

N° d'ordre (Lille 1) : 3910

Numéro national

U.F.R. de Biologie
Université des Sciences et Technologies de Lille 1
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé Lille1-Lille2

Thèse de Doctorat
En vue de l'obtention du grade de :
Docteur de l'Université de Lille I
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Mademoiselle Chantal SELLIER

le 18 décembre 2006

**Rôle de l'homéostasie protonique lors de la
transition G2/M de l'ovocyte de Xénope.**

Membres du jury :

Dr Jean-Claude MICHALSKI	Président
Pr Stéphane FLAMENT	Rapporteur
Dr Jean-Luc RODEAU	Rapporteur
Dr Colette DISSOUS	Examineur
Dr Jean-François BODART	Examineur
Pr Jean-Pierre VILAIN	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr **Stéphane Flament** et le Dr **Jean-Luc Rodeau** qui m'ont fait l'honneur d'accepter la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail ainsi que le Docteur **Colette Dissous** d'avoir accepté d'en être examinateur.

Je tiens à remercier le Docteur **Jean-Claude Michalski** d'avoir accepté la présidence de cette thèse.

Je remercie le Pr **Jean-Pierre Vilain** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir fait bénéficier de votre rigueur scientifique et de vos vastes connaissances dans le domaine de l'électrophysiologie.

Je remercie tout particulièrement le Dr **Jean-François Bodart** qui a co-encadré ce travail. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces quatre ans. Merci pour vos encouragements, votre aide et vos conseils même si parfois ça n'a pas toujours été facile !!!! Merci d'avoir supporté (surtout depuis que nous partageons le même bureau !) tous mes moments d'euphorie, de doute et de découragement.

Merci au Dr **Anne-Frédérique Paul** qui m'a initiée à l'électrophysiologie. Merci pour les discussions scientifiques et le temps que tu m'as accordé durant ces quatre années. Merci également pour ton aide dans la rédaction et dans la correction de ce manuscrit.

Un grand merci à **Arlette Lescuyer** pour sa gentillesse et son aide en toutes circonstances. Merci de m'avoir toujours encouragée et soutenue pendant ces quatre ans et d'avoir toujours été là dans les moments les plus durs. Ton aide dans ce travail a été bien plus que technique, merci pour tout.

Un grand merci à notre fournisseur officiel de tartes (surtout la tarte au citron !), le Dr **Claude Cocquerelle**. Merci pour nos discussions scientifiques et amicales. Merci pour ton encouragement dans l'écriture de ma « page quotidienne », et ta bonne humeur. Merci aussi pour tous les dépannages informatiques, je suis sûre que mon câble internet au milieu du passage va te manquer !!!.

Merci au Dr **Matthieu Marin**, notre spécialiste café, qui a rejoint récemment le groupe. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Merci pour ton café (qui m'a permis de rester éveillée ces derniers temps !) et pour les « vendredis kebab » (même s'ils sont un « p'tit peu ch'ti », ils sont bons !). Un grand merci pour ton aide si précieuse durant la rédaction de ce manuscrit et dans la recherche d'un post-doc.

Merci à **Vanessa Dehennaut** pour sa bonne humeur et sa spontanéité. Merci d'avoir rendu les « séances de défolliculation » moins monotones ! Merci pour tous ces bons moments que nous avons pu partager, tous les fous rires, les discussions sur les recettes de cuisine et ta formidable danse des abeilles... Bon courage pour la fin de ta thèse.

Merci à **Rémy Beaujois**, tu viens tout juste de rejoindre l'équipe mais merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Promis, je vais partir à la recherche du « fermier idéal » dès 2007. Je te souhaite bon courage et bonne chance pour ton master recherche.

Sans oublier **Frédéric Baert**. Merci pour ton aide durant mon DEA et le début de ma thèse. Merci pour la gentillesse dont tu as fait preuve à mon égard et ta disponibilité à chaque fois que j'avais des problèmes techniques.

Merci au Dr **Katia Maggio**, au Dr **Edith Broweys** et au Dr **Marc Bertoux** pour leur sympathie et leur bonne humeur durant ces quatre ans.

Merci à tous les enseignants qui m'ont aidée et conseillée lorsque j'ai été vacataire et ATER, tout particulièrement le Dr **Jean-Pierre Maufroid**, le Dr **Bernard Legrand**, le Pr **Xavier Desbiens** et le Dr **Albin Pourtier**.

Merci également à **Chantal Bétrancourt** et **Valérie Burlion** pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci au Dr **Nick Duesbery** pour les discussions scientifiques et pour le temps qu'il m'a accordé à chaque fois que je lui ai demandé un service. J'ai été très touchée par l'accueil que vous m'avez réservé lors de mon séjour aux Etats-Unis et par votre gentillesse. Encore merci pour votre disponibilité et tout ce que j'ai pu apprendre lors de mon stage dans votre laboratoire.

Je remercie Monsieur **François Gueuze** pour son aide précieuse dans la rédaction du nouveau chapitre de la thèse. Merci pour votre accueil chaleureux à chacun de mes entretiens et merci de m'avoir fait prendre conscience de toutes les compétences que j'ai pu acquérir durant ma thèse.

Hélène, merci pour tout, merci pour tous les bons moments que nous avons pu partager ensemble, pour les pauses café, les fous rires mais aussi pour toutes les discussions « sérieuses » que nous avons eu. Ta présence (à l'étage du dessous !) a rendu ces quatre ans au labo plus agréables. Merci d'avoir toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments, merci de me comprendre même si parfois ce n'est pas toujours facile et de m'accepter comme je suis... Bref, tu es quelqu'un que j'estime profondément ! Bon courage pour la fin de ta thèse,

Gabi que de chemin depuis ce « fameux pot de confiture » un samedi matin dans les couloirs de Galois ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton naturel et ta sincérité ! Merci d'avoir toujours les bons mots quand il faut. Merci pour les soirées tartiflettes, les kébabs, les Léonidas et les « litres » de Coca... Tu es quelqu'un de rare que j'ai la chance de compter parmi mes amis et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Paola, la meilleur rencontre de l'année 2006 (merci Ugo et Alicia !) Merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse, pour les (longues !) discussions sur les chevaux et sur bien d'autres choses. Saches que tu comptes beaucoup moi, même si ces derniers temps je n'étais pas souvent dispo... c'est vraiment agréable d'être avec toi et Quentin. J'attends avec hâte le jour où nous pourrions partir faire de longues ballades avec notre cheval !

Magali, merci ton amitié, ta spontanéité et ton naturel. Merci pour tous les bons moments que j'ai pu passer avec toi, les soirées au Flâmes, le « relooking ». Je sais, il y a encore du boulot mais on est sur la bonne voie !!!! Merci aussi pour toutes les soirées que nous avons passé sur les tribunes des 3D !

Nicolas et Ninie, ça ne fait pas longtemps que nous nous connaissons mais je dirais tout simplement merci pour tous les bons moments que nous avons pu partager ensemble. Merci Ninie pour toutes les heures passées sur les terrains de tennis (je t'assure que tu joues bien !) et merci à vous deux pour votre gentillesse.

Merci également à **Vanessa**, grâce à toi j'ai des souvenirs inoubliables de mes premières années de FAC. Malheureusement, nous sommes aujourd'hui séparées par la distance mais merci de « cliquer du mulot » pour me donner de tes nouvelles !

Maman et papa, merci pour tout. Merci d'être là dès que j'ai besoin de vous. C'est un peu grâce à vous si aujourd'hui je peux soutenir ma thèse. **Nathalie, Christophe, Oana et Vincent**, merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour les dépannages en tout genre, surtout en informatique. **Chloé et Auxanne**, qu'elles me pardonnent de les avoir souvent délaissées au profit de mon travail!

Sans oublier une gratouille à **Appy, Grognette, Biscotte et Ugo** !!!!



Enfin, merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail et qui ont manifesté leurs encouragements pendant ces quelques années. J'espère que je n'ai oublié personne ! C'est ainsi que se terminent ces quatre ans parmi vous, merci pour tout.



Le savoir est important, mais c'est surtout l'usage qu'on en fait qui compte. Et cet usage dépend du cœur et de l'esprit de chacun.

Dalai-Lama

A mes parents,

Et à toutes les personnes qui ont
toujours été présentes depuis le début...

TABLE DES MATIERES

Sommaire

SOMMAIRE.....	9
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	18
RESUME.....	20
INTRODUCTION.....	23
 PARTIE I : GENERALITES.....	 24
 Chapitre I : Le pHi : définition, régulation et rôle dans la cellule.....	 25
I.1- Définition de la notion de pH.....	25
I.2- Mécanismes régulateurs du pHi.....	26
I.2.1- Les mécanismes tampons.....	26
I.2.2- Les mécanismes de transport des protons.....	26
I.2.2.1- Les échangeurs protons/cations.....	26
I.2.2.2- Les transporteurs dépendant de HCO_3^-	28
I.2.2.3- Les pompes à protons.....	29
I.3- pHi et prolifération cellulaire.....	29
 Chapitre II : Le cycle cellulaire.....	 31
II.1- Les différentes phases du cycle cellulaire.....	31
II.2- Cas particulier : la reprise méiotique des ovocytes de Xénope.....	32
 PARTIE II : L'OVOCYTE IMMATURE DE XENOPE.....	 33
 Chapitre I : L'ovogenèse.....	 34
I.1- Accumulation des réserves vitellines et des mitochondries.....	34
I.2- Condensation des chromosomes et synthèse d'ARN	35
I.3- Formation de l'enveloppe vitelline.....	36
I.4- Migration des granules corticaux et pigmentation de l'ovocyte.....	36
 Chapitre II : Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI.....	 37

PARTIE III : LA REPRISE MEIOTIQUE DE L'OVOCYTE DE XENOPE.....	38
Chapitre I- Stimulation de la reprise méiotique.....	39
I.1 - Les hormones stéroïdes.....	39
I.1.1- La progestérone.....	39
I.1.2- Les autres hormones stéroïdes.....	40
I.2- Les facteurs de croissance.....	41
I.2.1- L'insuline et l'IGF1.....	41
I.2.2- Les autres facteurs de croissance.....	42
Chapitre II - Evénements cytologiques de la reprise méiotique.....	43
II.1 - GVBD et formation du fuseau.....	43
II.2 - Organisation du fuseau.....	44
Chapitre III- Evénements précoces de la reprise méiotique.....	46
III.1 - Stimulation par la progestérone.....	46
III.1.1- Diminution de l'AMPC et inhibition de la PKA.....	46
III.1.2- Hydrolyse des lipides membranaires.....	48
III.1.2.1- La phospholipase C.....	48
III.1.2.2- La PKC.....	49
III.1.2.3- La PI3 kinase.....	49
III.2- Stimulation par l'insuline.....	50
III.2.1 Rappel des voies de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les cellules somatiques.....	50
III.2.2- La voie de signalisation à l'insuline/IGF1 dans l'ovocyte de Xénope.....	51
CHAPITRE IV- Transcription et synthèse protéique au cours de la reprise méiotique.....	53
IV.1- La synthèse protéique.....	53
IV.2- La polyadénylation cytoplasmique des ARNm.....	54
CHAPITRE V- Le MPF et les complexes Cdk/ Cyc.....	56
V.1- Mise en évidence.....	56
V.2- Purification et identification.....	56
V.2.1- Cdk1.....	56
V.2.2- La cycline B.....	57
V.3- Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique.....	58
V.4- Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique.....	58

Sommaire

V.4.1- La CAK	58
V.4.2- Myt 1 et Wee 1.....	59
V.4.3- Cdc25.....	60
V.4.4- Synthèse et dégradation de la cycline B.....	61
V.4.5- Protéines associées à Cdk.....	63
V.4.5.1- Xe-p9.....	63
V.4.5.2- Ringo/Speedy	64
V.5- La boucle d'auto-amplification du MPF.....	64
V.6- Cibles du MPF.....	66
V.6.1- La CPEB.....	66
V.6.2- Le facteur d'élongation EF1.....	67
V.6. 3- Les lamines.....	67
V.6.4- Les histones.....	67
V.6.5- Les MAPs.....	67
Chapitre VI- Les voies MAPK.....	69
VI.1- Généralités.....	69
VI.2- Les modules identifiés dans l'ovocyte.....	70
VI.2.1- Les différentes MAPKKK.....	70
VI.2.1.1- p39 ^{Mos}	70
VI.2.1.2- Raf.....	73
VI.2.2- Les voies MAPK.....	74
VI.2.2.1- La voie Mek1-Xp42 ^{Mpk1}	74
VI.2.2.2- La voie JNK.....	75
VI.2.2.3- La voie MKK6/p38 ^{MAPK}	75
VI.2.3- Le module MAPKAP kinase	75
VI.2.4- Les MK phosphatases	75
VI.3- Rôle des voies MAPK dans la reprise méiotique.....	76
VI.3.1- Rôles des MAPK dans la GVBD.....	76
VI.3.2- Mécanismes d'activation du MPF par les voies MAPK.....	78
VI.3.3- Suppression de la phase S.....	78
VI.3.4- Activité CSF : stabilisation des cyclines.....	79
VI.3.5- Régulation du point d'assemblage du fuseau et relations avec les microtubules.....	80
CHAPITRE VII : Evénements ioniques de la reprise méiotique.....	82
VII.1- Caractéristiques électrophysiologiques de l'ovocyte immature.....	82
VII.2- Modifications ioniques membranaires associées à la reprise méiotique. 82	
VII.3- Variations de calcium associées à la reprise méiotique.....	83
VII.3.1- Outils pour mesurer les variations de calcium dans l'ovocyte.....	84
VII.3.1.1- Le ⁴⁵ Ca.....	84

Sommaire

VII.3.1.2- Les photoprotéines liant le calcium.....	84
VII.3.1.3- Les sondes fluorescentes.....	84
VII.3.1.4- Les courants chlores dépendant du calcium.....	85
VII.3.2- Mécanismes impliqués dans la régulation de la concentration calcique intracellulaire.....	85
VII.3.3- Modification de la signalisation calcique durant la reprise méiotique de l'ovocyte	86
VII.3.4- Cibles du calcium intracellulaire lors de la reprise méiotique.....	88
VII.4- Variations de pH intracellulaire associées à la reprise méiotique.....	89
VII.4.1- Outils pour mesurer les variations de pHi dans l'ovocyte.....	89
VII.4.1.1- Le DMO.....	89
VII.4.1.2- Les sondes fluorescentes.....	90
VII.4.1.3- Les microélectrodes.....	91
VII.4.2- Variations du pH intracellulaire au cours de la reprise méiotique.....	91
VII.4.3- Mécanismes impliqués dans l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique.....	92
VII.4.4- Rôle de l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique.....	93
OBJECTIFS GENERAUX.....	95
RESULTATS.....	98
Partie I : Modulation de la reprise méiotique par des variations artificielles de pHi.....	99
I.1- Contexte des recherches.....	100
I.2- Résultats	102
Publication 1 : Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in <i>Xenopus</i> oocytes.....	108
Publication 2 : Differential roles of p39(Mos)-Xp42(Mpk1) cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in <i>Xenopus</i> oocytes.....	123
Partie II : Influence du pHi sur la mobilisation du calcium dans l'ovocyte immature et mature de Xénope.....	135
II.1- Contexte des recherches.....	136
II.2- Résultats.....	138
Publication 3 en préparation : pH-dependent calcium increase in immature <i>Xenopus</i> oocytes and during maturation.....	142

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	178
Partie I : Variations de pHi et modulation de la reprise méiotique.....	179
I.1- Effets des variations de pHi sur la migration de la vésicule germinative et la GVBD...	179
I.2- Effets des variations de pHi sur les activations du MPF et de la voie p39 ^{Mos} -Xp42 ^{Mpk1}	180
I.3- Effets des variations de pHi sur la synthèse et la dégradation des protéines.....	183
Partie II : Liens entre les voies de signalisation protonique et calcique.....	186
II.1- Effets du NH ₄ Cl sur les courants ICl ₋₈₀ , ICl et Iin.....	186
II.2- Origine du calcium impliqué dans l'augmentation de la concentration calcique induite par le NH ₄ Cl.....	188
II.3- Effets des variations de pHe sur les courants ICl ₋₈₀ , ICl et Iin.....	189
II.4- Modifications de l'homéostasie calcique et de la perméabilité au NH ₄ Cl pendant la reprise méiotique.....	190
Partie III : pHi, calcium et transition G2/M.....	192
Conclusion générale.....	195
ANNEXES	197
Annexe I	198
L'inhibition de la O-N-Acétglucosaminyltransférase empêche la transition G2/M dans les ovocytes de Xénope.....	199
Publication 4 en préparation : O-linked N- Acétglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in <i>Xenopus laevis</i> oocytes.....	201
Annexe II	232
Valorisation des compétences - Le nouveau chapitre de la thèse.....	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	241

Liste des figures

Figure 1 : Principaux mécanismes impliqués dans la régulation du pHi.....	26
Figure 2 : Structure de l'échangeur sodium/proton de type 1.....	27
Figure 3 : Processus cellulaires affectés par une augmentation du pHi.....	29
Figure 4 : Phases et événements majeurs du cycle cellulaire.....	31
Figure 5 : Principales étapes permettant le passage de l'ovogonie au zygote chez le Xénope.....	32
Figure 6 : Les différents stades de l'ovogenèse chez le Xénope.....	34
Figure 7 : Répartition des réserves dans un ovocyte immature de Xénope de stade VI en coupe méridienne.....	37
Figure 8 : Photographie d'ovocyte immature de Xénope de stade VI en coupe méridienne.....	37
Figure 9 : Contrôle hormonal de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	41
Figure 10 : Photographies d'ovocytes immatures et d'ovocytes matures de Xénope.....	43
Figure 11 : Événements cytologiques associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	44
Figure 12 : Organisation des microtubules et du fuseau de division durant la méiose de l'ovocyte de Xénope.....	45
Figure 13 : Formation et orientation des microtubules constituant le fuseau.....	46
Figure 14 : Activation de l'adénylate cyclase.....	47
Figure 15 : Mécanisme d'activation de la PKA par l'AMPc.....	48
Figure 16 : Activité de la PKA et variation de l'AMPc après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone.....	48
Figure 17 : Formation et rôle de l'IP3 et du DAG dans la cellule.....	49
Figure 18 : Les différents types de PKC.....	49
Figure 19 : Activation de la voie PI3 kinase après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone.....	50
Figure 20 : Principales voies de transduction activées par l'insuline.....	51

