations of the mitotic spindle." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3430-4.
- Fukasawa, K. and G. F. Vande Woude (1997).** "Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability." Mol Cell Biol **17**(1): 506-18.
- Furuno, N., A. Kawasaki and N. Sagata (2003).** "Expression of cell-cycle regulators during Xenopus oogenesis." Gene Expr Patterns **3**(2): 165-8.
- Furuno, N., M. Nishizawa, K. Okazaki, H. Tanaka, J. Iwashita, N. Nakajo, Y. Ogawa and N. Sagata (1994).** "Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in Xenopus oocytes." Embo J **13**(10): 2399-410.
- Galaktionov, K. and D. Beach (1991).** "Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins." Cell **67**(6): 1181-94.
- Galaktionov, K., A. K. Lee, J. Eckstein, G. Draetta, J. Meckler, M. Loda and D. Beach (1995).** "CDC25 phosphatases as potential human oncogenes." Science **269**(5230): 1575-7.
- Gall, J. G., Z. Wu, C. Murphy and H. Gao (2004).** "Structure in the amphibian germinal vesicle." Exp Cell Res **296**(1): 28-34.
- Gallo, C. J., A. R. Hand, T. L. Jones and L. A. Jaffe (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**(2): 275-84.
- Garcia de Herreros, A., I. Dominguez, M. T. Diaz-Meco, G. Graziani, M. E. Cornett, P. H. Guddal, T. Johansen and J. Moscat (1991).** "Requirement of phospholipase C-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for maturation of Xenopus laevis oocytes in response to insulin and ras p21." J Biol Chem **266**(11): 6825-9.
- Gard, D. L. (1992).** "Microtubule organization during maturation of Xenopus oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles." Dev Biol **151**(2): 516-30.
-

Références

- Gard, D. L., B. J. Cha and M. M. Schroeder (1995).** "Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules, microtubule-associated proteins, and microtubule-organizing centers during amphibian oogenesis and early development." Curr Top Dev Biol **31**: 383-431.
- Gautier, J. and J. L. Maller (1991).** "Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation." Embo J **10**(1): 177-82.
- Gautier, J., J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt and J. L. Maller (1990).** "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*." Cell **60**(3): 487-94.
- Gautier, J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse and J. Maller (1988).** "Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*." Cell **54**(3): 433-9.
- Gebauer, F., W. Xu, G. M. Cooper and J. D. Richter (1994).** "Translational control by cytoplasmic polyadenylation of *c-mos* mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse." Embo J **13**(23): 5712-20.
- Giles, N., A. Forrest and B. Gabrielli (2003).** "14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate *cdc25B* localization and activity." J Biol Chem **278**(31): 28580-7.
- Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner (1991).** "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-8.
- Goalstone, M. L. and S. E. Sadler (2000).** "Analysis of farnesyl transferase activity during hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes." J Exp Zool **286**(2): 193-203.
- Godeau, J. F., S. Schorderet-Slatkine, P. Hubert and E. E. Baulieu (1978).** "Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(5): 2353-7.
- Goodhardt, M., N. Ferry, M. Buscaglia, E. E. Baulieu and J. Hanoune (1984).** "Does the guanine nucleotide regulatory protein Ni mediate progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase?" Embo J **3**(11): 2653-7.
- Gorbisky, G. J., R. H. Chen and A. W. Murray (1998).** "Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase." J Cell Biol **141**(5): 1193-205.
- Gordo, A. C., C. L. He, S. Smith and R. A. Fissore (2001).** "Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes." Mol Reprod Dev **59**(1): 106-14.

- Gotoh, Y., N. Masuyama, K. Dell, K. Shirakabe and E. Nishida (1995).** "Initiation of *Xenopus* oocyte maturation by activation of the mitogen- activated protein kinase cascade." J Biol Chem **270**(43): 25898-904.
- Gotoh, Y., K. Moriyama, S. Matsuda, E. Okumura, T. Kishimoto, H. Kawasaki, K. Suzuki, I. Yahara, H. Sakai and E. Nishida (1991).** "Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF." Embo J **10**(9): 2661-8.
- Gotoh, Y. and E. Nishida (1995).** "Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade." Mol Reprod Dev **42**(4): 486-92.
- Gould, K. L. and P. Nurse (1989).** "Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis." Nature **342**(6245): 39-45.
- Graves, P. R., C. M. Lovly, G. L. Uy and H. Piwnica-Worms (2001).** "Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding." Oncogene **20**(15): 1839-51.
- Griffith, L. S. and B. Schmitz (1999).** "O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation." Eur J Biochem **262**(3): 824-31.
- Groom, L. A., A. A. Sneddon, D. R. Alessi, S. Dowd and S. M. Keyse (1996).** "Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase." Embo J **15**(14): 3621-32.
- Gross, S. D., A. L. Lewellyn and J. L. Maller (2001).** "A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **276**(49): 46099-103.
- Gross, S. D., M. S. Schwab, A. L. Lewellyn and J. L. Maller (1999).** "Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk." Science **286**(5443): 1365-7.
- Gross, S. D., M. S. Schwab, F. E. Taieb, A. L. Lewellyn, Y. W. Qian and J. L. Maller (2000).** "The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk)." Curr Biol **10**(8): 430-8.
- Guan, K. L., C. Figueroa, T. R. Brtva, T. Zhu, J. Taylor, T. D. Barber and A. B. Vojtek (2000).** "Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt." J Biol Chem **275**(35): 27354-9.
- Guo, X. W., J. P. Th'ng, R. A. Swank, H. J. Anderson, C. Tudan, E. M. Bradbury and M. Roberge (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**(5): 976-85.

- Gupta, R. C., J. Neumann, A. M. Watanabe, M. Lesch and H. N. Sabbah (1996).** "Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): H1159-64.
- Gutierrez, L., A. I. Magee, C. J. Marshall and J. F. Hancock (1989).** "Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis." Embo J **8**(4): 1093-8.
- Guttridge, K. L., L. D. Smith and R. Miledi (1995).** "Xenopus Gq alpha subunit activates the phosphatidylinositol pathway in Xenopus oocytes but does not consistently induce oocyte maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1297-301.
- Guzman, L., X. Romo, R. Grandy, X. Soto, M. Montecino, M. Hinrichs and J. Olate (2004).** "A Gbetagamma stimulated adenylyl cyclase is involved in xenopus laevis oocyte maturation." J Cell Physiol.
- Haccard, O., C. Jesus, X. Cayla, J. Goris, W. Merlevede and R. Ozon (1990).** "In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the Xenopus oocyte." Eur J Biochem **192**(3): 633-42.
- Haccard, O., A. Lewellyn, R. S. Hartley, E. Erikson and J. L. Maller (1995).** "Induction of Xenopus oocyte meiotic maturation by MAP kinase." Dev Biol **168**(2): 677-82.
- Haccard, O., B. Sarcevic, A. Lewellyn, R. Hartley, L. Roy, T. Izumi, E. Erikson and J. L. Maller (1993).** "Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase." Science **262**(5137): 1262-5.
- Hadwiger, J. A., C. Wittenberg, M. D. Mendenhall and S. I. Reed (1989).** "The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* suc1+ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex." Mol Cell Biol **9**(5): 2034-41.
- Hagag, N., L. Diamond, R. Palermo and S. Lyubsky (1990).** "High expression of ras p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells." Oncogene **5**(10): 1481-9.
- Hagting, A., M. Jackman, K. Simpson and J. Pines (1999).** "Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal." Curr Biol **9**(13): 680-9.
- Hainaut, P., A. Kowalski, S. Giorgetti, V. Baron and E. Van Obberghen (1991).** "Insulin and insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) receptors in *Xenopus laevis* oocytes. Comparison with insulin receptors from liver and muscle." Biochem J **273** (Pt 3): 673-8.