Liste des figures

Figure 21 : Polyadénylation des ARNm et synthèse protéique durant la reprise méiotique.....	54
Figure 22 : Mécanisme de contrôle traductionnel des ARNm.....	55
Figure 23 : Mise en évidence du MPF.....	56
Figure 24 : Structure des cyclines B.....	57
Figure 25 : Différents complexes Cdk/Cyc impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.....	57
Figure 26 : Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	58
Figure 27 : Mécanismes d'activation du MPF après stimulation par la progestérone.....	59
Figure 28 : Régulation de la traduction de l'ARN de Ringo/Speedy par Pum 2.....	64
Figure 29 : Processus d'auto-amplification du MPF.....	65
Figure 30 : Différentes voies MAPK dans la cellule.....	69
Figure 31 : Expression, modification et fonction de la protéine p39 ^{Mos} durant la reprise méiotique.....	70
Figure 32 : Régulation de la polyadénylation <i>via</i> la dégradation de la CPEB.....	71
Figure 33 : Contrôle traductionnel de l'accumulation séquentielle de la protéine p39 ^{Mos}	72
Figure 34 : Activation de la voie p39 ^{Mos} -Xp42 ^{Mpk1} après stimulation de la maturation par l'insuline ou par la progestérone.....	74
Figure 35 : Stimulation du MPF par les différents membres de la voie MAPK.....	78
Figure 36 : Principaux mécanismes impliqués dans le maintien de la concentration calcique intracellulaire de l'ovocyte de Xénope.....	85
Figure 37 : Différents modes de couplage entre la vidange des stocks calciques intracellulaires et l'activation des SOC.....	86
Figure 38 : Modifications de la signalisation calcique durant la reprise méiotique.....	87
Figure 39 : Variation du pH _i durant la maturation de l'ovocyte de Xénope.....	91
Figure 40 : Variation du pH _i et de la synthèse protéique au cours de la reprise méiotique.....	94

Liste des figures

Figure 41 : Effets du NH_4Cl 10 mM sur les événements cytologiques de la reprise méiotique stimulée par la progestérone.....	102
Figure 42 : Effets de l'inhibition de la voie $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ sur la GVBD induite par l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures.....	104
Figure 43 : Effets de la cycloheximide, de l'U0126 et de la micro-injection d'oligonucléotides antisens contre p39^{Mos} sur les activations de la voie $\text{p39}^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ et du MPF induites par l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures.....	105
Figure 44 : Accumulation de Aurora A/Eg2 au cours de la reprise méiotique induite par la progestérone.....	106
Figure 45 : Effets de l'inhibition de la synthèse protéique et du NH_4Cl sur GVBD stimulée par injection de cytoplasme d'ovocytes matures.....	106
Figure 46 : Effets de l'acidification intracellulaire sur la dégradation de la CPEB induite par injection de cytoplasme d'ovocytes matures.....	107
Figure 47 : Mesures de ICI et Iin dans les ovocytes de Xénope.....	138
Figure 48 : Sensibilités des voies de signalisation face aux variations de pHi durant la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	180

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents stades des ovocytes de Xénope.....	34
Tableau 2 : Effets de différents inhibiteurs de la voie MAPK sur la reprise méiotique des ovocytes de Xénope.....	77
Tableau 3 : Activité intracellulaire des principaux ions dans l'ovocyte de Xénope.....	82
Tableau 4 : Valeur du potentiel d'équilibre pour les principaux ions dans l'ovocyte de Xénope.....	82
Tableau 5 : Potentiel de membrane mesuré dans les ovocytes défolliculés.....	83
Tableau 6 : Variations de la concentration calcique intracellulaire lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	88
Tableau 7 : Effet des variations artificielles de calcium sur la reprise méiotique.....	88
Tableau 8 : Valeurs du pHi dans l'ovocyte de Xénope immature et mesure des variations du pHi lors de la reprise méiotique.....	93
Tableau 9 : Analyses cytologiques des ovocytes stimulés par la progestérone et traités par le NH ₄ Cl.....	102
Table 10 : Effets de l'inhibition de la synthèse protéique et du NH ₄ Cl sur la GVBD ₅₀ induite par injection de cytoplasme d'ovocytes matures.....	106
Tableau 11 : Intensité du courant I ₋₈₀ induit par le NH ₄ Cl 10 mM.....	137
Tableau 12 : Effets des variations de pHi sur les différents mécanismes associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	181

Liste des abréviations

AC :	Adénylate Cyclase
AE :	Anion Exchanger
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
APC :	Anaphase Promoting Complex
BAPTA :	1,2-Bis-(2-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
BCECF :	2',7'-Bis(2-CarboxyEthyl)-5(6)-CarboxyFluoresceine
CAK :	Cdk-Activating Kinase
CaMKII :	Calcium dependent calmoduline Kinase II
Cdc :	Cell Division Cycle
Cdk :	Cyclin Dependent Kinase
Chk1 :	Checkpoint Kinase 1
CPE :	Cytoplasmic Polyadenylation Element
CPEB :	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CPSF :	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CSF :	CytoStatic Factor
DIDS :	4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonate
DMO :	dimethyloxazolidine dione
DMSO :	Diméthyl Sulfoxide
DUSP :	Dual-Specificity Phosphatase
DSP :	Dual-Specificity Phosphatase
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGTA :	Ethylène-Glycol-2-(aminoéthyl)-Tétracétique Acide)
EIF-4A, 4E ou 4G :	Eucaryotic Initiation Factor 4A, 4E ou 4G
Erk :	Extracellular Regulated protein Kinase
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FGFR :	FGF Receptor
Grb2 :	Growth factor Receptor Bound protein 2
GSK3 :	Glycogène Synthase Kinase 3
GSS :	Gonad-Stimulating Substance
GTP :	Guanosine Triphosphate
GVBD :	Germinal Vesicle Break-Down
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IGF1R :	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IP3 :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK :	Jun N-terminal protein Kinase
LF :	Lethal Factor
LH :	Luteinizing Hormon
MAP :	Microtubule Associated Protein
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAPK :	MAPK Activated Protein Kinase
MAPKK:	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK :	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK :	MAPK / Erk protein Kinase
MEKK :	MEK Kinase
MIH :	Maturation-Inducing Hormone
MKP :	MAPK Phosphatase
MOPS :	Acide N-morpholino-3-propane sulfonique

Liste des abréviations

MPF :	M phase / Maturation Promoting Factor
MRE :	Mos Response Element
MTOC :	Microtubule Organizing Center
NGF:	Nerve Growth Factor
NHE :	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger
O-GlcNAc :	O-N-Acétyleglucosaminylation
O-GlcNAcase :	O-N-Acétyleglucosaminidase
OGT :	O-N-Acétyleglucosaminyl transférase
PAP :	Poly(A)Polymérase
PDE :	Phosphodiesterase
PDK1 :	3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
PI3-Kinase :	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP3 :	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIP2 :	Phosphatidylinositol bisphosphate
pHe :	pH extracellulaire
pHi :	pH intracellulaire
PKA, B ou C :	Protéine Kinase A, B ou C
PL A, B, C ou D :	Phospholipase A, B, C ou D
Plkk :	Polo-Like Kinase Kinase
Plx kinase :	Polo-like kinase de Xénope
PMCA :	Plasma Membrane Ca ²⁺ -ATPase
PP1:	Protein Phosphatase 1
PRE :	Polyadenylation Response Element
PP2A :	Protein Phosphatase 2A
Ringo :	Rapid Inducer of G ₂ /M progression
Rsk :	Ribosomal S6 subunit protein Kinase
RTK :	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SAPK :	Stress-Activated Protein Kinase
SERCA :	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SITS :	4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid
SH 2 :	Src Homology domain 2
SOC	Store-Operated Ca ²⁺ Channel
SOCE :	Store Operated Calcium Entry
SOS :	Son Of Sevenless
TMA :	Transient Microtubule Array
TPA :	12-O-Tétradécanylophorbol-13-Acetate
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UTR :	Untranslated Region
VG :	Vésicule Germinative
WS :	White Spot
xAR :	<i>Xenopus</i> Androsterone Receptor
XIRS1 :	<i>Xenopus</i> Insulin Response Element
xPR :	<i>Xenopus</i> Progesterone Receptor

RESUME

Résumé

La reprise méiotique des ovocytes de Xénope peut être stimulée par la progestérone ou par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures. La stimulation hormonale déclenche les activations simultanées du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$. Par contre, la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures entraîne la seule activation de la boucle d'auto-amplification du MPF puis l'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, ce qui permet d'étudier séparément ces deux voies. Nous montrons, par l'utilisation d'inhibiteur de Mek ou d'antisens dirigés contre $p39^{\text{Mos}}$, que la cinétique de la GVBD induite par micro-injection de cytoplasme dépend de l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$.

Les effets de variations physiologiques de pH ont été étudiés dans différentes conditions de stimulation de la reprise méiotique : progestérone, micro-injection de cytoplasme ou de MAPK constitutivement active. Différentes stratégies ont été utilisées pour modifier le pHi (NH_4Cl , micro-injection de tampon à différents pH, modification du pHe). Nos résultats mettent en évidence que les événements précoces de l'activation du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ sont accélérés par l'alcalinisation intracellulaire et retardés par l'acidification intracellulaire alors que les mécanismes d'auto-amplification du MPF ne sont pas sensibles aux variations de pHi. Cependant, l'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ par le MPF est retardée par l'acidification. De même, l'acidification retarde, voire inhibe, l'entrée en phase M induite par micro-injection de MAPK constitutivement active.

Nous montrons également que le NH_4Cl provoque une augmentation de calcium qui participe au retard de la GVBD induit par l'acidification.

Summary

Meiosis resumption in *Xenopus* oocyte can be stimulated by progesterone or by egg cytoplasm micro-injection. Hormonal stimulation triggers simultaneous activations of MPF and p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathways. In contrast, egg cytoplasm micro-injection results only in MPF auto-amplification loop and following p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway activations. These two conditions allowed us to study separately these three pathways. We showed, by using Mek inhibitor or antisens against p39^{Mos}, that egg cytoplasm-induced GVBD kinetic is dependent upon p39^{Mos} accumulation.

Effects of physiological pHi variations were studied in different conditions of meiotic resumption stimulation: progesterone, egg cytoplasm micro-injection and constitutively active MAPK micro-injection. Changes of pHi were induced by NH₄Cl, micro-injection of buffer at different pH, pHe changes. Our results highlight that the early events of maturation (MPF and p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} activations) are accelerated by intracellular alcalinisation and are delayed by intracellular acidification. Even though MPF auto-amplification is pH-independent, the MPF induced-p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} activation is pH-dependent. Thus acidification induced a delay, even prevented, constitutively active MAPK-induced M phase entry.

Finally, we showed that NH₄Cl induces calcium increase that contributes to pH-dependent GVBD delay.

INTRODUCTION

PARTIE I : GENERALITES

Chapitre I : Le pH : définition, régulation et rôle dans la cellule

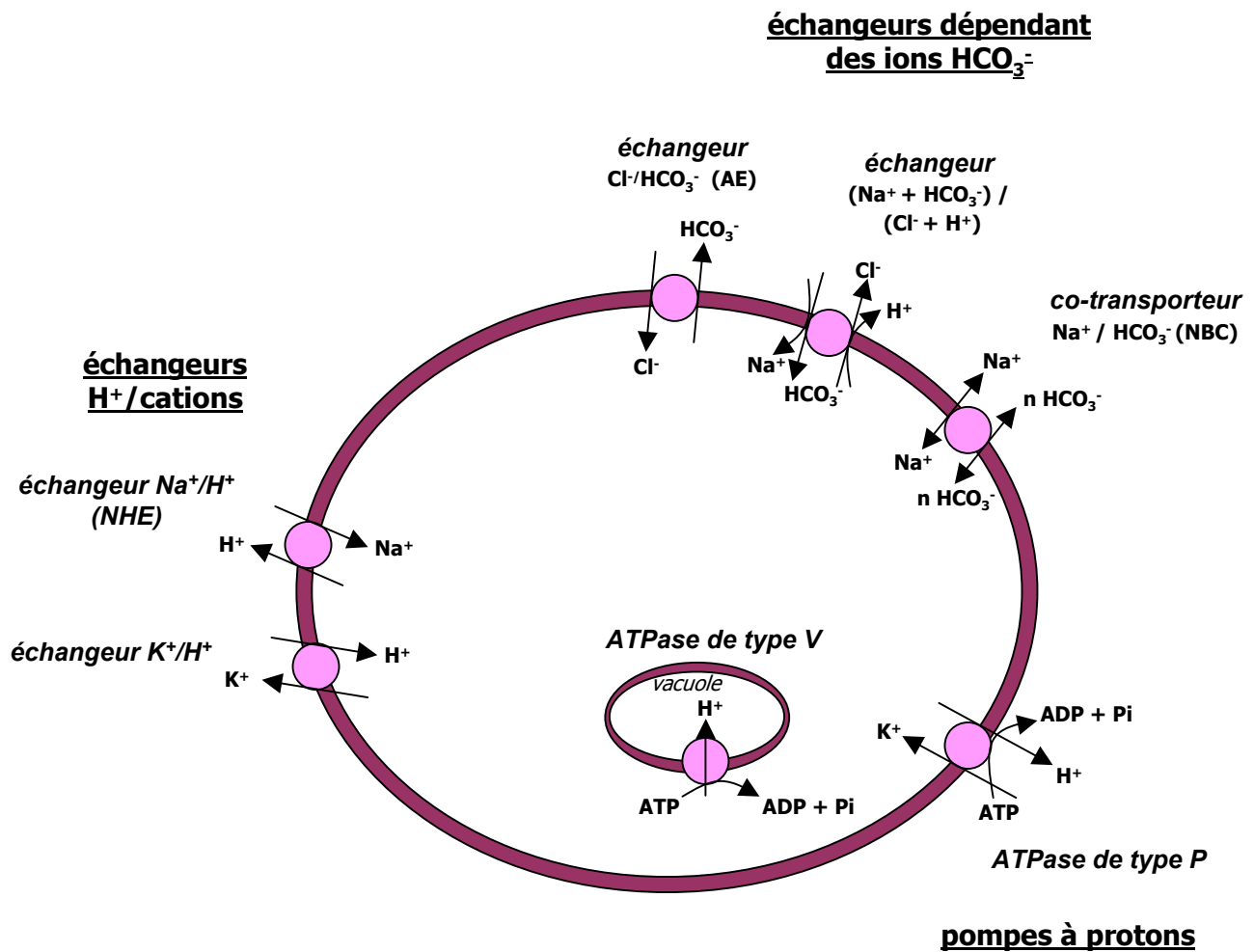
L'individu est constitué « d'unités cellulaires » morphologiquement individualisées qui sont intégrées dans un ensemble « pluricellulaire » dynamique : l'organisme. L'organisme réagit *via* des réactions complexes mais coordonnées, afin de se maintenir dans un « état stationnaire » normal. Ce maintien de l'état normal porte le nom d'homéostasie (*stasis* : état ; *homios* : égal, semblable à). L'homéostasie cellulaire est complexe, elle intègre des informations venant des cellules voisines aussi bien que des signaux intracellulaires variés. A l'échelle cellulaire, le contrôle homéostatique *via* la transmission/perception de messages implique, de manière directe ou indirecte, la membrane plasmique qui permet de contrôler le milieu intérieur. Le potentiel hydrogène ou pH participe à ces mécanismes de contrôle. Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont mis en évidence que le pH intracellulaire, ou pHi, joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires. L'ion hydrogène, à l'instar du calcium qui joue le rôle de messager secondaire, pourrait moduler la transduction des signaux cellulaires.

I.1- Définition de la notion de pH

En 1909, le pHi a été établi par Sørensen comme égal à la valeur de $-\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+]$. Comme pour la plupart des potentiels liés à la vie cellulaire, les valeurs physiologiques du pHi sont maintenues dans d'étroites limites comprises généralement entre 6.8 et 7.2 (Putnam, 1995). L'homéostasie protonique est régulée par de nombreux systèmes tampons et des mécanismes de transport au niveau de la membrane plasmique, permettant un équilibre entre l'entrée et la sortie de protons dans la cellule. La redondance des processus mis en œuvre dans le contrôle du pHi souligne l'importance de l'homéostasie protonique pour la cellule.

Figure 1 : Principaux mécanismes impliqués dans la régulation du pH_i

Il existe différents mécanismes impliqués dans la régulation du pH_i : les échangeurs dépendant des ions HCO_3^- , les échangeurs H^+ /cations et les pompes à protons. Le pH_i résulte de l'activité de ces différentes protéines (d'après Putnam, 1995).



I.2- Mécanismes régulateurs du pHi

Il existe au sein de la cellule différents systèmes qui permettent de maintenir le pHi à des valeurs physiologiques : des systèmes tampons et des mécanismes de transports de l'ion hydrogène.

I.2.1- Les mécanismes tampons

Le pouvoir tampon est un ensemble de systèmes qui prévient de brusques et importantes modifications du pHi. Ces systèmes sont constitués de substances capables de consommer (bases) ou de donner (acides) des protons lorsque le pHi varie. Les tampons présentent l'inconvénient de ne fonctionner que dans des intervalles restreints de pH. De nombreux systèmes biologiques accumulent de petites molécules qui peuvent avoir le rôle de tampon. Généralement, leurs propriétés varient peu en fonction de leur état d'ionisation. Chez les mammifères, le principal tampon du plasma est constitué par les groupes phosphates libres.

En plus de l'action des systèmes tampons, la cellule présente au niveau de la membrane plasmique plusieurs mécanismes de transport d'équivalents acides ou basiques.

I.2.2- Les mécanismes de transport des protons

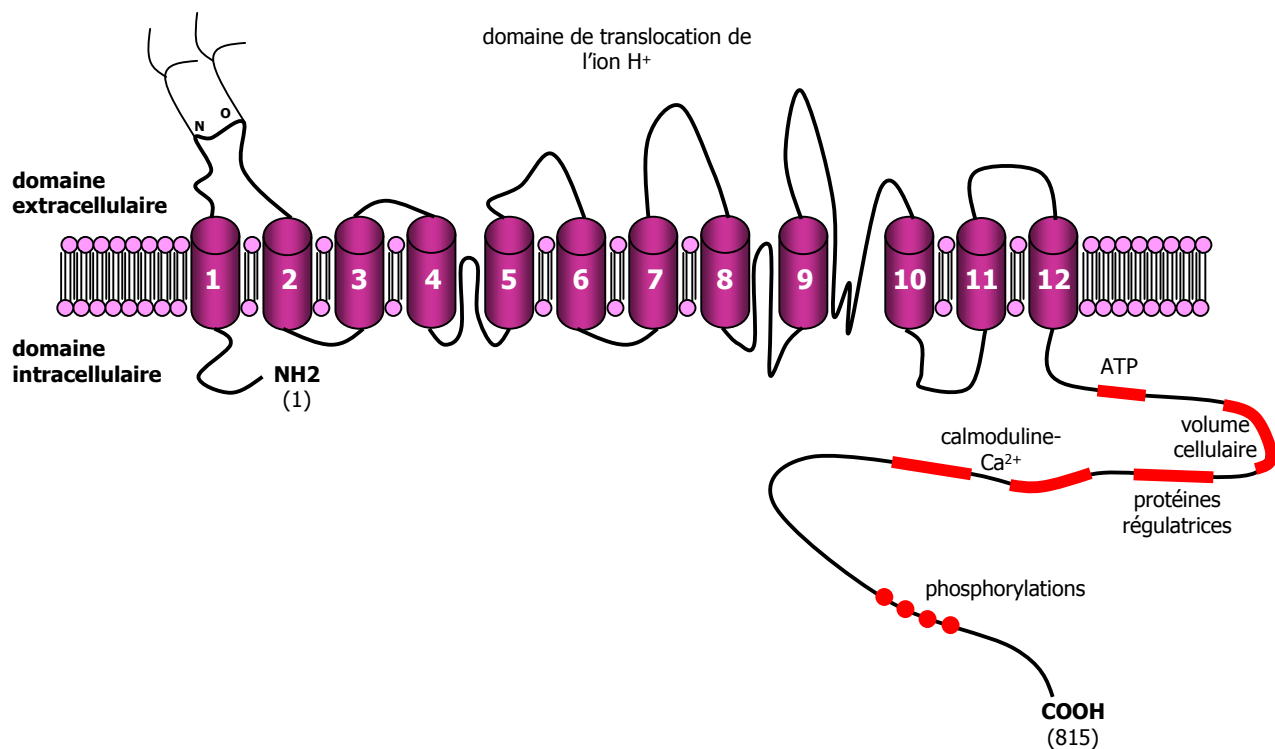
Les principaux transporteurs cellulaires des acides/bases sont : les échangeurs protons/cations, les transporteurs dépendant de HCO_3^- et les pompes à protons (Figure 1).