Références

- Hake, L. E. and J. D. Richter (1994).** "CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation." Cell **79**(4): 617-27.
- Haltiwanger, R. S., K. Grove and G. A. Philipsberg (1998).** "Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate." J Biol Chem **273**(6): 3611-7.
- Haltiwanger, R. S., G. D. Holt and G. W. Hart (1990).** "Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **265**(5): 2563-8.
- Haltiwanger, R. S. and G. A. Philipsberg (1997).** "Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells." J Biol Chem **272**(13): 8752-8.
- Han, I. and J. E. Kudlow (1997).** "Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility." Mol Cell Biol **17**(5): 2550-8.
- Han, J. K., K. Fukami and R. Nuccitelli (1992).** "Reducing inositol lipid hydrolysis, Ins(1,4,5)P3 receptor availability, or Ca²⁺ gradients lengthens the duration of the cell cycle in *Xenopus laevis* blastomeres." J Cell Biol **116**(1): 147-56.
- Hancock, J. F. (1995).** "Prenylation and palmitoylation analysis." Methods Enzymol **255**: 237-45.
- Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs and C. J. Marshall (1989).** "All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated." Cell **57**(7): 1167-77.
- Hanlon, N. and D. Barford (1998).** "Purification and crystallization of the CDK-associated protein phosphatase KAP expressed in *Escherichia coli*." Protein Sci **7**(2): 508-11.
- Hannon, G. J., D. Casso and D. Beach (1994).** "KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1731-5.
- Hartley, R. S., A. L. Lewellyn and J. L. Maller (1994).** "MAP kinase is activated during mesoderm induction in *Xenopus laevis*." Dev Biol **163**(2): 521-4.
- Hatch, K. R. and D. G. Capco (2001).** "Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural elements of the mouse egg: potentiation of MAP kinase activity by CaM KII." Mol Reprod Dev **58**(1): 69-77.

Références

- Hayles, J., D. Beach, B. Durkacz and P. Nurse (1986).** "The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function." Mol Gen Genet **202**(2): 291-3.
- Heald, R. and F. McKeon (1990).** "Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis." Cell **61**(4): 579-89.
- Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman and E. Karsenti (1996).** "Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts." Nature **382**(6590): 420-5.
- Hedgepeth, C. M., L. J. Conrad, J. Zhang, H. C. Huang, V. M. Lee and P. S. Klein (1997).** "Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action." Dev Biol **185**(1): 82-91.
- Hehl, S., B. Stoyanov, W. Oehrl, R. Schonherr, R. Wetzker and S. H. Heinemann (2001).** "Phosphoinositide 3-kinase-gamma induces *Xenopus* oocyte maturation via lipid kinase activity." Biochem J **360**(Pt 3): 691-8.
- Heidecker, G., M. Huleihel, J. L. Cleveland, W. Kolch, T. W. Beck, P. Lloyd, T. Pawson and U. R. Rapp (1990).** "Mutational activation of *c-raf-1* and definition of the minimal transforming sequence." Mol Cell Biol **10**(6): 2503-12.
- Hershko, A., D. Ganoh, J. Pehrson, R. E. Palazzo and L. H. Cohen (1991).** "Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts." J Biol Chem **266**(25): 16376-9.
- Hochegger, H., A. Klotzbucher, J. Kirk, M. Howell, K. le Guellec, K. Fletcher, T. Duncan, M. Sohail and T. Hunt (2001).** "New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation." Development **128**(19): 3795-807.
- Hoffmann, I., P. R. Clarke, M. J. Marcote, E. Karsenti and G. Draetta (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**(1): 53-63.
- Hoffmann, I., G. Draetta and E. Karsenti (1994).** "Activation of the phosphatase activity of human *cdc25A* by a *cdk2*-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition." Embo J **13**(18): 4302-10.
- Horne, M. M. and T. M. Guadagno (2003).** "A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle." J Cell Biol **161**(6): 1021-8.
- Howard, E. L., A. Charlesworth, J. Welk and A. M. MacNicol (1999).** "The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates *mos* mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation." Mol Cell Biol **19**(3): 1990-9.

Références

- Huang, W., D. S. Kessler and R. L. Erikson (1995).** "Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants." Mol Biol Cell **6**(3): 237-45.
- Huchon, D., N. Crozet, N. Cantenot and R. Ozon (1981).** "Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte: description of a transient microtubular structure." Reprod Nutr Dev **21**(1): 135-48.
- Huchon, D., H. Rime, C. Jessus and R. Ozon (1993).** "Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis." Biol Cell **77**(2): 133-41.
- Hutchins, J. R., D. Dikovskaya and P. R. Clarke (2002).** "Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in *Xenopus* Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding." FEBS Lett **528**(1-3): 267-71.
- Itoh, T. J., S. Hisanaga, T. Hosoi, T. Kishimoto and H. Hotani (1997).** "Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics." Biochemistry **36**(41): 12574-82.
- Iwabuchi, M., K. Ohsumi, T. M. Yamamoto, W. Sawada and T. Kishimoto (2000).** "Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts." Embo J **19**(17): 4513-23.
- Izumi, T. and J. L. Maller (1991).** "Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions." Mol Cell Biol **11**(8): 3860-7.
- Izumi, T. and J. L. Maller (1993).** "Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase." Mol Biol Cell **4**(12): 1337-50.
- Izumi, T., D. H. Walker and J. L. Maller (1992).** "Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity." Mol Biol Cell **3**(8): 927-39.
- Jacobelli, S., J. Hanocq, E. Baltus and J. Brachet (1974).** "Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor." Differentiation **2**(3): 129-35.
- Janicot, M., J. R. Flores-Riveros and M. D. Lane (1991).** "The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in *Xenopus laevis* oocytes." J Biol Chem **266**(15): 9382-91.
- Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague and N. P. Pavletich (1995).** "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." Nature **376**(6538): 313-20.
- Jessus, C. and R. Ozon (2004).** "How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation?" Biol Cell **96**(3): 187-92.

- Jessus, C., H. Rime, O. Haccard, J. Van Lint, J. Goris, W. Merlevede and R. Ozon (1991).** "Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP." Development **111**(3): 813-20.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002).** "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-2.
- Kakizuka, A., B. Sebastian, U. Borgmeyer, I. Hermans-Borgmeyer, J. Bolado, T. Hunter, M. F. Hoekstra and R. M. Evans (1992).** "A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed." Genes Dev **6**(4): 578-90.
- Kalab, P., J. Z. Kubiak, M. H. Verlhac, W. H. Colledge and B. Maro (1996).** "Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation." Development **122**(6): 1957-64.
- Kalab, P., R. T. Pu and M. Dasso (1999).** "The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly." Curr Biol **9**(9): 481-4.
- Kallio, M., J. Weinstein, J. R. Daum, D. J. Burke and G. J. Gorbsky (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**(6): 1393-406.
- Karaïskou, A., A. Dupre, O. Haccard and C. Jessus (2001).** "From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus* oocytes: a puzzling signalling pathway." Biol Cell **93**(1-2): 35-46.
- Karaïskou, A., A. C. Lepretre, G. Pahlavan, D. Du Pasquier, R. Ozon and C. Jessus (2004).** "Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes." Development **131**(7): 1543-52.
- Karsenti, E., J. Newport and M. Kirschner (1984).** "Respective roles of centrosomes and chromatin in the conversion of microtubule arrays from interphase to metaphase." J Cell Biol **99**(1 Pt 2): 47s-54s.
- Kashina, A. S., R. J. Baskin, D. G. Cole, K. P. Wedaman, W. M. Saxton and J. M. Scholey (1996).** "A bipolar kinesin." Nature **379**(6562): 270-2.
- Katada, T., M. Oinuma and M. Ui (1986).** "Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin." J Biol Chem **261**(11): 5215-21.