I.2.2.1- Les échangeurs protons/cations

Parmi les échangeurs protons/cations, le mieux connu est l'échangeur sodium/proton (NHE pour Na^+/H^+ exchanger) qui représente une des voies majeures de sortie des ions hydrogènes dans de nombreux types cellulaires. Dans les conditions physiologiques, cette protéine membranaire couple l'entrée d'un ion sodium à la sortie d'un proton. Cet échangeur préserve d'une acidification excessive du cytoplasme. En absence de sodium extracellulaire, le fonctionnement de l'échangeur est inversé, provoquant alors une acidification intracellulaire (Paris et Pouyssegur, 1983). Actuellement, six isoformes ont été identifiées (NHE1 à NHE6).

Figure 2 : Structure de l'échangeur sodium/proton de type 1

Le NHE 1 humain est une protéine de 91 kDa constituée de 815 acides aminés. La région N-terminale est hautement conservée chez les différents NHE. Les segments transmembranaires sont impliqués dans la translocation des protons, la modulation allostérique de l'échangeur par les protons et la liaison aux drogues. Le premier segment transmembranaire est glycosylé. La partie C-terminale présente différents domaines qui sont responsables de la régulation de l'échangeur par le pH_i , par le calcium intracellulaire, par la phosphorylation, par l'ATP, par l'interaction avec d'autres protéines et par des stimulus mécaniques comme le volume cellulaire (d'après Ritter et coll., 2001).



Le NHE1 est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme et joue un rôle central dans la régulation du pHi (Orlowski et Grinstein, 1997 ; Counillon et Pouyssegur, 2000 ; Figure 2). L'activité du NHE1 peut être régulée par différents mécanismes. Dans le compartiment intracellulaire, l'échangeur présente un site régulateur sensible au pH qui permet de réguler l'échange sodium/proton en fonction du pHi (Paris et Pouyssegur, 1984). Ce site régulateur se trouve dans un état protoné lorsque la concentration en ions hydrogènes dans le cytoplasme est élevée et dans un état déprotoné à pH normal. Ainsi, l'activité de l'échangeur est quasi nulle lorsque le pHi est compris entre 7.00 et 7.40, mais sous l'effet d'une acidification intracellulaire, l'échangeur est activé. Différentes classes de récepteurs à la surface de la cellule peuvent également réguler l'activité de l'échangeur comme les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs couplés à des protéines G et les récepteurs intégrines. Le signal émis par le récepteur, à travers un réseau de voies de signalisation, induit des modifications dans le domaine régulateur C-terminal cytoplasmique du NHE1. Ces modifications incluent des phosphorylations, des liaisons à des protéines régulatrices et des changements conformationnels qui régulent l'échange sodium/proton à travers un changement d'affinité du site de transport des ions hydrogènes (pour revue, Putney et coll., 2002).

La voie des récepteurs à activité tyrosine kinase, aboutit à l'activation du NHE1 *via* p21^{Ras} et la voie MAPK-Erk2 (Mitogen-Activated Protein Kinase - Extracellular Regulated protein Kinase 2 ; Hagag et coll., 1987 ; Maly et coll., 1989). La phosphorylation du NHE1 par cette voie se fait par l'intermédiaire de la protéine p90^{Rsk} (p90 Ribosomal S6 subunit protein Kinase) activée par MAPK-Erk2 (Takahashi et coll., 1999). Les récepteurs couplés aux protéines G provoquent l'activation des PKC qui phosphorylent l'échangeur. Il existe également une voie indépendante de la PKC qui requiert l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la Ca²⁺-calmoduline qui interagit directement en modifiant la conformation et l'activité de l'échangeur (Bertrand et coll., 1994). Deux classes d'agents pharmacologiques sont connues pour inhiber l'activité du NHE1 : l'amiloride (et ses dérivés) et les benzoylguanidines (et ses dérivés ; Counillon et coll., 1993 ; Scholz et coll., 1995).

Les isoformes NHE2, NHE3 et NHE4 ont une distribution plus limitée et sont majoritairement exprimées dans les reins et l'appareil digestif (Orlowski et coll., 1992 ; Tse et coll., 1993 ; Bai et coll., 1999 ; Moe, 1999). L'isoforme NHE5 est principalement exprimée dans le cerveau (Klanke et coll., 1995 ; Attaphitaya et coll., 1999). NHE6, dernière isoforme à avoir été identifiée, est localisée exclusivement dans les mitochondries. Son expression est

élevée dans les tissus qui ont un métabolisme important tels que le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques (Numata et coll., 1998).

L'autre transporteur de cations/protons est l'échangeur K^+/H^+ . Cet échangeur couple la sortie d'un ion potassium contre l'entrée d'un proton dans la cellule et conduit à une acidification intracellulaire.

I.2.2.2- Les transporteurs dépendant de HCO_3^-

Il existe trois types de transporteurs capables d'affecter le pH_i et de transporter les ions HCO_3^- ou des espèces apparentées comme CO_3^{2-} : l'échangeur Cl^-/HCO_3^- , l'échangeur $(Na^+ + HCO_3^-)/Cl^-$, le co-transporteur Na^+/HCO_3^- .

L'échangeur Cl^-/HCO_3^- , également dénomé AE (pour Anion Exchangeur), a surtout été étudié dans les globules rouges. Dans des conditions physiologiques, cet échangeur couple la sortie d'un ion HCO_3^- à l'entrée d'un ion Cl^- dans la cellule. Cet échangeur présente différentes isoformes : AE1, AE2 et AE3. Le gène codant AE1 est majoritairement exprimé dans les érythrocytes. AE2 est détectée dans différents organes et plus particulièrement dans les reins et les cellules lymphatiques (Alpern et coll., 1988 ; Wang et coll., 1996). AE3 est exprimé au niveau du tissu cardiaque des vertébrés et dans le système nerveux central des mammifères (Kopito et coll., 1989 ; Raley-Susman et coll., 1993).

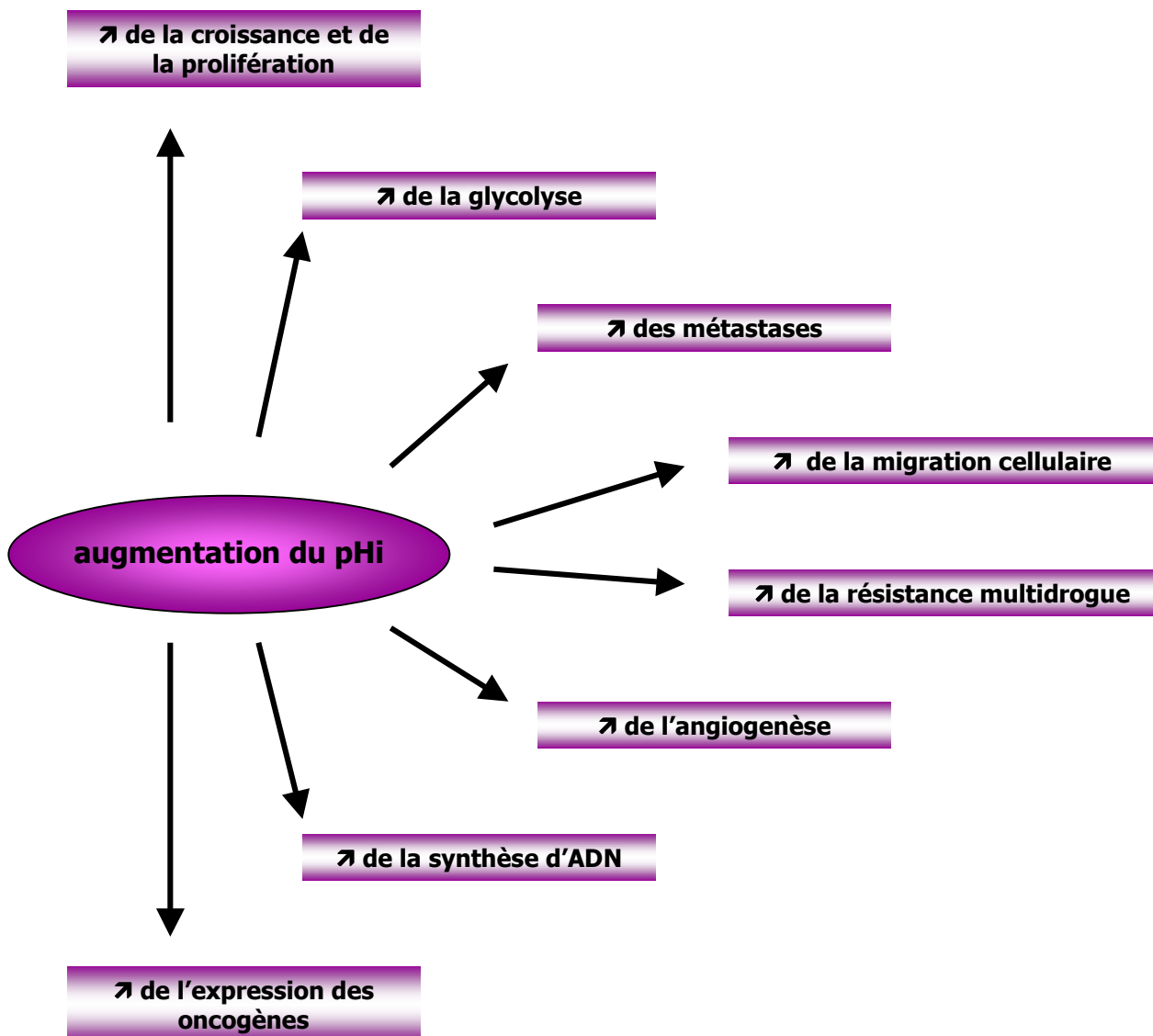
AE1, AE2 et AE3 sont sensibles au pH_i (pour revue, Pucéat, 1999), d'autres facteurs peuvent moduler l'activité de ces échangeurs, notamment leur phosphorylation par des tyrosines kinases (Yannoukakos et coll., 1991). Leur activité peut être inhibée par les dérivés du stilbène comme le SITS ou le DIDS (Lee et coll., 1991).

L'échangeur $(Na^+ + HCO_3^-)/(Cl^- + H^+)$ a d'abord été décrit comme un système de transport régulant le pH_i dans le système nerveux des invertébrés et dans les préparations musculaires, mais il est présent dans bien d'autres types cellulaires. Cet échangeur est responsable de l'entrée d'un ion Na^+ et d'un ion HCO_3^- dans la cellule contre l'extrusion d'un ion hydrogène et d'un ion chlore (Russel et Boron, 1976 ; Boron et Boulpaep, 1983). L'échangeur $(Na^+ + HCO_3^-)/(Cl^- + H^+)$ est responsable d'une augmentation du pH_i .

Le co-transporteur Na^+/HCO_3^- a été originellement identifié dans les cellules rénales épithéliales (Boron et Boulpaep, 1983). Il permet l'échange d'un ion Na^+ contre 2 ou 3 ions HCO_3^- . Le nombre d'ions HCO_3^- échangé et le sens du transport varient selon le type cellulaire (Planelles et coll., 1993 ; Seki et coll., 1993).

Figure 3 : Processus cellulaires affectés par une augmentation du pHi

L'alcalinisation intracellulaire est une des caractéristiques de la cellule cancéreuse. Différents mécanismes associés à la transformation néoplasique sont affectés par l'augmentation du pHi (d'après Harguidey et coll., 2005).



I.2.2.3- Les pompes à protons

Il existe différents types de pompes à protons, parmi elles, les ATPases de type P (plasmiques) comme la H^+/K^+ ATPase et les ATPases de type V (vacuolaires), qui peuvent également être détectées au niveau de la membrane cellulaire. Ces pompes sont impliquées dans la régulation du pHi en expulsant dans le milieu extérieur des ions hydrogènes consécutivement à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

L'activité de ces différentes protéines est responsable du maintien du pHi à des valeurs physiologiques. La régulation du pHi est fondamentale pour la cellule puisqu'il apparaît que de nombreux processus cellulaires sont affectés par des changements de pHi.

I.3 - pHi et prolifération cellulaire

Le pHi affecte un grand nombre de processus cellulaires tels que le métabolisme, la synthèse d'ADN, la prolifération, l'expression des oncogènes ou encore la migration cellulaire (pour revue, Putnam, 1995 ; Harguindeguy et coll., 2005 ; Figure 3). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'influence du pHi dans le contrôle de l'entrée en phase M.

La liaison de ligand à des récepteurs mitotiques induit une augmentation rapide du pHi de 0.2 unités pH (Moolenaar et coll., 1983 ; Hesketh et coll., 1985). Roth et coll. (1983) ont suggéré que l'augmentation du pHi est l'effecteur primaire des différents changements associés à la division cellulaire. L'augmentation du pHi *via* l'activation du NHE joue un rôle central dans le développement de la réponse mitotique induite par différents facteurs de croissance (Putney et coll., 2002). L'inhibition du NHE par des dérivés de l'amiloride empêche la prolifération de différents types cellulaires en réponse à des facteurs mitotiques (Koch et Leffert, 1979 ; Pieri et coll., 1984 ; Pieri et coll., 1985). Des fibroblastes mutés, qui n'expriment plus le NHE, ne répondent pas à l'application de stimuli mitogènes (Pouyssegur et coll., 1985). Les études les plus démonstratives sur l'influence du pHi dans les mécanismes de prolifération ont été obtenues par variations artificielles du pHi (utilisation de bases faibles ou variations du pH extracellulaire (pHe)). Dans des types cellulaires tels que les fibroblastes, l'augmentation du pHe est suffisante pour induire la synthèse d'ADN et stimuler la prolifération (Zetterberg et Engstrom, 1981 ; Szwergold et coll., 1989). Une étude plus récente a montré que l'expression des régulateurs du cycle cellulaire peut être modulée par des variations de pHi dans des fibroblastes de derme humain. Une diminution du pHe,

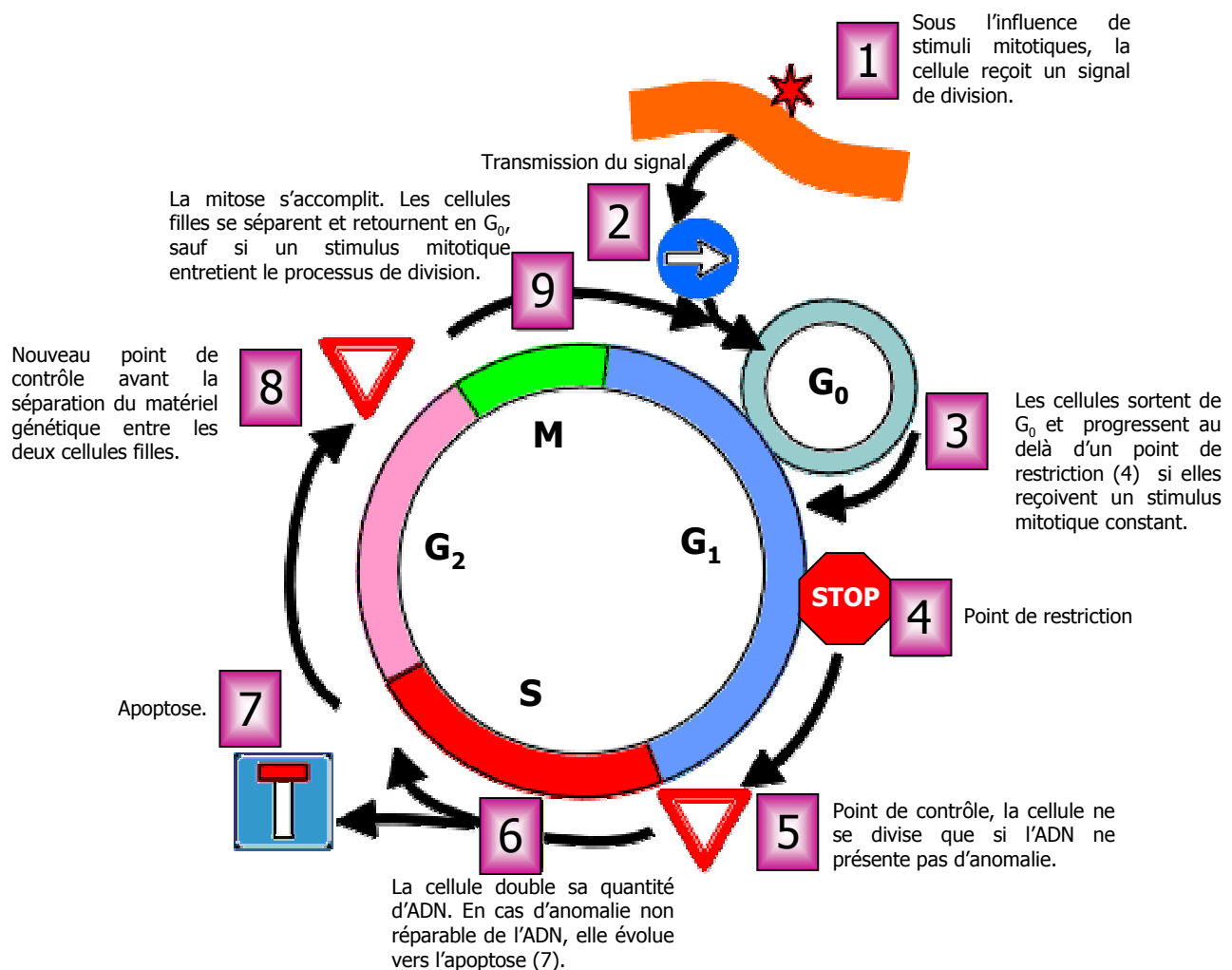
responsable d'une acidification intracellulaire, diminue l'expression des régulateurs du cycle cellulaire, comme les cyclines A2 ou B2, Cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1), et augmente le niveau d'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p57^{KIP2} (Bumke et coll., 2003). L'expression de la cycline B1 est diminuée dans des fibroblastes exprimant un NHE déficient alors que l'expression de Wee 1, inhibiteur de l'entrée en phase M, est augmentée (Putney et Barber, 2003). Ces résultats corroborent le fait qu'une diminution du pHi provoque l'arrêt de la progression du cycle cellulaire.

L'alcalinisation intracellulaire est également nécessaire pour la prolifération des cellules animales consécutive à la stimulation par les oncogènes (Doppler et coll., 1987). La micro-injection de p21^{Ras} provoque une augmentation rapide et soutenue du pHi. L'amiloride supprime cette alcalinisation, ainsi que les mitoses induites par la micro-injection de p21^{Ras} (Hagag et coll., 1987). L'expression de v-Mos dans des fibroblastes NIH 3T3 est également responsable d'une alcalinisation intracellulaire par activation du NHE (Doppler et coll., 1989). L'expression d'une pompe à protons de levure dans des fibroblastes de Souris provoque un effet oncogénique proportionnel à l'augmentation de pHi (Perona et coll., 1988). Reshkin et coll. (2000) montrent que l'expression de l'oncoprotéine E7 du papillomavirus dans des fibroblastes induit une alcalinisation intracellulaire ainsi qu'un phénotype transformé. Si l'augmentation de pHi est inhibée par un milieu de culture acide ou par l'inhibition du NHE, le phénotype n'est pas transformé.

Ainsi, l'alcalinisation intracellulaire apparaît comme un mécanisme clef dans la transformation oncogénique. Elle est nécessaire pour le développement et le maintien d'un phénotype transformé. Toutefois, les liens entre le pHi et le cycle cellulaire ne sont pas clairement élucidés.

Figure 4 : Phases et événements majeurs du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est constitué de 4 phases successives : la phase G₁ (Gap ou Growth phase 1), la phase S (DNA synthesis), la phase G₂ (Gap ou Growth phase 2) et la phase M (mitose). La phase G₀ est un état de repos où la cellule ne se divise pas. Entre ces différentes étapes se situent des points de contrôle ou « check-point », qui ont pour but de vérifier l'intégrité de la transmission de l'ADN de la cellule mère vers les cellules filles (<http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-1.htm>).



Chapitre II : Le cycle cellulaire

Tous les organismes sont constitués de cellules qui se multiplient par division cellulaire. Un adulte possède environ 100 000 milliards de cellules, toutes originaires d'une même cellule, le zygote. La division cellulaire est un processus essentiel au développement embryonnaire, mais il est également vital durant toute la vie de l'organisme adulte. La division cellulaire est extrêmement complexe et est régulée par un grand nombre de protéines qui interviennent souvent très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession des différentes étapes du cycle cellulaire.

C'est au cours du XIX siècle qu'il a été établi que toutes les cellules d'un organisme, quel qu'il soit, proviennent d'autres cellules par les processus de division cellulaire. Jusque dans les années 1970, cytologistes et embryologistes ont décrit les différentes phases du cycle cellulaire en détail, sans savoir quels étaient les mécanismes de contrôle de la division cellulaire. A la fin des années 1980, la conception du cycle cellulaire a été bouleversée grâce aux travaux menés sur des modèles biologiques variés comme les levures, les embryons d'oursins, les ovocytes d'Amphibiens et d'Etoiles de mer. Ces recherches ont montré que la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est universellement contrôlée par des variations d'activités de protéines kinases spécialisées. Ces travaux ont été couronnés par un prix Nobel de physiologie et de médecine, décerné en 2001, à Leland Hartwell, Tim Hunt et Paul Nurse.

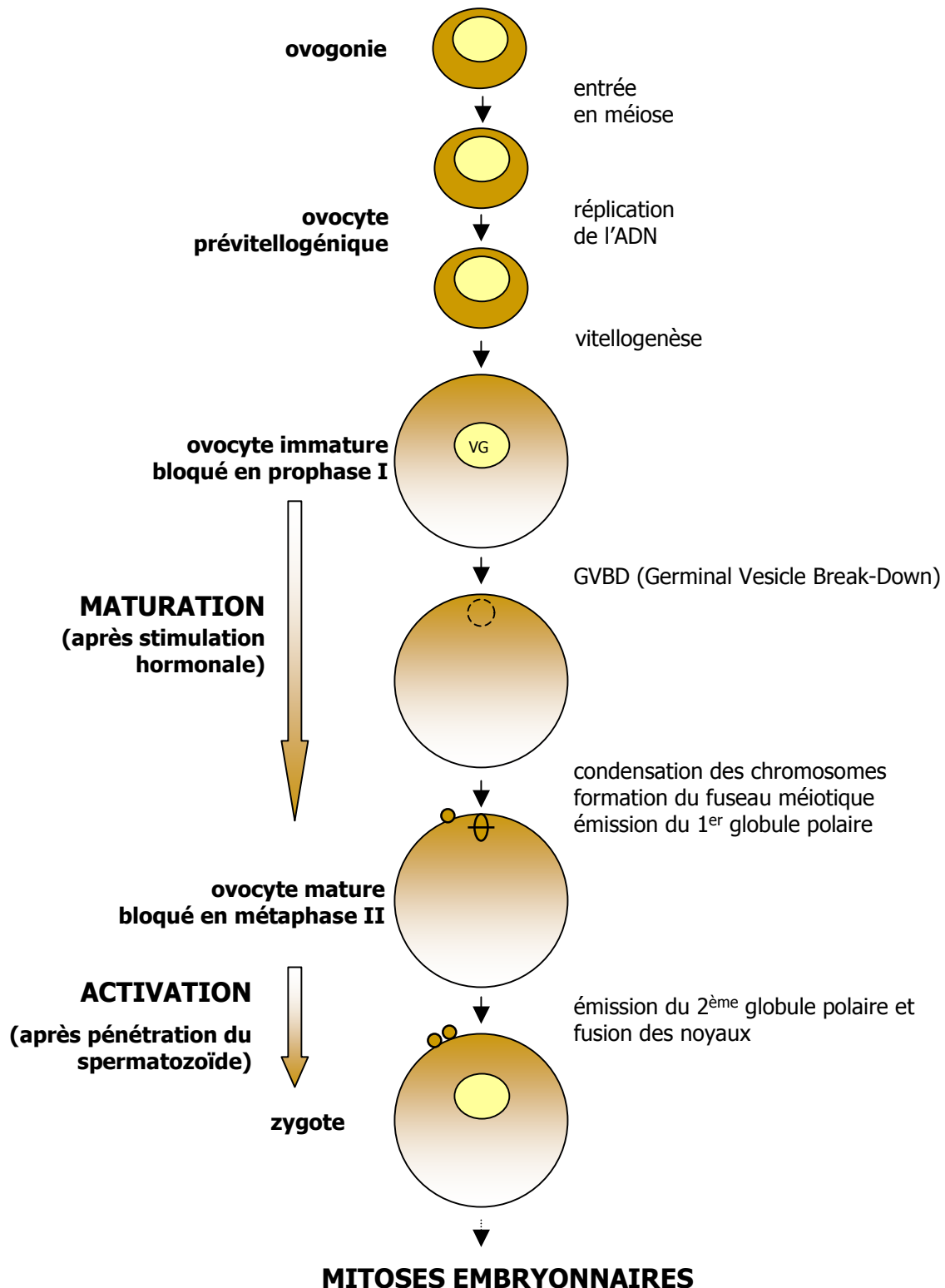
Ces mécanismes fondamentaux sont hautement conservés à travers l'évolution et opèrent de la même manière chez tous les organismes eucaryotes.

II.1- Les différentes phases du cycle cellulaire

Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dans un état de quiescence. Sous l'effet de signaux mitogènes, elles entament un cycle de division (Figure 4). Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases G1, S, G2 et M. Au cours de la phase G1, les cellules passent le point de restriction qui les engagent de manière irréversible vers la division cellulaire. Durant la phase S, les chromosomes sont dupliqués par un processus semi-conservatif. La phase M, préparée durant la phase G2, est composée de 5 phases (prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase) caractérisées par la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire. Durant la prophase, les chromosomes achèvent

Figure 5 : Principales étapes permettant le passage de l'ovogonie au zygote chez le Xénope

L'ovocyte subit deux blocages au cours de son développement. Le premier blocage, en prophase I, est levé par une stimulation hormonale et permet la maturation ovocytaire. Le second blocage, en métaphase II, est levé par la fécondation et se poursuit par la caryogamie et le développement embryonnaire.



leur condensation et l'enveloppe nucléaire se rompt. Pendant la prométaphase, le fuseau se forme et les chromosomes débutent leur alignement. A la métaphase, les chromosomes sont définitivement alignés à équidistance des pôles du fuseau. La disjonction des chromosomes se produit pendant l'anaphase. Durant la télophase, les chromosomes migrent vers les pôles, le fuseau disparaît, les chromosomes se décondensent et la cytokinèse commence.

II.2- Cas particulier : la reprise méiotique des ovocytes de Xénope

L'ovocyte de Xénope est un modèle de choix dans l'analyse du déclenchement de la phase M. L'ovocyte subit la méiose, processus particulier de division cellulaire constitué de deux divisions successives (méiose I et méiose II) avec des arrêts physiologiques. Les deux divisions se succèdent sans interphase et sans phase de synthèse d'ADN. La reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope, 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 (Figure 5). Lors de la fécondation, le spermatozoïde lève le blocage métaphasique et conduit à la formation d'un zygote diploïde.

Durant l'ovogenèse, l'ovocyte accumule de nombreux éléments qui seront nécessaires pour la reprise méiotique et les premiers stades de développement.

PARTIE II :

L'OVOCYTE IMMATURE

DE XENOPE

Figure 6 : Les différents stades de l'ovogenèse chez le Xénope

L'ovogenèse est divisée en 6 stades définis essentiellement par la taille et la pigmentation de l'ovocyte.

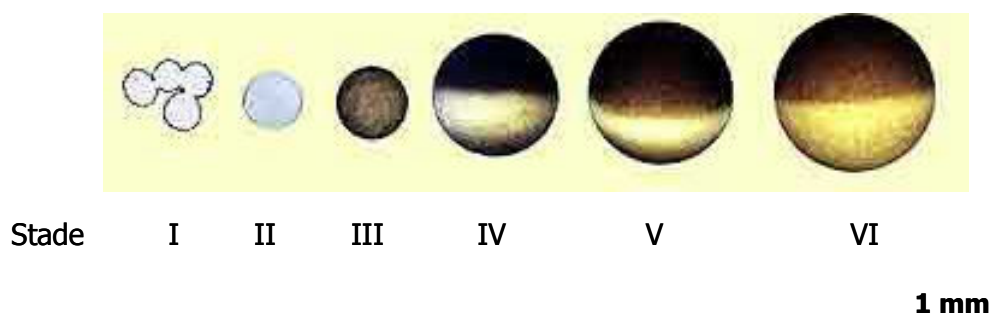


Tableau 1: Caractéristiques des différents stades des ovocytes de Xénope (d'après Dumont, 1972)

stade	I	II	III	IV	V	VI
taille (en μm)	50-300	300-450	450-600	600-1000	1000-1200	1200-1300
apparence	transparent	opaque - blanc	légèrement marron	différence de pigmentation entre le pôle animal et végétatif	hémisphères clairement délimités	anneau équatorial non pigmenté

Chapitre I : L'ovogenèse

L'ovogenèse se réalise en plusieurs étapes, entrecoupées de longues périodes de pauses. Les ovocytes d'Amphibiens de stade VI sont bloqués en prophase I, au stade diplotène, pendant plusieurs mois, jusqu'à ce qu'ils reçoivent un signal hormonal qui lève le blocage. L'ovogenèse a lieu dans l'ovaire qui s'organise en sacs délimités par du tissu épithélial et conjonctif renfermant des milliers d'ovocytes à différents stades de développement. Par convention, six stades de développement ont été définis, principalement en fonction de la taille et de la pigmentation de l'ovocyte (Dumont, 1972 ; Tableau 1, Figure 6). Durant l'ovogenèse, l'ovocyte croît en taille et accumule des réserves en préparation de la fécondation et des premiers stades de division.

I.1- Accumulation des réserves vitellines et des mitochondries

L'accumulation des réserves vitellines débute à partir du stade III et s'arrête lorsque les ovocytes deviennent sensibles à la progestérone. Le précurseur de la vitellogénine est produit dans le foie sous contrôle hormonal. Il est amené par la circulation sanguine au niveau de l'ovocyte où il se fixe sur son récepteur, présent à la surface de l'ovocyte, puis le complexe vitellogénine-récepteur pénètre dans l'ovocyte par endocytose. Le précurseur de la vitellogénine peut représenter jusqu'à 80% des protéines de l'ovocyte. Son entrée dans l'ovocyte est en grande partie responsable de l'augmentation de volume de celui-ci durant les derniers stades de la croissance ovocytaire. Les vésicules contenant la vitellogénine sont d'abord localisées à la surface de l'ovocyte en raison de l'endocytose, puis fusionnent avec des corps multivésiculaires pour former les plaquettes vitellines où le précurseur est clivé en lipovitelline et phosphovitelline. La fusion et la croissance des plaquettes vitellines se produisent durant toute la vitellogenèse. La taille des plaquettes vitellines augmente durant la croissance de l'ovocyte. Elles sont réparties selon un gradient centripète et un gradient pôle animal - pôle végétatif. En périphérie, les plaquettes vitellines jeunes ont un volume moins important que les plaquettes vitellines âgées, localisées préférentiellement au pôle végétatif.

Durant l'ovogenèse, l'ovocyte accumule également un grand nombre de mitochondries. L'ovocyte contient approximativement 10^5 fois plus de mitochondries qu'une cellule somatique. Les mitochondries s'agrègent temporairement pour former un corps sphérique unique adjacent à la membrane nucléaire appelé corps de Balbiani ou nuage

mitochondrial. L'analyse microscopique de ces structures révèle que les mitochondries sont associées à des éléments cytosquelettiques et à des structures golgiennes. Cette structure est particulièrement visible dans l'ovocyte de stade I et se fragmente dans l'ovocyte de stade II. Les fragments se regroupent en deux populations : une population qui reste localisée dans la région périnucléaire et qui peut être redistribuée ultérieurement dans tout le cytoplasme, et une population qui migre au niveau du cortex végétatif. Cette dernière population est retrouvée au niveau des cellules germinales primordiales de l'embryon en développement.

I.2- Condensation des chromosomes et synthèse d'ARN

Entre les stades I et III, les chromosomes se décondensent et prennent leur aspect de chromosomes en écouvillon. Leur extension est maximale entre les stades I et III, indiquant une activité transcriptionnelle maximale. Au stade IV, les chromosomes en écouvillon se rétractent pour se condenser aux stades V et VI. Dès le stade II, la synthèse des ARN ribosomaux débute pour atteindre un maximum aux stades III et IV. La synthèse des molécules d'ARNr est beaucoup plus importante dans l'ovocyte ($3 \cdot 10^5$ molécules/seconde) que dans une cellule somatique (10 à 100 molécules/seconde). Les ARNr sont accumulés durant toute l'ovogenèse. Dès le stade III, la totalité des ARNr est présente dans l'ovocyte et les synthèses d'ARN ultérieures interviennent pour compenser la dégradation des ARN. La quantité totale des ARNm est constante entre les stades III et VI. Au stade VI, le taux de transcription diminue pour atteindre la moitié de son taux maximal.

Les séquences qui régulent la localisation des ARNm sont généralement localisées dans la région 3' UTR (3'-Untranslated Region) des ARNm. Chez le Xénope, la synthèse des ARNm localisés dans le cortex végétatif se fait en deux vagues successives séparées dans le temps (Forristall et coll., 1995 ; Kloc et Etkin, 1995). Les ARNm synthétisés précocement, tel que Xcat-2, sont distribués uniformément dans le cytoplasme au début du stade I. Dès la fin du stade I, les ARNm se trouvent associés au nuage mitochondrial et au stade II, ils sont localisés au niveau du cortex végétatif (Zhou et King, 1996). La localisation des ARNm synthétisés précocement ne ferait pas intervenir les microtubules. Le traitement des ovocytes de stade I avec des drogues induisant la dépolymérisation des microtubules n'affecte pas leur localisation (Kloc et Etkin, 1995). La seconde vague de synthèse des ARNm, comprenant l'ARNm *Vg1*, débute lorsque les premiers ARNm synthétisés sont localisés au niveau du cortex.

I.3- Formation de l'enveloppe vitelline

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

I.4- Migration des granules corticaux et pigmentation de l'ovocyte

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

Les pigments se déposent au niveau du cortex dès le stade III. La zone corticale devient polarisée dès le stade IV, le cortex végétatif s'amincit probablement par étirement alors que dans la région animale, le cortex est plus épais. L'enzyme impliquée dans les premiers stades de la formation de la mélanine, la tyrokinase, n'est synthétisée qu'au début de la phase de croissance. D'abord localisée dans le trans-Golgi, elle est transférée dans les prémélanosomes lors de la mélanisation (Eppig et Dumont, 1974). Les granules corticaux sont disposés sous la membrane plasmique alors que les pigments sont disposés plus en profondeur dans le cortex.

Figure 7 : Répartition des réserves dans un ovocyte immature de Xénope de stade VI en coupe méridienne

Dans un ovocyte immature de stade VI, les plaquettes vitellines sont majoritairement accumulées dans l'hémisphère végétatif, à l'inverse, les différentes structures cytoplasmiques tels que les ARN et les mitochondries sont préférentiellement localisés dans l'hémisphère animal.