Références

- Katsu, Y., N. Minshall, Y. Nagahama and N. Standart (1999).** "Ca²⁺ is required for phosphorylation of clam p82/CPEB in vitro: implications for dual and independent roles of MAP and Cdc2 kinases." Dev Biol **209**(1): 186-99.
- Kearse, K. P. and G. W. Hart (1991).** "Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1701-5.
- Kikuchi, A. and L. T. Williams (1994).** "The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation." J Biol Chem **269**(31): 20054-9.
- Kim, S. H., D. P. Lin, S. Matsumoto, A. Kitazono and T. Matsumoto (1998).** "Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint." Science **279**(5353): 1045-7.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia and M. S. Marshall (1998).** "The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338." Nature **396**(6707): 180-3.
- Kirschner, M. and T. Mitchison (1986).** "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." Cell **45**(3): 329-42.
- Kobayashi, H., J. Minshull, C. Ford, R. Golsteyn, R. Poon and T. Hunt (1991).** "On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*." J Cell Biol **114**(4): 755-65.
- Kobayashi, H., E. Stewart, R. Poon, J. P. Adamczewski, J. Gannon and T. Hunt (1992).** "Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits." Mol Biol Cell **3**(11): 1279-94.
- Kolch, W. (2000).** "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- Korn, L. J., C. W. Siebel, F. McCormick and R. A. Roth (1987).** "Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes." Science **236**(4803): 840-3.
- Kosako, H., Y. Gotoh and E. Nishida (1994a).** "Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest." J Biol Chem **269**(45): 28354-8.
- Kosako, H., Y. Gotoh and E. Nishida (1994b).** "Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation." Embo J **13**(9): 2131-8.

Références

- Kosako, H., E. Nishida and Y. Gotoh (1993).** "cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates." Embo J **12**(2): 787-94.
- Kotani, S., H. Tanaka, H. Yasuda and K. Todokoro (1999).** "Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors." J Cell Biol **146**(4): 791-800.
- Kotani, T. and M. Yamashita (2002).** "Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation." Dev Biol **252**(2): 271-86.
- Kovacina, K. S. and R. A. Roth (1993).** "Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein." Biochem Biophys Res Commun **192**(3): 1303-11.
- Kramer, E. R., C. Gieffers, G. Holzl, M. Hengstschlager and J. M. Peters (1998).** "Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family." Curr Biol **8**(22): 1207-10.
- Krek, W. and E. A. Nigg (1991a).** "Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites." Embo J **10**(2): 305-16.
- Krek, W. and E. A. Nigg (1991b).** "Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates." Embo J **10**(11): 3331-41.
- Kumagai, A. and W. G. Dunphy (1991).** "The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system." Cell **64**(5): 903-14.
- Kumagai, A. and W. G. Dunphy (1992).** "Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts." Cell **70**(1): 139-51.
- Kumagai, A. and W. G. Dunphy (1996).** "Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts." Science **273**(5280): 1377-80.
- Kumagai, A., P. S. Yakowec and W. G. Dunphy (1998).** "14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts." Mol Biol Cell **9**(2): 345-54.
- Lacal, J. C., P. de la Pena, J. Moscat, P. Garcia-Barreno, P. S. Anderson and S. A. Aaronson (1987).** "Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-ras p21." Science **238**(4826): 533-6.
- Larsson, N., U. Marklund, H. M. Gradin, G. Brattsand and M. Gullberg (1997).** "Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the

Références

- regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis." Mol Cell Biol **17**(9): 5530-9.
- Larsson, N., H. Melander, U. Marklund, O. Osterman and M. Gullberg (1995).** "G2/M transition requires multisite phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems." J Biol Chem **270**(23): 14175-83.
- Laurent, A., M. Basset, M. Doree and C. J. Le Peuch (1988).** "Involvement of a calcium-phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of *Xenopus laevis* oocytes." FEBS Lett **226**(2): 324-30.
- Lawler, S. (1998).** "Microtubule dynamics: if you need a shrink try stathmin/Op18." Curr Biol **8**(6): R212-4.
- Lazar, S., D. Galiani and N. Dekel (2002).** "cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes." Mol Endocrinol **16**(2): 331-41.
- Lee, J., T. Miyano and R. M. Moor (2000).** "Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes." Zygote **8**(2): 119-25.
- Lee, M. S., T. Enoch and H. Piwnica-Worms (1994).** "mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15." J Biol Chem **269**(48): 30530-7.
- Lees, E. M. and E. Harlow (1993).** "Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase." Mol Cell Biol **13**(2): 1194-201.
- Leevers, S. J., H. F. Paterson and C. J. Marshall (1994).** "Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane." Nature **369**(6479): 411-4.
- Lefebvre, C., M. E. Terret, A. Djiane, P. Rassinier, B. Maro and M. H. Verlhac (2002).** "Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate." J Cell Biol **157**(4): 603-13.
- Lefebvre, T., C. Alonso, S. Mahboub, M. J. Dupire, J. P. Zanetta, M. L. Caillet-Boudin and J. C. Michalski (1999).** "Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line." Biochim Biophys Acta **1472**(1-2): 71-81.
- Lemaitre, J. M., S. Bocquet and M. Mechali (2002).** "Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation." Nature **419**(6908): 718-22.

- Lenormand, J. L., R. W. Dellinger, K. E. Knudsen, S. Subramani and D. J. Donoghue (1999).** "Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition." Embo J **18**(7): 1869-77.
- Lewis, T., L. A. Groom, A. A. Sneddon, C. Smythe and S. M. Keyse (1995).** "XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from *Xenopus laevis*: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development." J Cell Sci **108 (Pt 8)**: 2885-96.
- Li, Y. and R. Benezra (1996).** "Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2." Science **274**(5285): 246-8.
- Li, Y., C. Gorbea, D. Mahaffey, M. Rechsteiner and R. Benezra (1997).** "MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12431-6.
- Liu, F., J. J. Stanton, Z. Wu and H. Piwnica-Worms (1997).** "The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex." Mol Cell Biol **17**(2): 571-83.
- Liu, J. X., B. Singh, D. Wlodek and R. B. Arlinghaus (1990).** "Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity." Oncogene **5**(2): 171-8.
- Liu, X. J., A. Sorisky, L. Zhu and T. Pawson (1995a).** "Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation." Mol Cell Biol **15**(7): 3563-70.
- Liu, Y., M. Gorospe, C. Yang and N. J. Holbrook (1995b).** "Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation." J Biol Chem **270**(15): 8377-80.
- Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller (1988).** "Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(9): 3009-13.
- Lopez-Hernandez, E. and E. Santos (1999).** "Oncogenic Ras-induced germinal vesicle breakdown is independent of phosphatidylinositol 3-kinase in *Xenopus* oocytes." FEBS Lett **451**(3): 284-8.
- Lorca, T., A. Castro, A. M. Martinez, S. Vigneron, N. Morin, S. Sigrist, C. Lehner, M. Doree and J. C. Labbe (1998).** "Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts." Embo J **17**(13): 3565-75.
- Lorca, T., F. H. Cruzalegui, D. Fesquet, J. C. Cavadore, J. Mery, A. Means and M. Doree (1993).** "Calmodulin-dependent protein kinase II mediates

Références

- inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs." Nature **366**(6452): 270-3.
- Lorca, T., S. Galas, D. Fesquet, A. Devault, J. C. Cavadore and M. Doree (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**(8): 2087-93.
- Lorca, T., J. C. Labbe, A. Devault, D. Fesquet, J. P. Capony, J. C. Cavadore, F. Le Bouffant and M. Doree (1992).** "Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase." Embo J **11**(7): 2381-90.
- Lowe, P. N., M. Sydenham and M. J. Page (1990).** "The Ha-ras protein, p21, is modified by a derivative of mevalonate and methyl-esterified when expressed in the insect/baculovirus system." Oncogene **5**(7): 1045-8.
- Lutz, L. B., L. M. Cole, M. K. Gupta, K. W. Kwist, R. J. Auchus and S. R. Hammes (2001).** "Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13728-33.
- Lutz, L. B., B. Kim, D. Jahani and S. R. Hammes (2000).** "G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression." J Biol Chem **275**(52): 41512-20.
- Ma, C., C. Cummings and X. J. Liu (2003).** "Biphasic activation of Aurora-A kinase during the meiosis I- meiosis II transition in *Xenopus* oocytes." Mol Cell Biol **23**(5): 1703-16.
- Makela, T. P., J. P. Tassan, E. A. Nigg, S. Frutiger, G. J. Hughes and R. A. Weinberg (1994).** "A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15." Nature **371**(6494): 254-7.
- Maller, J. L. (2001).** "The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 8-10.
- Maller, J. L., F. R. Butcher and E. G. Krebs (1979).** "Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **254**(3): 579-82.
- Maller, J. L. and J. W. Koontz (1981).** "A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin." Dev Biol **85**(2): 309-16.
- Maller, J. L. and E. G. Krebs (1977).** "Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic

Références

- subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." J Biol Chem **252**(5): 1712-8.
- Maller, J. L. and E. G. Krebs (1980).** "Regulation of oocyte maturation." Curr Top Cell Regul **16**: 271-311.
- Manne, V., D. Roberts, A. Tobin, E. O'Rourke, M. De Virgilio, C. Meyers, N. Ahmed, B. Kurz, M. Resh, H. F. Kung and et al. (1990).** "Identification and preliminary characterization of protein-cysteine farnesyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7541-5.
- Mansour, S. J., K. A. Resing, J. M. Candi, A. S. Hermann, J. W. Gloor, K. R. Herskind, M. Wartmann, R. J. Davis and N. G. Ahn (1994).** "Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis." J Biochem (Tokyo) **116**(2): 304-14.
- Margolis, S. S., S. Walsh, D. C. Weiser, M. Yoshida, S. Shenolikar and S. Kornbluth (2003).** "PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation." Embo J **22**(21): 5734-45.
- Marklund, U., N. Larsson, H. M. Gradin, G. Brattsand and M. Gullberg (1996).** "Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics." Embo J **15**(19): 5290-8.
- Mason, C. S., C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall and R. Marais (1999).** "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation." Embo J **18**(8): 2137-48.
- 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**(3): 365-75.
- Masui, Y. (2000).** "The elusive cytostatic factor in the animal egg." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 228-32.
- Masui, Y. and C. L. Markert (1971).** "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." J Exp Zool **177**(2): 129-45.
- Matten, W. T., T. D. Copeland, N. G. Ahn and G. F. Vande Woude (1996).** "Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation." Dev Biol **179**(2): 485-92.
- McClain, D. A., H. Maegawa, J. Lee, T. J. Dull, A. Ulrich and J. M. Olefsky (1987).** "A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis." J Biol Chem **262**(30): 14663-71.
- Meijer, L., L. Azzi and J. Y. Wang (1991).** "Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation." Embo J **10**(6): 1545-54.

Références

- Mendez, R., D. Barnard and J. D. Richter (2002).** "Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction." Embo J **21**(7): 1833-44.
- Mendez, R., L. E. Hake, T. Andresson, L. E. Littlepage, J. V. Ruderman and J. D. Richter (2000a).** "Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA." Nature **404**(6775): 302-7.
- Mendez, R., K. G. Murthy, K. Ryan, J. L. Manley and J. D. Richter (2000b).** "Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex." Mol Cell **6**(5): 1253-9.
- Mendez, R. and J. D. Richter (2001).** "Translational control by CPEB: a means to the end." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 521-9.
- Merdes, A. and D. W. Cleveland (1997).** "Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components." J Cell Biol **138**(5): 953-6.
- Merdes, A., R. Heald, K. Samejima, W. C. Earnshaw and D. W. Cleveland (2000).** "Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA." J Cell Biol **149**(4): 851-62.
- Merdes, A., K. Ramyar, J. D. Vechio and D. W. Cleveland (1996).** "A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly." Cell **87**(3): 447-58.
- Milarski, K. L., W. G. Dunphy, P. Russell, S. J. Gould and J. W. Newport (1991).** "Cloning and characterization of *Xenopus cdc2*, a component of MPF." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 377-84.
- Millar, J. B., J. Blevitt, L. Gerace, K. Sadhu, C. Featherstone and P. Russell (1991).** "p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10500-4.
- Miller, P., C. DiOrio, M. Moyer, R. C. Schnur, A. Bruskin, W. Cullen and J. D. Moyer (1994).** "Depletion of the erbB-2 gene product p185 by benzoquinoid ansamycins." Cancer Res **54**(10): 2724-30.
- Mils, V., V. Baldin, F. Goubin, I. Pinta, C. Papin, M. Waye, A. Eychene and B. Ducommun (2000).** "Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase." Oncogene **19**(10): 1257-65.
- Mineo, C., R. G. Anderson and M. A. White (1997).** "Physical association with ras enhances activation of membrane-bound raf (RafCAAX)." J Biol Chem **272**(16): 10345-8.
- Minshull, J., A. Murray, A. Colman and T. Hunt (1991).** "Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis." J Cell Biol **114**(4): 767-72.

- Minshull, J., J. Pines, R. Golsteyn, N. Standart, S. Mackie, A. Colman, J. Blow, J. V. Ruderman, M. Wu and T. Hunt (1989).** "The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division." J Cell Sci Suppl **12**: 77-97.
- Minshull, J., H. Sun, N. K. Tonks and A. W. Murray (1994).** "A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts." Cell **79**(3): 475-86.
- Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U. R. Rapp and T. Sander (1984).** "Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins." Nature **312**(5994): 558-61.
- Mood, K., Y. S. Bong, H. S. Lee, A. Ishimura and I. O. Daar (2004).** "Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in *Xenopus* oocytes." Cell Signal **16**(5): 631-42.
- Morin, N., A. Abrieu, T. Lorca, F. Martin and M. Doree (1994).** "The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs." Embo J **13**(18): 4343-52.
- Morris, M. C., A. Heitz, J. Mery, F. Heitz and G. Divita (2000).** "An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins." J Biol Chem **275**(37): 28849-57.
- Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997).** "The complexity of Raf-1 regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 174-9.
- Morrison, D. K., G. Heidecker, U. R. Rapp and T. D. Copeland (1993).** "Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase." J Biol Chem **268**(23): 17309-16.
- Muda, M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, U. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies, A. Ashworth and S. Arkininstall (1996).** "The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **271**(44): 27205-8.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman and W. G. Dunphy (1995a).** "Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase." Mol Biol Cell **6**(1): 119-34.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai and W. G. Dunphy (1995b).** "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." Science **270**(5233): 86-90.
- Mulner, O., R. Belle and R. Ozon (1983).** "cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the *Xenopus* oocyte: evidence for an intracellular feedback mechanism." Mol Cell Endocrinol **31**(1): 151-60.

Références

- Mulner-Lorillon, O., R. Poulhe, P. Cormier, J. C. Labbe, M. Doree and R. Belle (1989).** "Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate." FEBS Lett **251**(1-2): 219-24.
- Murakami, M. S. and G. F. Vande Woude (1998).** "Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *Mos*." Development **125**(2): 237-48.
- Murray, A. W. and M. W. Kirschner (1989).** "Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle." Nature **339**(6222): 275-80.
- Murray, A. W., M. J. Solomon and M. W. Kirschner (1989).** "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity." Nature **339**(6222): 280-6.
- Muslin, A. J., A. Klippel and L. T. Williams (1993a).** "Phosphatidylinositol 3-kinase activity is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation." Mol Cell Biol **13**(11): 6661-6.
- Muslin, A. J., A. M. MacNicol and L. T. Williams (1993b).** "Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of *mos*." Mol Cell Biol **13**(7): 4197-202.
- Myers, M. G., Jr., X. J. Sun, B. Cheatham, B. R. Jachna, E. M. Glasheen, J. M. Backer and M. F. White (1993).** "IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase." Endocrinology **132**(4): 1421-30.
- Nagahama, Y. (1997).** "17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action." Steroids **62**(1): 190-6.
- Nakajo, N., S. Yoshitome, J. Iwashita, M. Iida, K. Uto, S. Ueno, K. Okamoto and N. Sagata (2000).** "Absence of *Wee1* ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes." Genes Dev **14**(3): 328-38.
- Nasmyth, K., J. M. Peters and F. Uhlmann (2000).** "Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids." Science **288**(5470): 1379-85.
- Nassar, N., G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick and A. Wittinghofer (1995).** "The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue." Nature **375**(6532): 554-60.
- Nebreda, A. R., J. V. Gannon and T. Hunt (1995).** "Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during