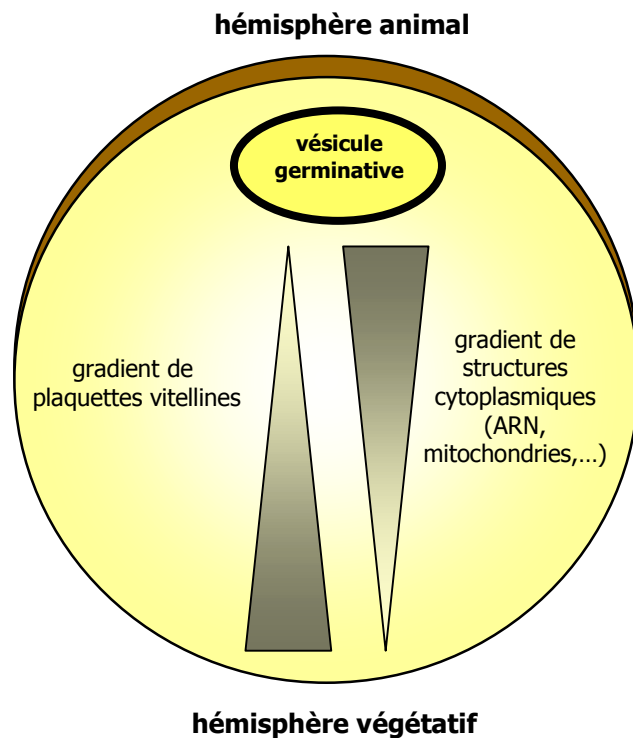
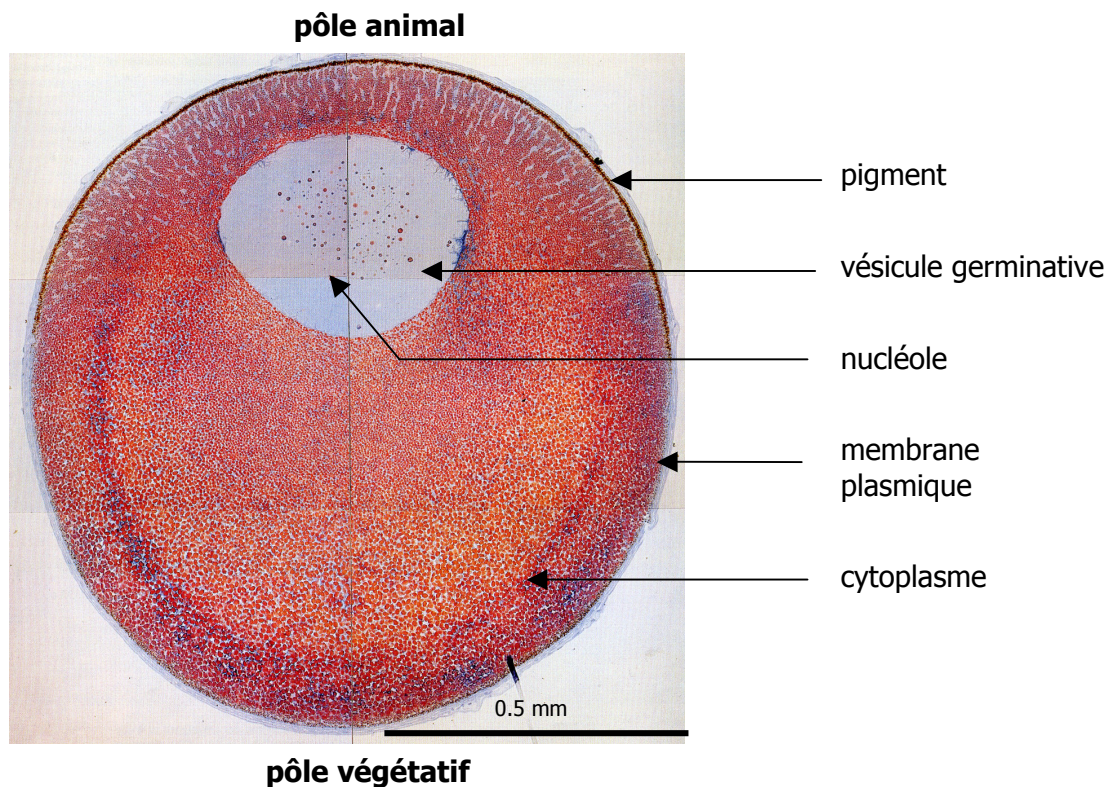


Figure 8 : Photographie d'un ovocyte immature de Xénope de stade VI en coupe méridienne (d'après Hausen et Riebesell, 1991)



Chapitre II : Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI

De grande taille, environ 1.2 mm, et d'un volume approximatif de 1 μ l, l'ovocyte de Xénope de stade VI est de type hétérolécithe : il possède des réserves vitellines abondantes qui, si elles retardent la segmentation, ne l'empêchent pas. L'accumulation de plaquettes vitellines assure l'autonomie nutritive du futur embryon pendant une longue période.

Le cytoplasme renferme également un grand nombre de ribosomes mais seuls 2% sont impliqués dans la traduction. Les autres ribosomes constituent un stock qui sera fonctionnel ultérieurement. De la même manière, seuls 20% des ARNm sont traductibles, la majorité des ARNm est liée à une série de protéines spécifiques et demeure non traductible. La plupart des composés cytoplasmiques (ARN, ribosomes,...) et le noyau sont excentrés dans l'hémisphère animal, à l'inverse, le vitellus est accumulé majoritairement dans l'hémisphère végétatif. Cette distribution crée ainsi deux gradients opposés qui polarisent la cellule (gradient vitellin et gradient de structures cytoplasmiques, Figure 7).

Le noyau, également appelé vésicule germinative (VG), est beaucoup plus volumineux que le noyau d'une cellule somatique. Le diamètre de la vésicule germinative est d'environ 400 μ m soit 40 à 50 fois la taille du noyau d'une cellule somatique. Elle renferme le nucléoplasme avec les chromosomes et le matériel nucléolaire. La vésicule germinative contient 18 paires de chromosomes (génome allotétraploïde), environ 1500 nucléoles qui renferment des copies des gènes codant les ARNr et de nombreuses protéines stockées qui seront utilisées ultérieurement lors du développement de l'embryon. Elle contient également des histones, des ARN polymérases, et des ADN polymérases. L'enveloppe nucléaire présente des pores nucléaires permettant le transport nucléaire (Figure 8).

Les pigments sont spécifiquement localisés dans la région corticale. La densité des pigments est corrélée avec la polarité de l'ovocyte et confère à celui-ci une symétrie radiale : l'hémisphère animal est fortement pigmenté alors que l'hémisphère végétatif est faiblement pigmenté. Les ovocytes de stade VI sont caractérisés par la présence d'un anneau dépigmenté au niveau de la zone équatoriale. Le cortex est également riche en fibres d'actines qui pourraient intervenir dans la contraction de la région corticale se produisant après la fécondation.

PARTIE III :
LA REPRISE MÉIOTIQUE DE
L'OVOCYTE DE XENOPE

Chapitre I : Stimulation de la reprise méiotique

Différents types de stimuli peuvent induire la reprise méiotique dans les ovocytes de Xénope.

I.1 - Les hormones stéroïdes

I.1.1- La progestérone

Chez les Amphibiens, la production de l'hormone gonadotrope par l'hypophyse stimule la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdes, dont la progestérone, par les cellules folliculaires (pour revue, Jessus et Ozon, 2004). *In vitro*, l'incubation des ovocytes d'Amphibiens anoures (Masui, 1967 ; Schuetz, 1967 ; Smith et coll., 1968) et urodèles (Vilain, 1977), en présence de progestérone, induit la reprise méiotique.

Dans les cellules somatiques, l'action de la progestérone se fait *via* une voie génomique. En liant un récepteur membranaire, elle active des voies de signalisation qui régulent, positivement ou négativement, la transcription des gènes contenant des éléments de réponse à la progestérone. Dans l'ovocyte de Xénope, l'action de la progestérone ferait également intervenir une voie non génomique impliquant un récepteur membranaire suivi de l'activation de différentes voies de signalisation.

En effet, lorsque la progestérone est injectée dans les 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), elle n'induit jamais la reprise méiotique. A l'inverse, la progestérone couplée à des billes de haut poids moléculaire, non perméables à la membrane, déclenche la reprise méiotique (Baulieu et coll., 1978 ; Godeau et coll., 1978 ; Bandyopadhyay et coll., 1998). Seuls les ovocytes de stades V et VI sont compétents pour subir la reprise méiotique après stimulation hormonale (Dumont, 1972). Une des explications possibles serait la faible concentration en récepteurs à la progestérone présents au niveau de la membrane. La densité de récepteurs augmente fortement dans les ovocytes de stades V et VI, elle est six fois plus importante que dans les ovocytes de stade IV (Liu et Patino, 1993).

Deux types de récepteurs à la progestérone (PR) chez *Xenopus laevis* ont été identifiés : XPR-1 (Tian et coll., 2000) et XPR-2 (Bayaa et coll., 2000). La micro-injection des ARNm de ce dernier augmente la sensibilité des ovocytes à l'hormone et accélère la reprise

méiotique induite par la progestérone (Bayaa et coll., 2000 ; Tian et coll., 2000). De plus, la micro-injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN endogène du récepteur inhibe la reprise méiotique. Cette inhibition peut-être supprimée par la micro-injection du récepteur purifié (Tian et coll., 2000). Cependant, ce récepteur est principalement cytoplasmique même si une fraction (5%) se trouve au niveau de la membrane plasmique (Bagowski et coll., 2001a). Il est possible que la progestérone agisse à travers d'autres récepteurs membranaires. Des travaux très récents montrent que la progestérone lie également le récepteur aux androgènes avec une forte affinité et conduit à la diminution de l'activité de la protéine G $\beta\gamma$ (Evaul et coll., 2006).

Chez certains poissons téléostéens, la reprise méiotique peut être déclenchée par des hormones stéroïdes regroupées sous le nom de MIH (Maturation Inducing Hormone). Ces hormones agissent également *via* un récepteur membranaire (Nagahama, 1997). Chez la truite, l'ADNc a été cloné et sa modélisation informatique montre qu'il s'agit d'un récepteur à sept hélices transmembranaires. La protéine recombinante produite chez *Escherichia coli* présente un site unique, de haute affinité, saturable pour les progestines. Lorsque ce récepteur est exprimé dans des cellules de mammifère, il induit l'activation de la voie MAPK et l'inhibition de l'adénylate cyclase en réponse aux progestines (Zhu et coll., 2003). Chez plusieurs vertébrés, comme le Xénope, la Souris et l'Homme, des orthologues de ce récepteur ont été clonés. Ces gènes codent une protéine à sept domaines transmembranaires qui ne possède aucune homologie avec les récepteurs nucléaires des stéroïdes mais présente des caractéristiques de récepteurs couplés à des protéines G (Zhu et coll., 2003).

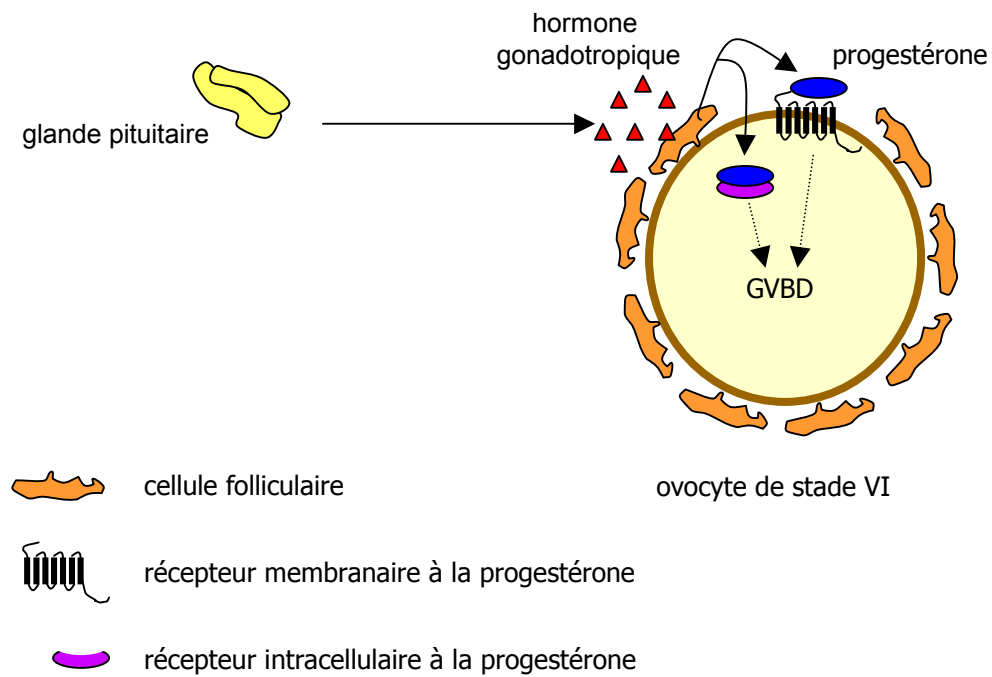
In vitro, la progestérone est l'hormone la plus souvent utilisée pour stimuler la reprise méiotique. Cependant, d'autres hormones stéroïdes pourrait être impliquées dans la reprise méiotique.

I.1.2 - Les autres hormones stéroïdes

In vitro, la testostérone et la déoxycorticostérone seraient de meilleurs inducteurs de la GVBD (Germinal Vesicle Break-Down) (Blondeau et Beaulieu, 1984). La quantité de testostérone produite par les cellules folliculaires est plus importante que celle de la progestérone (Fortune et coll., 1975). Les androstérones, comme l'androsténone, induisent la reprise méiotique à des concentrations identiques à celle de la progestérone, voire plus faibles que pour la testostérone (Lutz et coll., 2001). Lorsque les femelles sont injectées de gonadotropine, les concentrations sériques et ovariennes en testostérone et en

Figure 9 : Contrôle hormonal de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

L'hormone gonadotrope est sécrétée par la glande pituitaire. Elle induit la production de progestérone qui est considérée comme la MIH (Maturation-Inducing Hormone) naturelle des cellules folliculaires d'amphibiens. La progestérone peut, soit lier son récepteur membranaire, soit pénétrer à l'intérieur de l'ovocyte pour lier son récepteur intracellulaire (Maller, 2003).



androstènedione sont dix fois supérieures à celles en progestérone. L'ovocyte métabolise la progestérone en androstènedione lorsqu'elle est appliquée ou micro-injectée (Lutz et coll., 2001).

Ainsi, la progestérone stimule la reprise méiotique mais des métabolites dérivés de la progestérone pourraient également participer au déclenchement de la reprise méiotique. Un récepteur nucléaire aux androgènes (xAR) a été cloné dans les ovocytes. Cependant, l'inhibition de ce récepteur n'empêche pas la reprise méiotique, de même que l'inhibition de l'enzyme qui permet la conversion de la progestérone en androstènedione (Lutz et coll. 2001). Evaul et coll. (2006) suggèrent que les androgènes, à faibles concentrations, lient le récepteur aux androgènes alors qu'à des concentrations élevées, les androgènes lient également les récepteurs à la progestérone.

Des stratégies de clonages moléculaires ont montré la présence, dans l'ovocyte de Xénope, de l'ARNm codant le récepteur classique de la progestérone et de la testostérone (Bayaa et coll., 2000 ; Tian et coll., 2000 ; Lutz et coll., 2001). La présence des deux types de récepteurs dans l'ovocyte, membranaires et intracellulaires, suggèrent que des voies différentes pourraient être simultanément activées en présence de stéroïdes (Maller, 2003 ; Figure 9).

I.2- Les facteurs de croissance

I.2.1- L'insuline et l'IGF1

In vitro, certains facteurs de croissance, comme l'insuline ou l'IGF1 (Insulin Growth Factor), stimulent la reprise méiotique des ovocytes, bien que 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). Ils agissent au travers de l'activation d'un récepteur membranaire à l'IGF1 qui reconnaît l'IGF1 et l'insuline (Hainaut et coll., 1991 ; Janicot et coll., 1991 ; Zhu et coll., 1998).

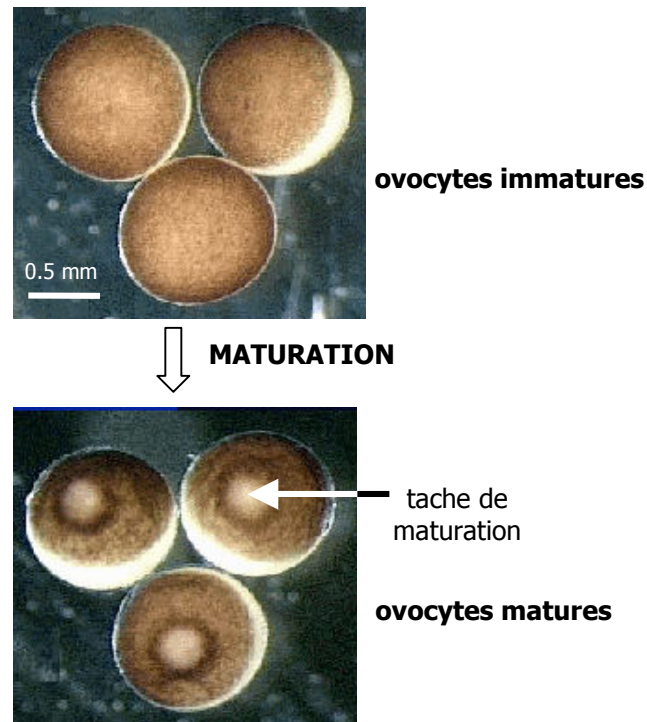
La reprise méiotique stimulée par l'insuline est dépendante de l'activité de la protéine G monomérique p21^{Ras} (Deshpande et Kung, 1987 ; Kor, et coll., 1987). Par ailleurs, la micro-injection d'une forme oncogénique constitutivement active de p21^{Ras} stimule la reprise méiotique en absence de toute stimulation hormonale (Birchmeier et coll., 1985).

I.2.2- Les autres facteurs de croissance

Différents facteurs de croissance sont capables de stimuler la reprise méiotique à condition que l'ARNm du récepteur soit exprimé dans l'ovocyte. Même si ces récepteurs ne sont pas endogènes, leurs voies de signalisation sont présentes et fonctionnelles dans l'ovocyte. Ainsi, le FGF (Fibroblast Growth Factor ; Browaeys-Poly et coll., 2000), l'EGF humain (Epidermal Growth Factor ; Opresko et Wiley, 1990) et le NGF (Nerve Growth Factor ; Nebreda et coll., 1991) peuvent induire la reprise méiotique des ovocytes.

Figure 10 : Photographies d'ovocytes immatures et d'ovocytes matures de Xénope

L'ovocyte mature est caractérisé par la présence d'une tache de maturation au pôle animal.



Chapitre II : Événements cytologiques de la reprise méiotique

II.1 - GVBD et formation du fuseau

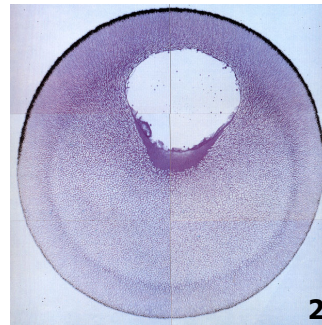
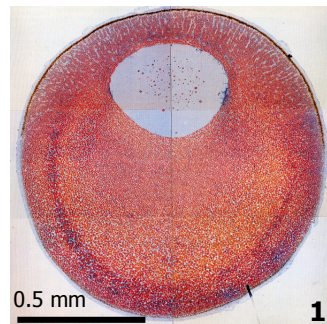
Les événements cytologiques de la reprise méiotique sont visibles (sous loupe binoculaire) dans les heures qui suivent la stimulation hormonale. La vésicule germinative migre au pôle animal de l'ovocyte et se rompt selon un processus appelé GVBD. La migration de la vésicule germinative à l'apex de l'ovocyte est accompagnée d'une dépigmentation locale qui forme la tache de maturation (Figure 10).

La rupture de l'enveloppe nucléaire commence à la base de la vésicule germinative (Figure 11). Le nucléoplasme se dissipe dans le cytoplasme environnant et le volume nucléaire devient de plus en plus réduit. Des analyses immunohistologiques révèlent que les protéines nucléaires se dispersent dans le cytoplasme en restant majoritairement dans l'hémisphère animal. Simultanément à la rupture de l'enveloppe nucléaire s'organise, à la face inférieure de la vésicule germinative où se trouve une zone dépourvue de plaquettes vitellines, un réseau de microtubule transitoire (TMA : Transient Microtubule Array) à partir d'un centre organisateur microtubulaire (MTOC : Microtubule Organizing Center). Le TMA migre ensuite rapidement vers le pôle animal (Huchon et coll., 1981 ; Gard, 1992). Un agrégat compact de microtubules dérivant du TMA prend une forme cylindrique pour former le fuseau de métaphase I.