Références

- progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes." Embo J **14**(22): 5597-607.
- Nebreda, A. R. and T. Hunt (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**(5): 1979-86.
- Nebreda, A. R., D. Martin-Zanca, D. R. Kaplan, L. F. Parada and E. Santos (1991).** "Induction by NGF of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes expressing the trk proto-oncogene product." Science **252**(5005): 558-61.
- Neckers, L., T. W. Schulte and E. Mimnaugh (1999).** "Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity." Invest New Drugs **17**(4): 361-73.
- Nelkin, B., C. Nichols and B. Vogelstein (1980).** "Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes." FEBS Lett **109**(2): 233-8.
- Nigg, E. A. (1996).** "Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control?" Curr Opin Cell Biol **8**(3): 312-7.
- Nishizawa, M., N. Furuno, K. Okazaki, H. Tanaka, Y. Ogawa and N. Sagata (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): 4021-7.
- Nishizawa, M., K. Okazaki, N. Furuno, N. Watanabe and N. Sagata (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**(7): 2433-46.
- Norbury, C., J. Blow and P. Nurse (1991).** "Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates." Embo J **10**(11): 3321-9.
- Northup, J. K., M. D. Smigel, P. C. Sternweis and A. G. Gilman (1983).** "The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000-dalton (alpha) subunit." J Biol Chem **258**(18): 11369-76.
- Nugent, J. H., C. E. Alfa, T. Young and J. S. Hyams (1991).** "Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis." J Cell Sci **99** (Pt 3): 669-74.
- O'Connor, C. M. and L. D. Smith (1976).** "Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action." Dev Biol **52**(2): 318-22.

Références

- Oe, T., N. Nakajo, Y. Katsuragi, K. Okazaki and N. Sagata (2001).** "Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in *Xenopus* oocytes." Dev Biol **229**(1): 250-61.
- Ohba, T., M. Nakamura, H. Nishitani and T. Nishimoto (1999).** "Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran." Science **284**(5418): 1356-8.
- Ohsumi, K., W. Sawada and T. Kishimoto (1994).** "Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing *Xenopus* oocytes." J Cell Sci **107** (Pt 11): 3005-13.
- Okabe, M., Y. Uehara, T. Miyagishima, T. Itaya, M. Tanaka, Y. Kuni-Eda, M. Kurosawa and T. Miyazaki (1992).** "Effect of herbimycin A, an antagonist of tyrosine kinase, on bcr/abl oncoprotein-associated cell proliferations: abrogative effect on the transformation of murine hematopoietic cells by transfection of a retroviral vector expressing oncoprotein P210bcr/abl and preferential inhibition on Ph1-positive leukemia cell growth." Blood **80**(5): 1330-8.
- Okumura, E., T. Fukuhara, H. Yoshida, S. Hanada Si, R. Kozutsumi, M. Mori, K. Tachibana and T. Kishimoto (2002).** "Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition." Nat Cell Biol **4**(2): 111-6.
- Olate, J., C. C. Allende, J. E. Allende, R. D. Sekura and L. Birnbaumer (1984).** "Oocyte adenylyl cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin." FEBS Lett **175**(1): 25-30.
- Ookata, K., S. Hisanaga, J. C. Bulinski, H. Murofushi, H. Aizawa, T. J. Itoh, H. Hotani, E. Okumura, K. Tachibana and T. Kishimoto (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**(5): 849-62.
- Opresko, L. K. and H. S. Wiley (1990).** "Functional reconstitution of the human epidermal growth factor receptor system in *Xenopus* oocytes." J Cell Biol **111**(4): 1661-71.
- Oskarsson, M., W. L. McClements, D. G. Blair, J. V. Maizel and G. F. Vande Woude (1980).** "Properties of a normal mouse cell DNA sequence (src) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus." Science **207**(4436): 1222-4.
- Palmer, A., A. C. Gavin and A. R. Nebreda (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**(17): 5037-47.

Références

- Pan, B. T. and G. M. Cooper (1990).** "Role of phosphatidylinositide metabolism in ras-induced *Xenopus* oocyte maturation." *Mol Cell Biol* **10**(3): 923-9.
- Papin, C., C. Rouget, T. Lorca, A. Castro and E. Mandart (2004).** "XCdh1 is involved in progesterone-induced oocyte maturation." *Dev Biol* **272**(1): 66-75.
- Paris, J. and M. Philippe (1990).** "Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early *Xenopus* development." *Dev Biol* **140**(1): 221-4.
- Paris, J., K. Swenson, H. Piwnica-Worms and J. D. Richter (1991).** "Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein." *Genes Dev* **5**(9): 1697-708.
- Parker, L. L., S. Atherton-Fessler and H. Piwnica-Worms (1992).** "p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2917-21.
- Patra, D. and W. G. Dunphy (1996).** "Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control." *Genes Dev* **10**(12): 1503-15.
- Patra, D. and W. G. Dunphy (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**(16): 2549-59.
- Patra, D., S. X. Wang, A. Kumagai and W. G. Dunphy (1999).** "The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators." *J Biol Chem* **274**(52): 36839-42.
- Paules, R. S., R. Buccione, R. C. Moschel, G. F. Vande Woude and J. J. Eppig (1989).** "Mouse *Mos* protooncogene product is present and functions during oogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5395-9.
- Paulovich, A. G. and L. H. Hartwell (1995).** "A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage." *Cell* **82**(5): 841-7.
- Pawelczyk, T., A. Matecki and A. Dettlaff (1998).** "Recombinant protein kinase C-gamma phorbol binding domain upon microinjection blocked insulin-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes." *FEBS Lett* **423**(1): 31-4.
- Pellaz, V. and S. Schorderet-Slatkine (1989).** "Evidence for a pertussis toxin-sensitive G protein involved in the control of meiotic reinitiation of *Xenopus laevis* oocytes." *Exp Cell Res* **183**(1): 245-50.
- Perdiguero, E., M. J. Pillaire, J. F. Bodart, F. Hennesdorf, M. Frodin, N. S. Duesbery, G. Alonso and A. R. Nebreda (2003).** "Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C." *Embo J* **22**(21): 5746-56.

- Peter, M., A. Castro, T. Lorca, C. Le Peuch, L. Magnaghi-Jaulin, M. Doree and J. C. Labbe (2001).** "The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes." Nat Cell Biol **3**(1): 83-7.
- Peter, M., J. C. Labbe, M. Doree and E. Mandart (2002).** "A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK." Development **129**(9): 2129-39.
- Peter, M., J. Nakagawa, M. Doree, J. C. Labbe and E. A. Nigg (1990).** "In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase." Cell **61**(4): 591-602.
- Peter, M., J. S. Sanghera, S. L. Pelech and E. A. Nigg (1992).** "Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2." Eur J Biochem **205**(1): 287-94.
- Pfarr, C. M., M. Coue, P. M. Grissom, T. S. Hays, M. E. Porter and J. R. McIntosh (1990).** "Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis." Nature **345**(6272): 263-5.
- Pham, C. D., V. B. Vuyyuru, Y. Yang, W. Bai and B. Singh (1999).** "Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos." Oncogene **18**(30): 4287-94.
- Picard, A., S. Galas, G. Peaucellier and M. Doree (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**(14): 3590-8.
- Pines, J. and T. Hunter (1994).** "The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B." Embo J **13**(16): 3772-81.
- Poon, R. Y. and T. Hunter (1995).** "Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin." Science **270**(5233): 90-3.
- Poon, R. Y., K. Yamashita, J. P. Adamczewski, T. Hunt and J. Shuttleworth (1993).** "The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2." Embo J **12**(8): 3123-32.
- Posada, J., J. Sanghera, S. Pelech, R. Aebersold and J. A. Cooper (1991).** "Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts." Mol Cell Biol **11**(5): 2517-28.