En raison de l'absence de centriole et de centrosome (Huchon et coll., 1981), le fuseau méiotique a un aspect différent du fuseau mitotique. Le fuseau s'oriente d'abord perpendiculairement à l'axe pôle animal - pôle végétatif puis pivote et s'oriente perpendiculairement à la membrane plasmique (Gard, 1992 ; Figure 12). Alors que le fuseau se met en place, les chromosomes se condensent progressivement. D'abord localisés dans la région basale du complexe TMA-MTOC, les chromosomes sont répartis en une plaque métaphasique lorsque le fuseau est perpendiculaire à la membrane. La première division de méiose s'achève par l'expulsion du premier globule polaire et la seconde division de méiose débute mais s'arrête en métaphase II. Un agrégat microtubulaire en forme de disque s'allonge pour organiser le fuseau bipolaire de métaphase II. Au centre de la tache de maturation, il est possible d'observer le premier globule polaire et l'extrémité du fuseau ancrée perpendiculairement dans la membrane plasmique. La division s'arrête en métaphase II, et l'ovocyte reste bloqué jusqu'à la fécondation.

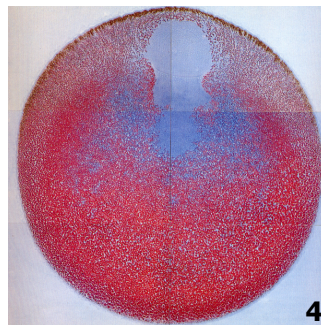
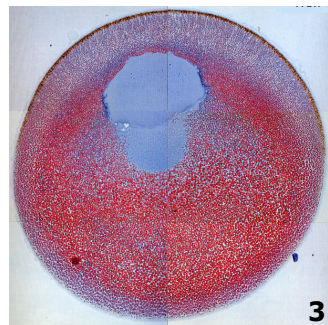
Figure 11 : Evénements cytologiques associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope (d'après Hausen et Riebesell, 1991)

Ovocyte immature



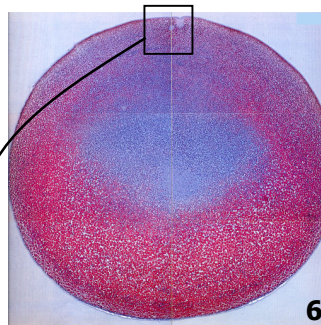
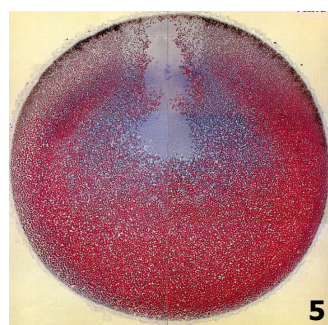
Rupture de l'enveloppe nucléaire à la base de la vésicule germinative.

Les microtubules s'organisent tangentiellement à la base de la vésicule germinative et l'enveloppe nucléaire montre des signes de désorganisation.



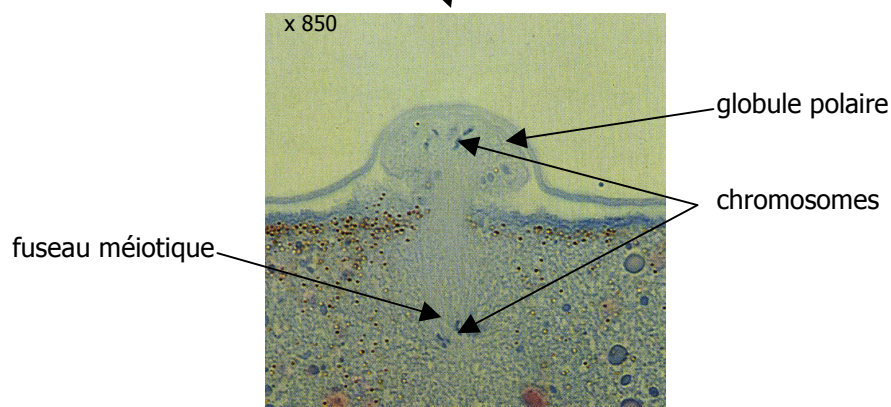
La vésicule germinative devient plus petite et migre au pôle animal, les microtubules envahissent la partie basale de la vésicule germinative.

La vésicule germinative a presque disparue, les chromosomes sont condensés et enchevêtrés dans le réseau de microtubules, lequel a migré au niveau du pôle animal.



Ovocyte mature

Les chromosomes condensés sont positionnés au niveau du fuseau et le premier globule polaire a été expulsé.



In vivo, les ovocytes matures sont libérés des cellules folliculaires dans la cavité péritonéale à partir de laquelle ils sont transportés dans l'oviducte pour être pondus. En passant dans l'oviducte, la gangue se dépose et un certain nombre de modifications au niveau de la membrane plasmique prépare l'ovocyte à son changement de milieu. La fécondation permettra d'achever la deuxième division de méiose et déclenchera le développement embryonnaire.

II.2 - Organisation du fuseau

Au cours de la division cellulaire, le fuseau joue un rôle essentiel dans la ségrégation du matériel génétique et sa répartition entre les cellules filles. L'organisation du fuseau est très complexe : un grand nombre de protéines sont associées aux microtubules afin de réguler leur assemblage ou leur démembrement. Les microtubules sont formés par l'association de dimères de tubulines α et β . La nucléation des microtubules, c'est-à-dire la formation *de novo* d'un microtubule, se produit au niveau du MTOC (Andersen, 1999).

L'association des dimères de tubulines forme un protofilament et en permanence, il y a association et dissociation des dimères. Les microtubules sont orientés par rapport au MTOC, l'extrémité (-) de tous les microtubules du fuseau est tournée vers le MTOC, où la dépolymérisation est prédominante. L'extrémité (+), où la polymérisation est prédominante, est tournée vers l'équateur, elle entre en contact avec les chromosomes (Figure 13).

L'auto-assemblage des microtubules implique l'hydrolyse d'un nucléotide : la guanosine triphosphate (GTP) est hydrolysée en guanosine diphosphate (GDP). Seules les tubulines avec le GTP s'ajoutent à un microtubule croissant. A l'intérieur des microtubules, le GTP est hydrolysé en GDP, ce qui conduit à une modification de la conformation de la tubuline. Cette transformation provoque l'instabilité mécanique et le désassemblage des microtubules.

La polymérisation des microtubules est caractérisée par leur vitesse de croissance (« growth rate ») et leur dépolymérisation par leur vitesse de rétraction (« shrinkage rate »). La transition de la croissance vers la rétraction est appelée « catastrophe » et la transition inverse, de la rétraction vers la croissance est désignée par le terme de « sauvetage ». Ces deux transitions sont également caractérisées par leur fréquence et ces quatre paramètres reflètent la régulation de la polymérisation des microtubules dans la cellule (Andersen, 1999).

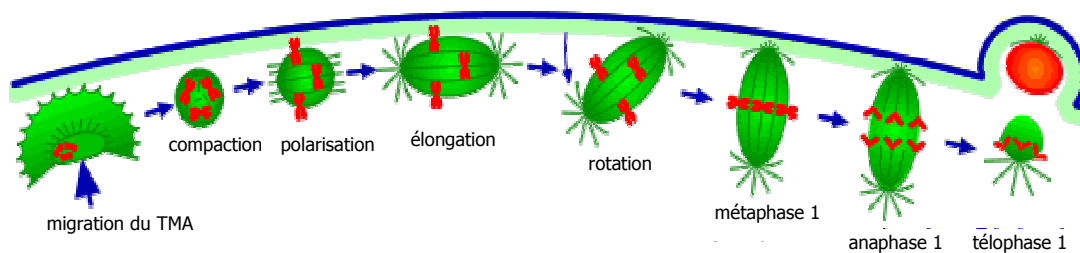
A l'heure actuelle, une seule famille de protéines est impliquée dans la stabilisation du fuseau : les MAP (Microtubule-Associated Proteins). Trois protéines ont été décrites

Figure 12 : Organisation des microtubules et du fuseau de division durant la méiose de l'ovocyte de Xénope

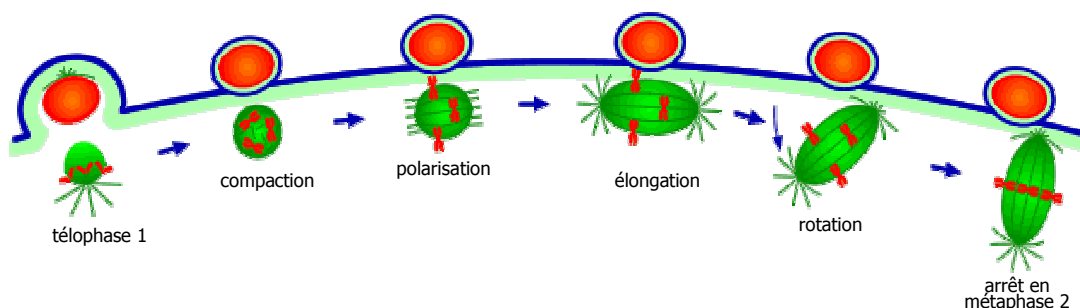
D'après le site de Gard D.:

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

La GVBD débute au niveau basal de la vésicule germinative et coïncide avec l'apparition du MTOC. Les microtubules s'étendent dans le nucléoplasme à partir du MTOC pour former le TMA. Le complexe TMA-MTOC migre au pôle animal en emportant avec lui les chromosomes condensés dans le cortex animal. Au niveau du pôle animal, le complexe TMA-MTOC sert de précurseur au premier fuseau de division. Quatre étapes sont nécessaires. Le complexe se condense pour former un agrégat de microtubules et de chromosomes puis le fuseau établit un axe bipolaire. Ensuite, le fuseau s'allonge durant la prométaphase et s'oriente transversalement à l'axe animal-végétatif puis un des pôles du fuseau s'ancre au cortex.



A la différence de l'interphase dans les cellules somatiques, les chromosomes condensés ne se décondensent pas et l'enveloppe nucléaire ne se reforme pas. L'assemblage du second fuseau débute avec la formation d'un agrégat compact et non polarisé de microtubules et de chromosomes condensés. Le fuseau de seconde division s'allonge durant la prométaphase, s'ancre au cortex et subit une rotation pour se positionner parallèlement à l'axe pôle animal-pôle végétatif. L'ovocyte reste bloqué ainsi en métaphase II.

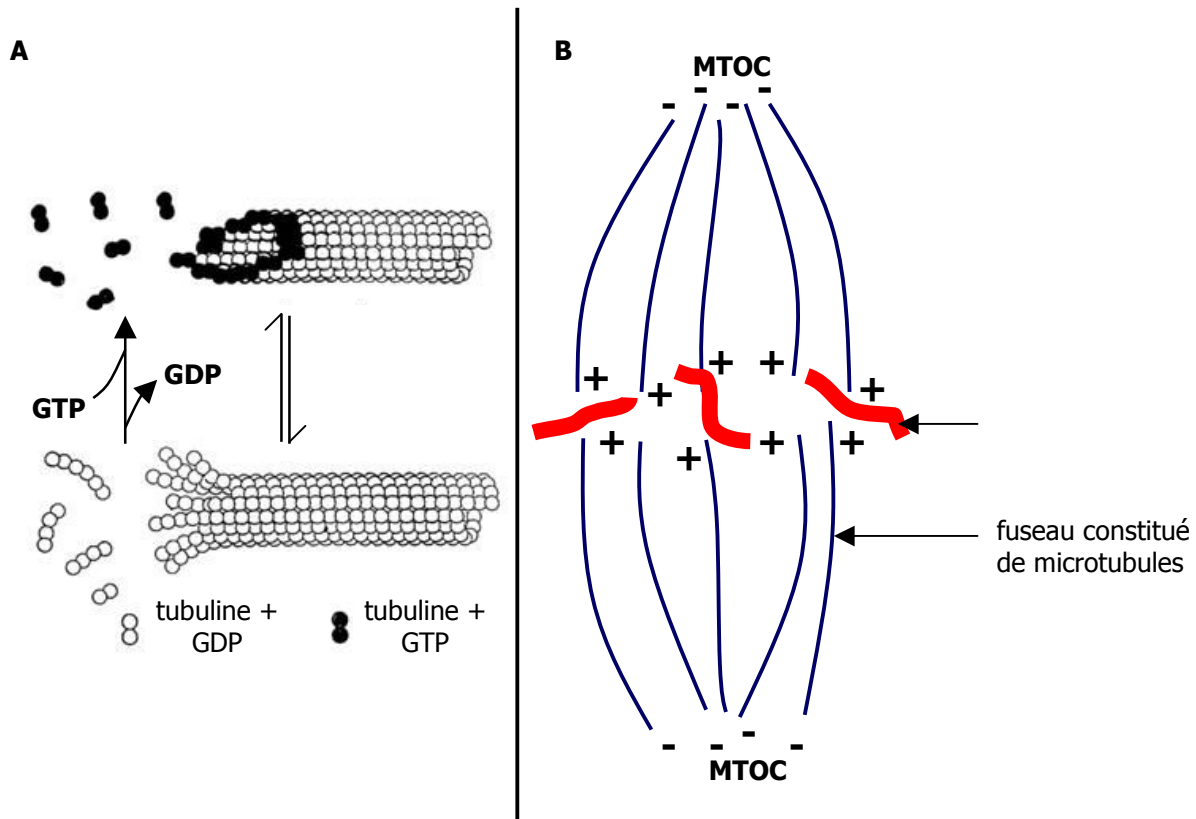


chez le Xénope : Xmap230 (Vasquez et coll., 1994, 1999), Xmap310 (Andersen et Karsenti, 1997), et Xmap215 (Vasquez et coll., 1994, Becker et coll., 2003). Leurs modes d'action diffèrent, Xmap230 prévient le phénomène de catastrophe et ralentit la vitesse de rétraction, Xmap310 augmente la fréquence de sauvetage alors que Xmap215 améliore la croissance de l'extrémité (+) des microtubules.

L'identification des protéines de déstabilisation des microtubules est assez récente. Différents facteurs ont été identifiés comme la stathmine et des membres de la famille KinI. La stathmine est une oncoprotéine surexprimée dans certains cancers comme les carcinomes mammaires (Lawler, 1998 ; Curmi et coll., 2000). Son mode d'action semble varier en fonction du pHi (Andersen, 2000).

Figure 13 : Formation et orientation des microtubules constituant le fuseau

(A) Un microtubule est constitué de 13 protofilaments formés par l'assemblage de dimères de tubuline. Les dimères libres de tubuline portant le GTP s'incorporent aux microtubules. Lorsque le dimère est incorporé au microtubule, le GTP est hydrolysé. Ainsi, le bout des microtubules portent des dimères chargés de GTP alors que la plupart des dimères formant le microtubule est liée au GDP. (B) L'extrémité (-) des microtubules est orientée vers le MTOC alors que l'extrémité (+) est dirigée vers les chromosomes.



Chapitre III : Evénements précoces de la reprise méiotique

III.1 - Stimulation par la progestérone

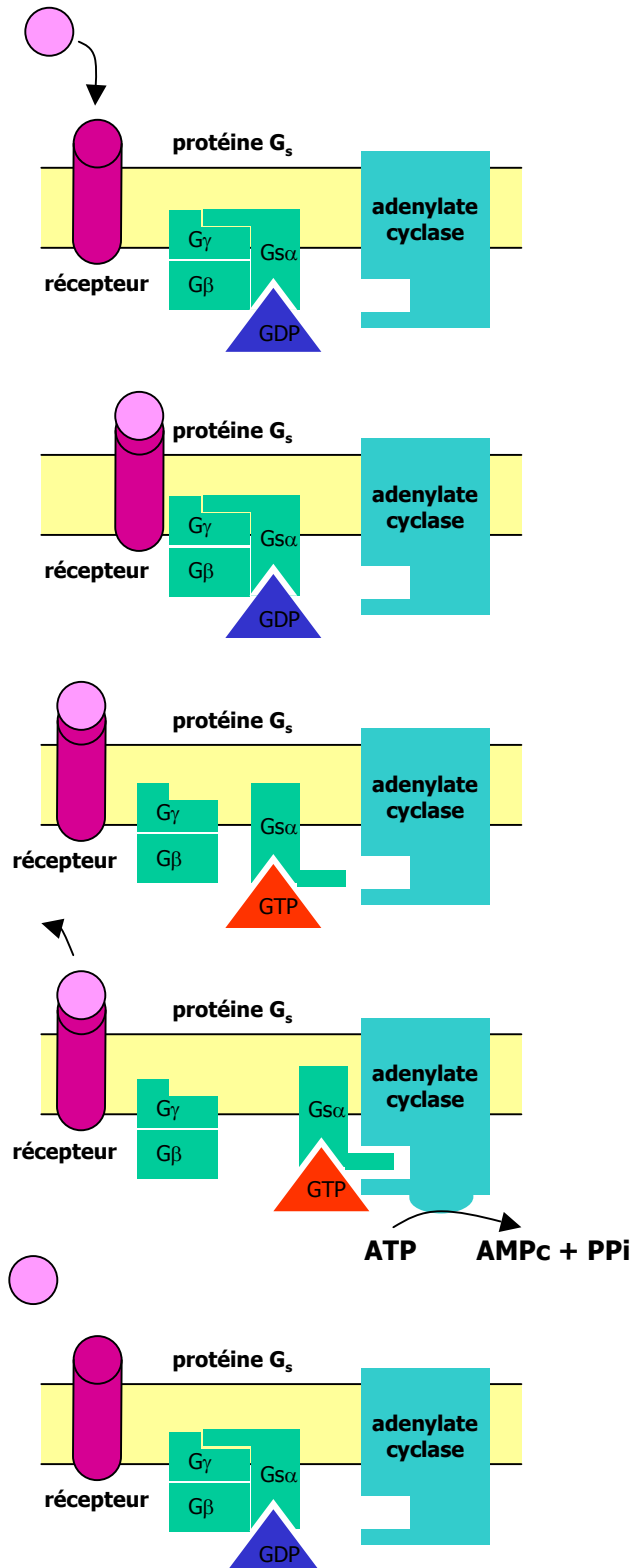
III.1.1- Diminution de l'AMPc et inhibition de la PKA

L'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) est produit grâce à une protéine membranaire : l'adénylate cyclase. Celle-ci est régulée par deux protéines G : G_i et G_s . L'adénylate cyclase est stimulée lorsqu'elle fixe la sous-unité G_s -GTP et elle est inhibée si elle fixe la sous-unité G_i -GTP (Figure 14). Le taux d'AMPc dans la cellule est régulé à la fois par sa synthèse *via* l'adénylate cyclase mais aussi par sa dégradation *via* l'AMPc phosphodiesterase.

Dans la cellule, l'AMPc agit sur les protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA). Les PKA sont des tétramères formés de deux chaînes régulatrices (R) et de deux chaînes catalytiques (C). Sous sa forme tétramérique, la PKA est dénuée d'activité enzymatique. La fixation de l'AMPc sur les chaînes régulatrices entraîne une dissociation du tétramère et les chaînes catalytiques phosphorylent alors des protéines cibles (Figure 15).