Références

- Posada, J., N. Yew, N. G. Ahn, G. F. Vande Woude and J. A. Cooper (1993).** "Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro." Mol Cell Biol **13**(4): 2546-53.
- Pronk, G. J., J. McGlade, G. Pelicci, T. Pawson and J. L. Bos (1993).** "Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins." J Biol Chem **268**(8): 5748-53.
- Propst, F. and G. F. Vande Woude (1985).** "Expression of c-mos proto-oncogene transcripts in mouse tissues." Nature **315**(6019): 516-8.
- Qian, Y. W., E. Erikson, C. Li and J. L. Maller (1998a).** "Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*." Mol Cell Biol **18**(7): 4262-71.
- Qian, Y. W., E. Erikson and J. L. Maller (1998b).** "Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1." Science **282**(5394): 1701-4.
- Raingaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995).** "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr. and J. R. Stephenson (1983).** "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(14): 4218-22.
- Ray, M. K., B. Datta, A. Chakraborty, A. Chattopadhyay, S. Meza-Keuthen and N. K. Gupta (1992).** "The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 539-43.
- Reverte, C. G., M. D. Ahearn and L. E. Hake (2001).** "CPEB degradation during *Xenopus* oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome." Dev Biol **231**(2): 447-58.
- Reynhout, J. K. and L. D. Smith (1974).** "Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone." Dev Biol **38**(2): 394-400.
- Richter, J. D. (1999).** "Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 446-56.
- Richter, J. D. (2001).** "Think globally, translate locally: what mitotic spindles and neuronal synapses have in common." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7069-71.

Références

- Rime, H., D. Huchon, V. De Smedt, C. Thibier, K. Galaktionov, C. Jesus and R. Ozon (1994).** "Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I." *Biol Cell* **82**(1): 11-22.
- Roche, S., J. Downward, P. Raynal and S. A. Courtneidge (1998).** "A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7119-29.
- Roos, M. D., K. Su, J. R. Baker and J. E. Kudlow (1997).** "O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6472-80.
- Roquemore, E. P., M. R. Chevrier, R. J. Cotter and G. W. Hart (1996).** "Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin." *Biochemistry* **35**(11): 3578-86.
- Roy, L. M., O. Haccard, T. Izumi, B. G. Lattes, A. L. Lewellyn and J. L. Maller (1996).** "Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus*." *Oncogene* **12**(10): 2203-11.
- Roy, L. M., B. Singh, J. Gautier, R. B. Arlinghaus, S. K. Nordeen and J. L. Maller (1990).** "The cyclin B2 component of MPF is a substrate for the c-mos(xe) proto-oncogene product." *Cell* **61**(5): 825-31.
- Roy, L. M., K. I. Swenson, D. H. Walker, B. G. Gabrielli, R. S. Li, H. Piwnica-Worms and J. L. Maller (1991).** "Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A." *J Cell Biol* **113**(3): 507-14.
- Saavedra, H. I., K. Fukasawa, C. W. Conn and P. J. Stambrook (1999).** "MAPK mediates RAS-induced chromosome instability." *J Biol Chem* **274**(53): 38083-90.
- Sadhu, K., S. I. Reed, H. Richardson and P. Russell (1990).** "Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 5139-43.
- Sadler, S. E. and J. L. Maller (1981).** "Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein." *J Biol Chem* **256**(12): 6368-73.
- Sadler, S. E. and J. L. Maller (1983).** "The development of competence for meiotic maturation during oogenesis in *Xenopus laevis*." *Dev Biol* **98**(1): 165-72.
- Sadler, S. E. and J. L. Maller (1987).** "In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1." *J Biol Chem* **262**(22): 10644-50.

Références

- Sadler, S. E. and J. L. Maller (1989).** "A similar pool of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes is stimulated by insulin, insulin-like growth factor 1, and [Val12,Thr59]Ha-ras protein." J Biol Chem **264**(2): 856-61.
- Sagata, N. (1995).** "The role of Mos in oocyte maturation : prevention of parthenogenetic activation." Cell Technology **14**: 51-59.
- Sagata, N., I. Daar, M. Oskarsson, S. D. Showalter and G. F. Vande Woude (1989).** "The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation." Science **245**(4918): 643-6.
- Sagata, N., M. Oskarsson, T. Copeland, J. Brumbaugh and G. F. Vande Woude (1988).** "Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." Nature **335**(6190): 519-25.
- Sarkissian, M., R. Mendez and J. D. Richter (2004).** "Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3." Genes Dev **18**(1): 48-61.
- Sato, S., N. Fujita and T. Tsuruo (2000).** "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10832-7.
- Schaber, M. D., M. B. O'Hara, V. M. Garsky, S. C. Mosser, J. D. Bergstrom, S. L. Moores, M. S. Marshall, P. A. Friedman, R. A. Dixon and J. B. Gibbs (1990).** "Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase." J Biol Chem **265**(25): 14701-4.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999).** "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-44.
- Schmitt, A. and A. R. Nebreda (2002).** "Inhibition of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4361-6.
- Schorderet-Slatkine, S. and K. C. Drury (1973).** "Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes." Cell Differ **2**(4): 247-54.
- Schorderet-Slatkine, S., M. Schorderet, P. Boquet, F. Godeau and E. E. Baulieu (1978).** "Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes: a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level." Cell **15**(4): 1269-75.
- Schuetz, A. W. (1967).** "Effect of steroids on germinal vesicle of oocytes of the frog (*Rana pipiens*) in vitro." Proc Soc Exp Biol Med **124**(4): 1307-10.

Références

- Schulte, T. W., W. G. An and L. M. Neckers (1997).** "Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome." Biochem Biophys Res Commun **239**(3): 655-9.
- Schwab, M., A. S. Lutum and W. Seufert (1997).** "Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis." Cell **90**(4): 683-93.
- Schwab, M. S., B. T. Roberts, S. D. Gross, B. J. Tunquist, F. E. Taieb, A. L. Lewellyn and J. L. Maller (2001).** "Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation." Curr Biol **11**(3): 141-50.
- Scolnick, E. M., A. G. Papageorge and T. Y. Shih (1979).** "Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5355-9.
- Sheets, M. D., M. Wu and M. Wickens (1995).** "Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation." Nature **374**(6522): 511-6.
- Sheng, J., A. Kumagai, W. G. Dunphy and A. Varshavsky (2002).** "Dissection of c-MOS degron." Embo J **21**(22): 6061-71.
- Sheng, Y., V. Montplaisir and X. John Liu (2004).** "Co-operation of G(salpha) and G(beta gamma) in maintaining G(2) arrest in *xenopus* oocytes." J Cell Physiol.
- Sheng, Y., M. Tiberi, R. A. Booth, C. Ma and X. J. Liu (2001).** "Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits." Curr Biol **11**(6): 405-16.
- Shibuya, E. K., J. Morris, U. R. Rapp and J. V. Ruderman (1996).** "Activation of the *Xenopus* oocyte mitogen-activated protein kinase pathway by Mos is independent of Raf." Cell Growth Differ **7**(2): 235-41.
- Shibuya, E. K. and J. V. Ruderman (1993).** "Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells." Mol Biol Cell **4**(8): 781-90.
- Shih, T. Y., A. G. Papageorge, P. E. Stokes, M. O. Weeks and E. M. Scolnick (1980).** "Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus." Nature **287**(5784): 686-91.
- Shoelson, S. E., S. Chatterjee, M. Chaudhuri and M. F. White (1992).** "YMXM motifs of IRS-1 define substrate specificity of the insulin receptor kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(6): 2027-31.
- Sigrist, S. J. and C. F. Lehner (1997).** "*Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles." Cell **90**(4): 671-81.

Références

- Singh, B. and R. B. Arlinghaus (1997).** "Mos and the cell cycle." Prog Cell Cycle Res **3**: 251-9.
- Skolnik, E. Y., A. Batzer, N. Li, C. H. Lee, E. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis and J. Schlessinger (1993a).** "The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways." Science **260**(5116): 1953-5.
- Skolnik, E. Y., C. H. Lee, A. Batzer, L. M. Vicentini, M. Zhou, R. Daly, M. J. Myers, Jr., J. M. Backer, A. Ullrich, M. F. White and et al. (1993b).** "The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling." Embo J **12**(5): 1929-36.
- Slawson, C., S. Shafii, J. Amburgey and R. Potter (2002).** "Characterization of the O-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation." Biochim Biophys Acta **1573**(2): 121-9.
- Smith, L. D. and R. E. Ecker (1969).** "Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*." Dev Biol **19**(3): 281-309.
- Smith, L. D. and R. E. Ecker (1971).** "The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation." Dev Biol **25**(2): 232-47.
- Smith, L. D., R. E. Ecker and S. Subtelny (1968).** "In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles." Dev Biol **17**(6): 627-43.
- Solomon, M. J. (1993).** "Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases." Curr Opin Cell Biol **5**(2): 180-6.
- Solomon, M. J. (1994).** "The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase." Trends Biochem Sci **19**(11): 496-500.
- Solomon, M. J., M. Glotzer, T. H. Lee, M. Philippe and M. W. Kirschner (1990).** "Cyclin activation of p34cdc2." Cell **63**(5): 1013-24.
- Solomon, M. J., J. W. Harper and J. Shuttleworth (1993).** "CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15." Embo J **12**(8): 3133-42.
- Solomon, M. J., T. Lee and M. W. Kirschner (1992).** "Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase." Mol Biol Cell **3**(1): 13-27.
- Speaker, M. G. and F. R. Butcher (1977).** "Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes." Nature **267**(5614): 848-50.