Dans les minutes qui suivent l'application de la progestérone sur les ovocytes de Xénope, l'activité de l'adénylate cyclase est inhibée de 50% environ (Finidori-Lepicard et coll., 1981 ; Sadler et Maller, 1981) et le taux d'AMPc diminue de 20 à 80 % selon les diverses études publiées (Speaker et Butcher, 1977 ; Bravo et coll., 1978 ; Schorderet-Slatkine et coll., 1978 ; Maller et coll., 1979 ; Cicirelli et Smith, 1985 ; Figure 16). Des agents qui activent l'adénylate cyclase, telles que les méthylxanthines, inhibent la reprise méiotique induite par la progestérone (O'Connor et Smith, 1976). De même, des inhibiteurs de phosphodiesterase, comme la théophylline et la papavérine, empêchent la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Bravo et coll., 1978 ; Sadler et Maller, 1987).

Les sous-unités $G_{s\alpha}$ et $G_{\beta\gamma}$ joueraient un rôle crucial dans le maintien de l'arrêt en prophase des ovocytes. La micro-injection d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la sous-unité α de la protéine G_s , inhibant l'activité de cette dernière, entraîne la reprise méiotique en l'absence de progestérone (Gallo et coll., 1995). La surexpression de la sous-unité $G_{\beta 1}$ seule, ou associée à la sous-unité $G_{\gamma 2}$, bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Lutz et coll., 2000 ; Sheng et coll., 2001). Cependant, certains travaux sont en désaccord avec ces résultats.

Figure 14 : Activation de l'adénylate cyclase

La liaison de l'hormone à son récepteur induit un changement de conformation du récepteur qui s'associe alors à la protéine G_s .

Le GTP se substitue au GDP sur $G_{s\alpha}$ et $G_{s\alpha}$ se dissocie du complexe G_{β} et G_{γ} .

La chaîne $G_{s\alpha}$ s'associe à l'adénylate cyclase, ce qui provoque la synthèse d'AMPc, l'hormone tend à se dissocier.

L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne la dissociation du complexe $G_{s\alpha}$ -adénylate cyclase et sa réassociation avec $G_{\beta\gamma}$. La conformation de G_s lui permet d'être à nouveau activée par le complexe récepteur-hormone.

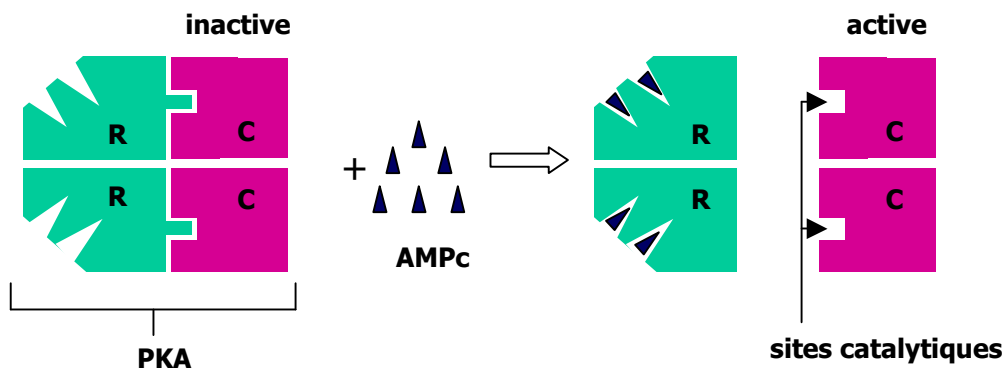
Cicirelli et coll. (1985) n'ont pas observé de diminution de l'AMPc durant la reprise méiotique. Le traitement des ovocytes par l'acétylcholine, qui diminue le taux d'AMPc, n'a aucune action maturante alors qu'un traitement par l'adénosine, qui augmente l'AMPc, induit la reprise méiotique (Gelerstein et coll., 1988). La micro-injection de la toxine pertussique, qui inhibe Gi, n'a aucun effet sur la GVBD (Goodhardt et coll., 1984 ; Olate et coll., 1984).

La diminution du taux d'AMPc entraîne une diminution de l'activité de la PKA dans les ovocytes de Xénope après stimulation par la progestérone (Wang et Liu, 2004). La micro-injection d'inhibiteurs de la PKA déclenche la reprise méiotique sans stimulation hormonale (Maller et Krebs, 1977). Les travaux de Maller et Krebs (1977) ont montré que la micro-injection d'une sous-unité catalytique constitutivement active de la PKA empêche la reprise méiotique alors que la micro-injection de la sous-unité régulatrice déclenche la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale. La PKAc inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone ou par la micro-injection de la protéine p39^{Mos} alors qu'elle n'a pas d'effet sur la reprise méiotique induite par la micro-injection d'extrait de MPF (Daar et coll., 1993). Une étude récente montre que la réactivation artificielle de la PKA avant la GVBD inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone. Sa réactivation artificielle, au moment de la GVBD ou après, n'empêche ni la progression méiose I-méiose II ni l'arrêt en métaphase II. Ainsi, certaines phases de la reprise méiotique pourraient être inhibées par l'activité de la PKA et d'autres non (Wang et coll., 2006). La PKAc pourrait inhiber l'activation du MPF en empêchant l'activation de Cdc25 (Matten et coll., 1994).

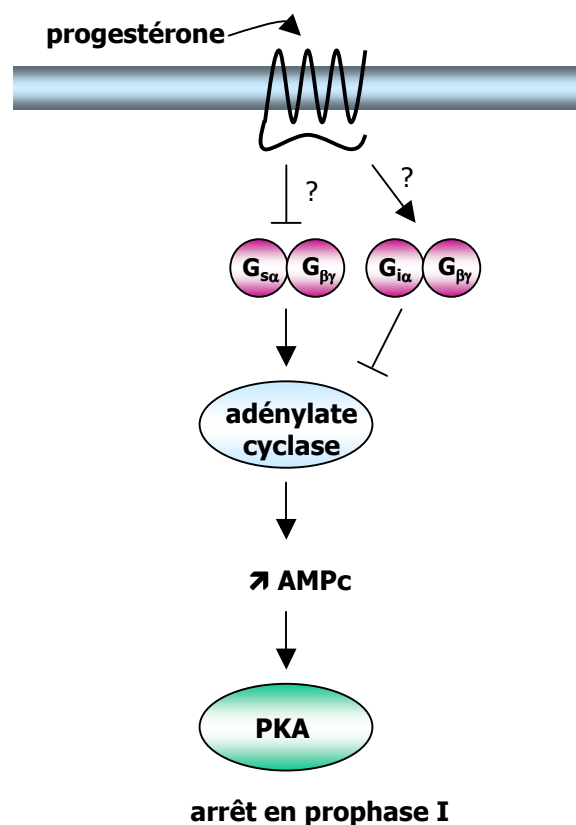
La PKA pourrait intervenir en régulant le MPF par activation, directe ou indirecte, de Wee 1 (Rime et coll., 1992). Cdc25 contient deux sites de phosphorylation pour la PKA qui interviennent dans la régulation de son activité (Izumi et coll., 1992). *In vitro*, la PKAc phosphoryle Cdc25 sur le résidu sérine 287, ce qui induit sa séquestration par la protéine 14-3-3. Dans les ovocytes immatures, ce résidu est phosphorylé, lorsque l'on ajoute la progestérone, la sérine 287 est déphosphorylée juste avant l'activation du MPF et l'entrée en phase M. La phosphorylation de ce résidu semble avoir un rôle important dans le maintien des ovocytes en phase G2. Lorsque la PKA est inhibée par des PKI, le résidu sérine 287 de Cdc25 est déphosphorylé. De plus, un mutant Cdc25 sur le résidu sérine 287 empêche la capacité de la PKA à maintenir l'ovocyte arrêté en phase G2 (Duckworth et coll., 2002). Cependant, d'autres travaux montrent que la micro-injection d'une sous-unité catalytique inactive de la PKA inhibe également la reprise méiotique. La PKA n'exercerait pas son activité inhibitrice *via* la phosphorylation de protéines cibles, mais *via* une activité de séquestration lors de la reprise méiotique (Schmitt et Nebreda, 2002). Ces travaux sont controversés par Eysers et coll. (2005) qui montrent que le mutant utilisé par Schmitt et Nebreda (K72R PKAc,

Figure 15 : Mécanisme d'activation de la PKA par l'AMPc

Sous sa forme tétramérique, la PKA est inactive car les protomères régulateurs obstruent le site catalytique des protomères catalytiques. La fixation de l'AMPc aux protomères régulateurs (R) provoque la dissociation des protomères catalytiques (C) qui peuvent phosphoryler divers substrats.

**Figure 16 : Activité de la PKA et variation de l'AMPc après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone**

Une des étapes précoces déclenchée par la progestérone est une diminution de la quantité d'AMPc et une diminution de l'activité de la PKA qui sont requises pour la reprise méiotique. L'inhibition de l'adénylate cyclase est réalisée soit par inhibition de la protéine Gs, soit par activation de la protéine Gi.



2002) présente une faible activité résiduelle et qu'il pourrait se lier aux sous-unités régulatrices endogènes de la PKA et ainsi provoquer une libération des sous-unités catalytiques libres dans l'ovocyte.

III.1.2- Hydrolyse des lipides membranaires

Dans les cellules somatiques, les récepteurs couplés à certaines protéines G, Gq et Go, agissent sur le métabolisme des phosphoinositides. Les protéines G activent la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol-diphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol-diphosphate (DAG). L'IP3 diffuse au niveau du réticulum endoplasmique et conduit à la libération de calcium en se liant à son récepteur. Le DAG, qui reste associé à la membrane, a pour rôle principal d'activer une famille de protéines kinases associée à la membrane : les protéines kinases C (PKC ; Figure 17)

III.1.2.1- La phospholipase C

La sous-unité α des protéines Gq ne semble pas nécessaire à la reprise méiotique induite par la progestérone, cependant sa micro-injection peut induire la GVBD dans des proportions variables suivant les lots d'ovocytes (Guttridge et coll., 1995). La micro-injection 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 micro-injection d'un analogue du DAG, le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), induit la méiose (Stith et Maller, 1987 ; Pan et Cooper, 1990). La stimulation de la GVBD, par micro-injection de la PLC, est dépendante de l'activité de la PKC (Carnero et Lacal, 1993). Cependant, le métabolisme des phosphoinositides au cours de la reprise méiotique est un sujet d'étude controversé.

Certains auteurs ont montré que la quantité de DAG ovocytaire diminue de 30 % dans les 15 secondes qui suivent l'application de la progestérone et de 60 % après cinq minutes. Le taux d'AMPc revient à sa valeur initiale après 15 minutes (Varnold et Smith, 1990). En opposition avec ces résultats, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation des niveaux d'IP3 et de DAG pendant la reprise méiotique (Wasserman et coll., 1990 ; Han et coll., 1992 ; Stith et coll., 1992). La diminution du niveau de DAG serait due à un artéfact en réponse à la présence d'éthanol dans lequel est solubilisée la progestérone (Wasserman, 1992).

L'importance de la PLC dans la reprise méiotique diffère selon que la maturation est stimulée par la progestérone ou par l'insuline. Un anticorps dirigé contre la PLC inhibe la

Figure 17 : Formation et rôle de l'IP3 et du DAG dans la cellule

La fixation de certains ligands à leur récepteur stimule une protéine G qui provoque l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette dernière scinde le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en 1,2-diacylglycérol (DAG). L'IP₃ diffuse à travers le cytoplasme et se fixe au niveau de récepteurs présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, provoquant ainsi la libération de calcium. La protéine kinase C (PKC) est activée par le DAG qui demeure ancré à la membrane cytoplasmique.

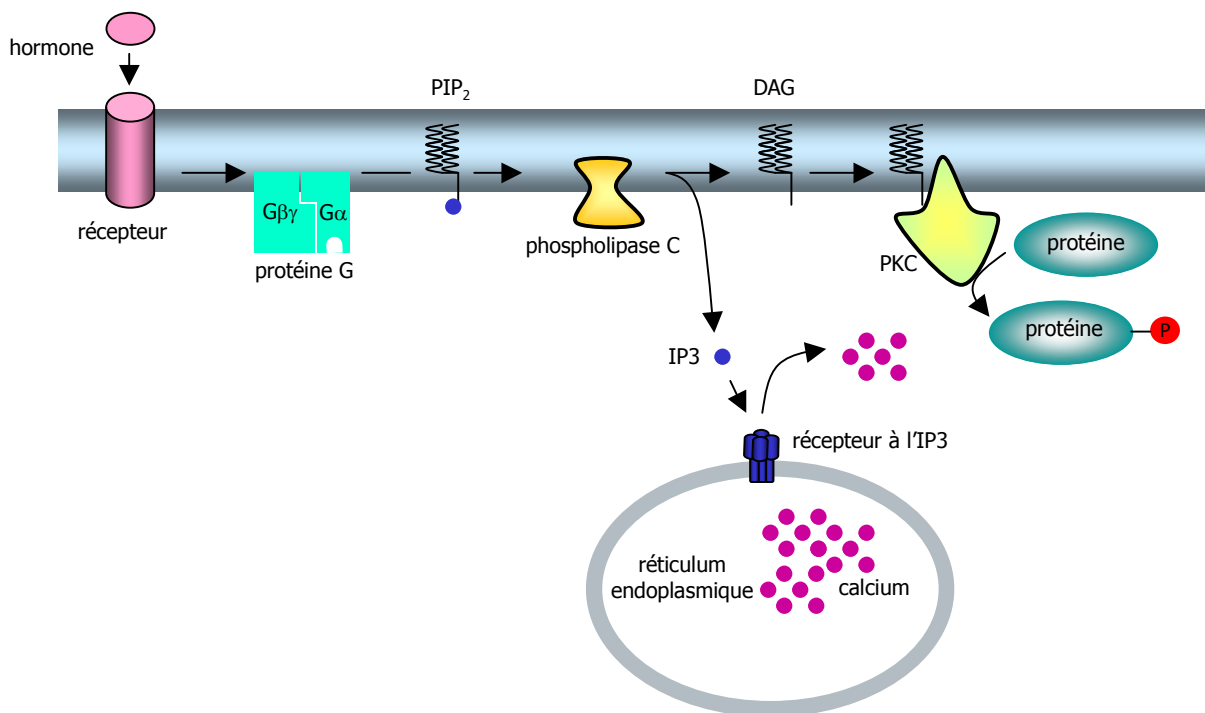
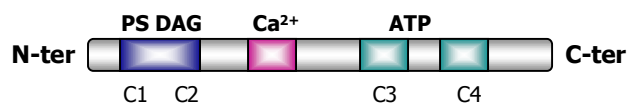


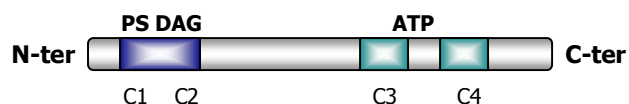
Figure 18 : Les différents types de PKC

La région N-terminale présente les domaines C1 (pouvant lier le DAG) et C2 (pouvant lier les phospholipides (PS)). La région C-terminale contient les domaines C3 et C4 impliqués dans la liaison du substrat et l'activité catalytique. Les PKC conventionnelles présentent également des résidus liant le calcium, les PKC atypiques sont incapables de lier le DAG.

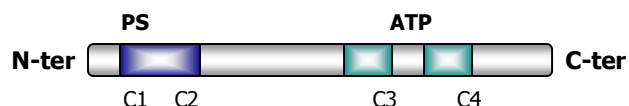
PKC conventionnelles (PKC α, βI, βII, γ)



PKC nouvelles (PKC δ, ε, η, θ)



PKC atypiques (PKC ζ, λ, ι)



reprise méiotique déclenchée par l'insuline ou $p21^{\text{Ras}}$ mais n'influence pas la reprise méiotique déclenchée par la progestérone (Garcia de Herreros et coll., 1991). La micro-injection de $p21^{\text{Ras}}$ déclenche la GVBD indépendamment de la PLC et de la PKC, seule la phospholipase D (PLD) semble impliquée (Carnero et coll., 1994).

III.1.2.2- La PKC

La famille des PKC regroupe différentes isoformes, classées en trois catégories selon la structure de leur domaine régulateur N-terminal (Sampson et Cooper, 2006 ; Figure 18). Dès les années 80, la présence d'une PKC activable par un analogue du DAG, le TPA, a été décrite dans les ovocytes de Xénope (Laurent et coll., 1988). Les ovocytes immatures contiennent les isoformes $PKC\alpha$, β , γ et ζ mais ne contiennent pas les formes δ et ε (Dominguez et coll., 1992).

Le rôle exact de la PKC lors de la reprise méiotique n'a pas été clarifié. L'incubation des ovocytes dans un milieu contenant des esters de phorbols, qui activent la PKC, entraîne la reprise méiotique selon certains auteurs (Stith et Maller, 1987 ; Pan et Coper, 1990) alors que pour d'autres, le traitement n'induit pas la maturation (Bément et Capco, 1990). La sphingosine ou la staurosporine, inhibiteurs de la PKC, retardent, voire inhibent, la GVBD stimulée par la progestérone (Varnold et Smith, 1990) alors que Stith et coll. (1992) observent l'effet inverse, la staurosporine potentialise l'effet maturant de la progestérone.

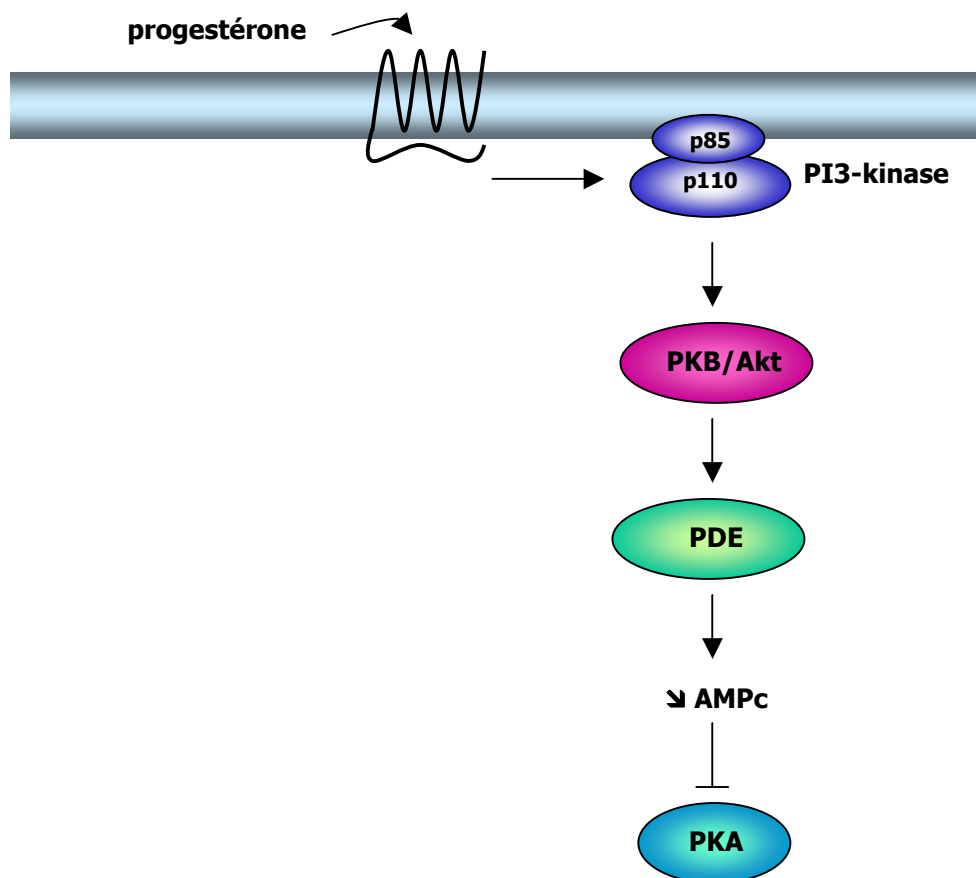
III.1.2.3- La PI3 kinase

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase), enzyme impliquée dans le métabolisme des phosphatidylinositols, serait également impliquée dans la reprise méiotique (Figure 19). Elle catalyse la phosphorylation des phosphoinositides en position D3 de l'inositol. *In vivo*, le produit majeur est le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Il existe quatre types de PI3 kinases (α , β , γ , δ) qui possèdent, en plus de leur activité lipide kinase, une activité protéine kinase au moins *in vitro* (Bondeva et coll., 1998 ; Roche et coll., 1998 ; Vanhaesebroeck et coll., 1999 ; Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999).