- Stancato, L. F., Y. H. Chow, K. A. Hutchison, G. H. Perdew, R. Jove and W. B. Pratt (1993).** "Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system." J Biol Chem **268**(29): 21711-6.
- Stebbins, C. E., A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl and N. P. Pavletich (1997).** "Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent." Cell **89**(2): 239-50.
- Stebbins-Boaz, B., Q. Cao, C. H. de Moor, R. Mendez and J. D. Richter (1999).** "Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E." Mol Cell **4**(6): 1017-27.
- Steuer, E. R., L. Wordeman, T. A. Schroer and M. P. Sheetz (1990).** "Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores." Nature **345**(6272): 266-8.
- Stevens, I., R. Derua, E. Rondelez, E. Waelkens, W. Merlevede and J. Goris (1999).** "Identification of cyk, a cyclin B2 kinase, as a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and its role during *Xenopus laevis* oocyte maturation." Exp Cell Res **252**(2): 303-18.
- Stith, B. J., M. L. Goalstone and A. J. Kirkwood (1992a).** "Protein kinase C initially inhibits the induction of meiotic cell division in *Xenopus* oocytes." Cell Signal **4**(4): 393-403.
- Stith, B. J., C. Jaynes, M. Goalstone and S. Silva (1992b).** "Insulin and progesterone increase ³²P04-labeling of phospholipids and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes." Cell Calcium **13**(5): 341-52.
- Stith, B. J. and J. L. Maller (1987).** "Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate." Exp Cell Res **169**(2): 514-23.
- Strausfeld, U., A. Fernandez, J. P. Capony, F. Girard, N. Lautredou, J. Derancourt, J. C. Labbe and N. J. Lamb (1994).** "Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis." J Biol Chem **269**(8): 5989-6000.
- Strausfeld, U., J. C. Labbe, D. Fesquet, J. C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, P. Russell and M. Doree (1991).** "Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein." Nature **351**(6323): 242-5.
- Stumpo, D. J. and P. J. Blackshear (1991).** "Cellular expression of mutant insulin receptors interferes with the rapid transcriptional response to both insulin and insulin-like growth factor I." J Biol Chem **266**(1): 455-60.

Références

- Sturgill, T. W., L. B. Ray, E. Erikson and J. L. Maller (1988).** "Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II." Nature **334**(6184): 715-8.
- Sun, H., A. J. King, H. B. Diaz and M. S. Marshall (2000).** "Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak." Curr Biol **10**(5): 281-4.
- Sun, X. J., D. L. Crimmins, M. G. Myers, Jr., M. Miralpeix and M. F. White (1993).** "Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1." Mol Cell Biol **13**(12): 7418-28.
- Sunkara, P. S., D. A. Wright and P. N. Rao (1979).** "Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(6): 2799-802.
- Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman (1986).** "The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." Cell **47**(6): 861-70.
- Taieb, F. E., S. D. Gross, A. L. Lewellyn and J. L. Maller (2001).** "Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes." Curr Biol **11**(7): 508-13.
- Taieb, R., C. Thibier and C. Jessus (1997).** "On cyclins, oocytes, and eggs." Mol Reprod Dev **48**(3): 397-411.
- Tanoue, T. and E. Nishida (2003).** "Molecular recognitions in the MAP kinase cascades." Cell Signal **15**(5): 455-62.
- Tanoue, T., T. Yamamoto, R. Maeda and E. Nishida (2001).** "A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs." J Biol Chem **276**(28): 26629-39.
- Taylor, S. S., E. Ha and F. McKeon (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): 1-11.
- Taylor, S. S. and F. McKeon (1997).** "Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage." Cell **89**(5): 727-35.
- Terret, M. E., I. Ferby, A. R. Nebreda and M. H. Verlhac (2001).** "RINGO efficiently triggers meiosis resumption in mouse oocytes and induces cell cycle arrest in embryos." Biol Cell **93**(1-2): 89-97.
- Theodosiou, A. and A. Ashworth (2002).** "MAP kinase phosphatases." Genome Biol **3**(7): REVIEWS3009.

- Thibier, C., V. De Smedt, R. Poulhe, D. Huchon, C. Jesus and R. Ozon (1997).** "In vivo regulation of cytostatic activity in *Xenopus* metaphase II-arrested oocytes." Dev Biol **185**(1): 55-66.
- Thom, G., N. Minshall, A. Git, J. Argasinska and N. Standart (2003).** "Role of cdc2 kinase phosphorylation and conserved N-terminal proteolysis motifs in cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB) complex dissociation and degradation." Biochem J **370**(Pt 1): 91-100.
- Tian, J., S. Kim, E. Heilig and J. V. Ruderman (2000).** "Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14358-63.
- Tonks, N. K., M. F. Cicirelli, C. D. Diltz, E. G. Krebs and E. H. Fischer (1990).** "Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in *Xenopus* oocytes." Mol Cell Biol **10**(2): 458-63.
- Tornqvist, H. E., M. W. Pierce, A. R. Frackelton, R. A. Nemenoff and J. Avruch (1987).** "Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro." J Biol Chem **262**(21): 10212-9.
- Tournebize, R., A. Popov, K. Kinoshita, A. J. Ashford, S. Rybina, A. Pozniakovsky, T. U. Mayer, C. E. Walczak, E. Karsenti and A. A. Hyman (2000).** "Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts." Nat Cell Biol **2**(1): 13-9.
- Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell and R. J. Davis (2000).** "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-4.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990).** "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-12.
- Van Beveren, C., J. A. Galleshaw, V. Jonas, A. J. Berns, R. F. Doolittle, D. J. Donoghue and I. M. Verma (1981).** "Nucleotide sequence and formation of the transforming gene of a mouse sarcoma virus." Nature **289**(5795): 258-62.
- van den Berg, S., B. Kaina, H. J. Rahmsdorf, H. Ponta and P. Herrlich (1991).** "Involvement of fos in spontaneous and ultraviolet light-induced genetic changes." Mol Carcinog **4**(6): 460-6.
- Vanhaesebroeck, B., K. Higashi, C. Raven, M. Welham, S. Anderson, P. Brennan, S. G. Ward and M. D. Waterfield (1999).** "Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo." Embo J **18**(5): 1292-302.

Références

- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999).** "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." Exp Cell Res **253**(1): 239-54.
- Varnold, R. L. and L. D. Smith (1990).** "Protein kinase C and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes." Development **109**(3): 597-604.
- Vasquez, R. J., D. L. Gard and L. Cassimeris (1994).** "XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover." J Cell Biol **127**(4): 985-93.
- Vasquez, R. J., D. L. Gard and L. Cassimeris (1999).** "Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro." Cell Motil Cytoskeleton **43**(4): 310-21.
- Vaur, S., R. Poulhe, G. Maton, Y. Andeol and C. Jessus (2004).** "Activation of Cdc2 kinase during meiotic maturation of axolotl oocyte." Dev Biol **267**(2): 265-78.
- Verde, F., M. Dogterom, E. Stelzer, E. Karsenti and S. Leibler (1992).** "Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts." J Cell Biol **118**(5): 1097-108.
- Verde, F., J. C. Labbe, M. Doree and E. Karsenti (1990).** "Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs." Nature **343**(6255): 233-8.
- Verlhac, M. H., J. Z. Kubiak, M. Weber, G. Geraud, W. H. Colledge, M. J. Evans and B. Maro (1996).** "Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse." Development **122**(3): 815-22.
- Verlhac, M. H., C. Lefebvre, P. Guillaud, P. Rassinier and B. Maro (2000a).** "Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos." Curr Biol **10**(20): 1303-6.
- Verlhac, M. H., C. Lefebvre, J. Z. Kubiak, M. Umbhauer, P. Rassinier, W. Colledge and B. Maro (2000b).** "Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways." Embo J **19**(22): 6065-74.
- Vilain, J. P. (1977).** "Maturation in vitro ds ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michach (Amphibien urodèle)." Mém. Soc. Zool. France Symp. L. Gallien. Progrès récents en Biologie du Développement des amphibiens: 93-102.
- Visintin, R., S. Prinz and A. Amon (1997).** "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis." Science **278**(5337): 460-3.
- Vojtek, A. B., S. M. Hollenberg and J. A. Cooper (1993).** "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." Cell **74**(1): 205-14.

Références

- Vorlauffer, E. and J. M. Peters (1998).** "Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis." Mol Biol Cell **9**(7): 1817-31.
- Vosseller, K., L. Wells, M. D. Lane and G. W. Hart (2002).** "Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5313-8.
- Walczak, C. E., I. Vernos, T. J. Mitchison, E. Karsenti and R. Heald (1998).** "A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity." Curr Biol **8**(16): 903-13.
- Walter, S. A., S. N. Guadagno and J. E. Ferrell, Jr. (2000).** "Activation of Wee1 by p42 MAPK in vitro and in cycling xenopus egg extracts." Mol Biol Cell **11**(3): 887-96.
- Wang, J. and X. J. Liu (2004).** "Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in Xenopus oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate." J Cell Sci **117**(Pt 21): 5107-16.
- Wang, X., C. H. McGowan, M. Zhao, L. He, J. S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang and J. Han (2000).** "Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest." Mol Cell Biol **20**(13): 4543-52.
- Wartmann, M. and R. J. Davis (1994).** "The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex." J Biol Chem **269**(9): 6695-701.
- Wasserman, W. J. (1992).** "The rapid transient decrease of sn-1,2-diacylglycerol in progesterone-stimulated Xenopus laevis oocytes is the result of an ethanol artifact." Dev Biol **154**(1): 223-5.
- Wasserman, W. J., A. B. Freedman and J. J. LaBella (1990).** "sn-1,2-diacylglycerol levels increase in progesterone-stimulated Xenopus laevis oocytes." J Exp Zool **255**(1): 63-71.
- Wasserman, W. J. and Y. Masui (1975).** "Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in Xenopus oocytes." Exp Cell Res **91**(2): 381-8.
- Wasserman, W. J. and L. D. Smith (1978).** "The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown." J Cell Biol **78**(1): R15-22.
- Watanabe, N., M. Broome and T. Hunter (1995).** "Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle." Embo J **14**(9): 1878-91.

Références

- Watanabe, N., T. Hunt, Y. Ikawa and N. Sagata (1991).** "Independent inactivation of MPF and cytotostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs." Nature **352**(6332): 247-8.
- Watanabe, N., G. F. Vande Woude, Y. Ikawa and N. Sagata (1989).** "Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs." Nature **342**(6249): 505-11.
- Wells, L., K. Vosseller and G. W. Hart (2001).** "Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc." Science **291**(5512): 2376-8.
- Wells, L., S. A. Whalen and G. W. Hart (2003).** "O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 435-41.
- Wells, W. A. and A. W. Murray (1996).** "Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast." J Cell Biol **133**(1): 75-84.
- White, M. F., S. E. Shoelson, H. Keutmann and C. R. Kahn (1988).** "A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor." J Biol Chem **263**(6): 2969-80.
- Whitmire, E., B. Khan and M. Coue (2002).** "Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes." Nature **419**(6908): 722-5.
- Wilde, A. and Y. Zheng (1999).** "Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran." Science **284**(5418): 1359-62.
- Willumsen, B. M., A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge and D. R. Lowy (1984).** "The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association." Nature **310**(5978): 583-6.
- Winey, M. (1999).** "Cell cycle: driving the centrosome cycle." Curr Biol **9**(12): R449-52.
- Xu, W., K. J. Ladner and L. D. Smith (1992).** "Evidence that Mos protein may not act directly on cyclin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4573-7.
- Yamamoto-Honda, R., Z. Honda, K. Ueki, K. Tobe, Y. Kaburagi, Y. Takahashi, H. Tamemoto, T. Suzuki, K. Itoh, Y. Akanuma, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1996).** "Mutant of insulin receptor substrate-1 incapable of activating phosphatidylinositol 3-kinase did not mediate insulin-stimulated maturation of *Xenopus laevis* oocytes." J Biol Chem **271**(45): 28677-81.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic and R. A. Flavell (1997).** "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene." Nature **389**(6653): 865-70.

Références

- Yang, J., E. S. Bardes, J. D. Moore, J. Brennan, M. A. Powers and S. Kornbluth (1998a).** "Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1." *Genes Dev* **12**(14): 2131-43.
- Yang, J., K. Winkler, M. Yoshida and S. Kornbluth (1999).** "Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import." *Embo J* **18**(8): 2174-83.
- Yang, Y., C. H. Herrmann, R. B. Arlinghaus and B. Singh (1996).** "Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A." *Mol Cell Biol* **16**(3): 800-9.
- Yang, Y., C. D. Pham, V. B. Vuyyuru, H. Liu, R. B. Arlinghaus and B. Singh (1998b).** "Evidence of a functional interaction between serine 3 and serine 25 Mos phosphorylation sites. A dominant inhibitory role of serine 25 phosphorylation on Mos protein kinase." *J Biol Chem* **273**(26): 15946-53.
- Yao, B., Y. Zhang, S. Delikat, S. Mathias, S. Basu and R. Kolesnick (1995).** "Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase." *Nature* **378**(6554): 307-10.
- Yenush, L. and M. F. White (1997).** "The IRS-signalling system during insulin and cytokine action." *Bioessays* **19**(6): 491-500.
- Yew, N., M. L. Mellini and G. F. Vande Woude (1992).** "Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*." *Nature* **355**(6361): 649-52.
- Yoshida, N., K. Mita and M. Yamashita (2000).** "Function of the Mos/MAPK pathway during oocyte maturation in the Japanese brown frog *Rana japonica*." *Mol Reprod Dev* **57**(1): 88-98.
- Yoshitome, S., N. Furuno and N. Sagata (1998).** "Overexpression of the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2, but not of cyclin B1, inhibits bipolar spindle formation in *Xenopus* oocytes." *Biol Cell* **90**(6-7): 509-18.
- Yujiri, T., S. Sather, G. R. Fanger and G. L. Johnson (1998).** "Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption." *Science* **282**(5395): 1911-4.
- Zachariae, W. and K. Nasmyth (1999).** "Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex." *Genes Dev* **13**(16): 2039-58.
- Zachariae, W., M. Schwab, K. Nasmyth and W. Seufert (1998).** "Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex." *Science* **282**(5394): 1721-4.
- Zeng, C. (2000).** "NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function." *Microsc Res Tech* **49**(5): 467-77.

Références

- Zhang, B. H. and K. L. Guan (2000).** "Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601." Embo J **19**(20): 5429-39.
- Zhao, X., B. Batten, B. Singh and R. B. Arlinghaus (1990).** "Requirement of the c-mos protein kinase for murine meiotic maturation." Oncogene **5**(11): 1727-30.
- Zhao, X., B. Singh and B. E. Batten (1991).** "The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation." Oncogene **6**(1): 43-9.
- Zhu, L., N. Ohan, Y. Agazie, C. Cummings, S. Farah and X. J. Liu (1998).** "Molecular cloning and characterization of Xenopus insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced Xenopus oocyte maturation and expression during embryogenesis." Endocrinology **139**(3): 949-54.
- Zhu, W., B. Leber and D. W. Andrews (2001).** "Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis." Embo J **20**(21): 5999-6007.
- Zhu, Y., J. Bond and P. Thomas (2003a).** "Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2237-42.
- Zhu, Y., C. D. Rice, Y. Pang, M. Pace and P. Thomas (2003b).** "Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2231-6.
- Zimmermann, S. and K. Moelling (1999).** "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." Science **286**(5445): 1741-4.