Certaines protéines présentent un domaine capable de lier le PIP3 comme la kinase 1 dépendante des phosphoinositides (PDK1) et la protéine kinase B (PKB-Akt). PDK1 est essentielle pour l'activation de PKB-Akt (Woodgett, 2005). La génération de PIP3 au niveau de la membrane induit le recrutement à proximité des protéines PDK1 et PKB-Akt. PKB-Akt subit une première phosphorylation par PDK2, ce qui induit un changement de conformation au niveau de son domaine protéine kinase. Ce changement de conformation facilite sa seconde phosphorylation qui se produit au niveau de son domaine T-loop par la PDK1. Les

Figure 19 : Activation de la voie PI3 kinase après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone

La PI3 kinase est une enzyme qui phosphoryle les phosphoinositides en position D3 de l'inositol pour former le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). La génération de PIP3 permet l'activation de la protéine kinase PKB-Akt. Cette dernière est capable d'activer la phosphodiesterase 3 (PDE3).



molécules de PKB-Akt biphosphorylées sont pleinement actives. La liaison de la PKB-Akt au PIP3 induit probablement un changement de conformation qui facilite la phosphorylation par PDK2 (pour revue, Woodgett, 2005). Les substrats de la PKB-Akt renferment différentes protéines pro-apoptotiques et des protéines sérine kinases désignées sous le nom de glycogène synthase kinase 3 (GSK-3). Ces dernières phosphorylent des facteurs de transcription, des protéines structurales et des enzymes du métabolisme (Cross et coll., 1995).

Les travaux concernant la PI3 kinase aboutissent à des résultats contradictoires. Des inhibiteurs de PI3 kinase, comme la wortmannine ou le LY294002, bloquent la reprise méiotique stimulée exclusivement par l'insuline selon certains auteurs (Liu et coll., 1995 ; Lopez-Hernandez et Santos, 1999), alors que pour d'autres, le LY294002 retarde la reprise méiotique induite par l'insuline et par la progestérone (Hehl et coll., 2001). L'inhibition de l'activation de la PI3 kinase endogène, par micro-injection du domaine SH2 de la sous-unité de 85 kDa, bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Muslin et coll., 1993a). Une étude a montré que, en absence de stimulation hormonale, la wortmannine déclenche la GVBD en activant la voie MAPK et le MPF mais cet effet ne serait pas dû à l'action de la wortmannine sur la PI3 kinase (Carnero et Lacal, 1998).

L'expression de la PI3 kinase γ provoque la GVBD ainsi que la phosphorylation de MAPK et de PKB/Akt. Cette action est dépendante de son activité lipide kinase (Hehl et coll., 2001). La micro-injection de PKB/Akt est capable, seule, d'entraîner la reprise méiotique en activant la phosphodiesterase 3 (PDE3) (Andersen et coll., 1998) bien qu'elle ne soit pas requise pour la maturation induite par la progestérone (Andersen et coll., 2003).

III.2- Stimulation par l'insuline

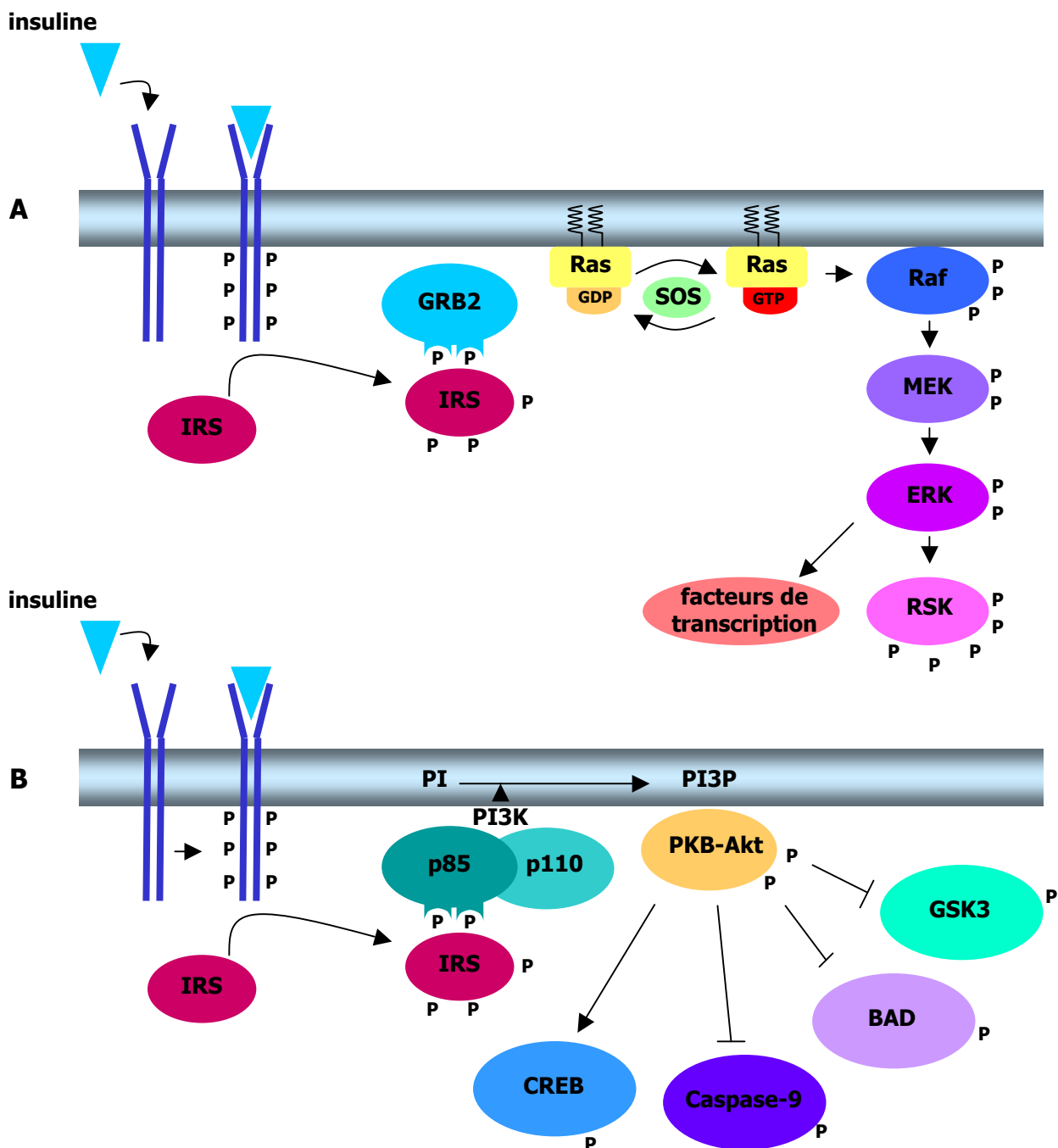
III.2.1- Rappel des voies de signalisation de l'insuline/IGF1 dans les cellules somatiques

Le récepteur à l'insuline est un membre de la superfamille des récepteurs tyrosine kinase qui inclut les récepteurs à l'IGF1 (IGFR) et les récepteurs à l'insuline (IRR ; Saltiel et Kahn, 2001). Le récepteur à l'insuline est une protéine tétramérique constituée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β . L'insuline lie la sous-unité α ce qui entraîne l'activation de la kinase de la sous-unité β , par transphosphorylation des résidus kinases des différentes régions de la portion cytoplasmique de la sous-unité β (White, 1988 ; Saltiel et Kahn, 2001).

Figure 20 : Principales voies de transduction activées par l'insuline

Les deux principales voies activées par l'insuline sont la voie MAPK (A) et la voie PKB-Akt (B). (A) Le domaine SH2 de Grb2 se lie à l'IRS phosphorylé. GRB2 se fixe à SOS, une protéine du cytoplasme pourvue d'une activité d'échange de nucléotides guanyliques. SOS se fixe au complexe p21^{Ras}-GDP et provoque la libération du GDP. p21^{Ras} fixe le GTP et le complexe p21^{Ras}-GTP se lie à Raf et le phosphoryle. Raf phosphoryle Mek qui à son tour phosphoryle Erk. Cette dernière phosphoryle différents substrats comme des facteurs de transcription ou Rsk.

(B) p85 contient deux domaines SH2 capables de lier l'IRS phosphorylé et d'entraîner l'activation de la sous-unité catalytique p110. La PI3 kinase transforme, par phosphorylation, les phosphoinositides (PI) en phosphatidylinositol 3 phosphate (PIP3). Le PIP3 induit l'activation de la PKB-Akt qui phosphoryle différentes protéines comme Bad, GSK3 ...



La transmission du signal généré par l'insuline fait intervenir plusieurs protéines intracellulaires, incluant la famille des substrats aux récepteurs à insuline (IRS) : IRS 1, IRS 2, IRS 3, IRS 4 (Figure 20). IRS 1 et IRS 2 sont les mieux caractérisés et les plus largement exprimés. IRS 3 est essentiellement au niveau des tissus adipeux. IRS 4 est exprimé essentiellement au niveau du thymus et du cerveau (White, 1988 ; Saltiel et Kahn, 2001).

L'association de la sous-unité p85 de la PI3 kinase avec la protéine IRS entraîne l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3 kinase. La sérine / thréonine kinase AKT est un des effecteurs majeurs en aval de la PI3 kinase. AKT phosphoryle différents substrats comme BAD ou la GSK-3 (White, 1988 ; Saltiel et Kahn, 2001).

L'insuline stimule également l'oncoprotéine p21^{Ras} qui active Raf, une Mek kinase et, en conséquence Mek-Erk (Kolch, 2000). p21^{Ras} appartient à la superfamille de petites protéines monomériques liant le GTP et possédant une activité GTPasique (Barbacid, 1987 ; Cantley et coll., 1991). 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). 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. Grb2 active ensuite 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 tyrosines 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., 1993).

III.2.2- La voie de signalisation à l'insuline/IGF1 dans l'ovocyte de Xénope

La phosphorylation des résidus tyrosines joue un rôle important lors de la stimulation de la reprise méiotique par l'insuline. La micro-injection d'anticorps anti-phosphotyrosine ou de tyrosine phosphatases bloque la reprise méiotique stimulée par l'insuline et par l'IGF1 (Cicirelli et coll., 1990 ; Hainaut et coll., 1991). Le récepteur IGFR1 a été cloné, il est identique à 76 % au récepteur humain de l'IGF1 et à 57 % au récepteur humain de l'insuline. Cette identité est maximale au niveau du domaine tyrosine kinase (Zhu et coll., 1998).

Dans l'ovocyte de Xénope, IRS1 relaie les effets de l'insuline et de l'IGF1 (Chuang et coll., 1993 a et b). Lorsque les ovocytes sont stimulés par l'insuline/IGF1, deux voies de

signalisation sont principalement activées : la voie de signalisation impliquant la PI3 kinase et celle impliquant p21^{Ras}.

La phosphorylation de IRS1 entraîne la liaison et l'activation de la PI3 kinase (Chuang et coll., 1993a; Lui et coll., 1995) qui est nécessaire pour la GVBD (Muslin et coll., 1993a; Liu et coll., 1995 ; Deuter-Reinhard et coll., 1997 ; Lopez-Hernandez et Santos, 1999). L'insuline/IGF1 ou la micro-injection de PI3 kinase dans les ovocytes entraîne l'activation de la protéine kinase PKB/Akt (Lopez-Hernandez et Santos, 1999 ; Hehl et coll., 2001). L'expression d'une forme constitutivement active de PKB/Akt suffit à induire la reprise méiotique (Andersen et coll., 1998). En présence d'insuline, l'activation de PKB/Akt est beaucoup plus rapide et importante qu'en présence de progestérone.

L'action de PKB/Akt serait relayée par l'activation de la PDE3 qui conduit à une diminution du taux intracellulaire d'AMP cyclique et donc, à une inhibition de la PKA (Andersen et coll., 2003). L'insuline et l'IGF1 diminuent la production d'AMPc en stimulant également l'activité des phosphodiésterases et en inhibant l'activité de l'adénylate cyclase (Sadler et Maller, 1987). Des inhibiteurs de phosphodiésterases, comme l'IBX, la théophylline ou la papavérine, bloquent la reprise méiotique stimulée par l'insuline ou l'IGF1 à des concentrations 17 à 60 fois inférieures à celles nécessaires pour obtenir le même résultat en progestérone (Sadler et Maller, 1989).

Outre la PI3 kinase, l'activation de l'IGFR1 conduit à l'activation de p21^{Ras} : l'insuline/IGF1 stimule l'association de p21^{Ras} endogène à la membrane plasmique (Davis et Sadler, 1992). La GVBD induite par l'insuline ou la micro-injection de p21^{Ras} requiert la PKC ζ (Dominguez et coll., 1992). En comparaison des cellules somatiques, l'activation de la voie MAPK stimulée par l'insuline, dans les ovocytes de Xénope, est dépendante de l'activation de p39^{Mos} (Baert et coll., 2003). Toutefois, la micro-injection d'une forme oncogénique de p21^{Ras} déclenche la GVBD en absence d'activation de MAPK (Dupré et coll., 2002) suggérant que l'insuline déclenche la reprise méiotique *via* l'activation de la PI3 kinase principalement.

Chapitre IV : Transcription et synthèse protéique au cours de la reprise méiotique

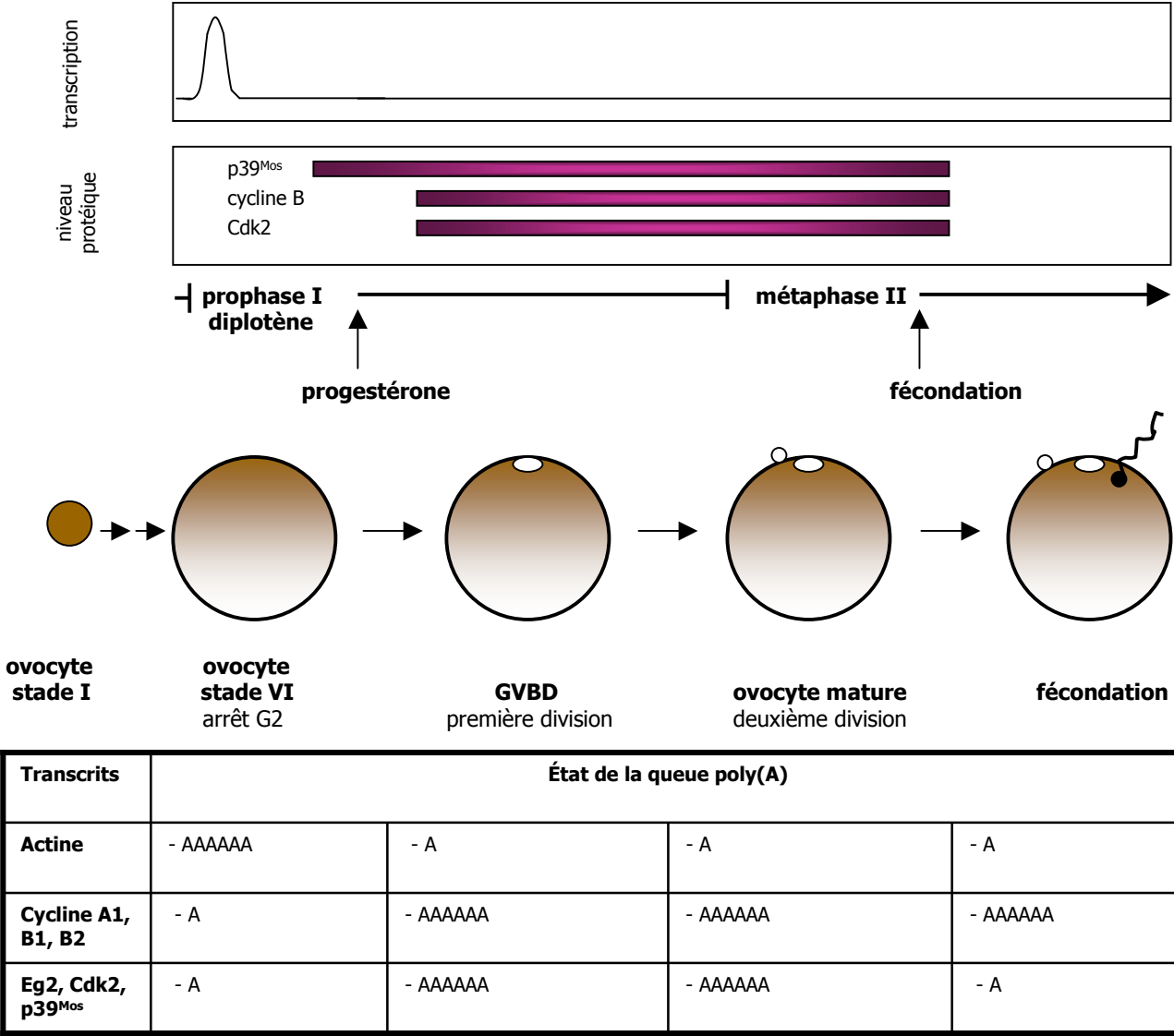
IV.1- La synthèse protéique

La transcription de nouveaux ARNm n'est pas nécessaire à la reprise méiotique : les ovocytes énucléés ou incubés en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, mûrent lorsqu'ils sont stimulés par la progestérone (Schorderet-Slatkine et Drury, 1973 ; Reynhout et Smith, 1974 ; Bodart et coll., 2002). Par contre, les voies activées par la progestérone et l'insuline requièrent la traduction des ARNm maternels. La cycloheximide, inhibiteur de synthèse protéique, bloque la reprise méiotique induite par la progestérone (Wasserman et Masui, 1975a) ou par l'insuline/IGF1 (El-Etr et coll., 1979). Le taux de synthèse protéique double dans les heures qui suivent l'application de la progestérone, augmentant de 17 à 35 ng/heure/ovocyte. Cette augmentation se produit également si la maturation est déclenchée par micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Dans ces conditions, l'augmentation de la synthèse protéique est quasiment instantanée (Wasserman et coll., 1981). La période de sensibilité à la cycloheximide s'arrête juste avant la GVBD, lorsque l'activation de MPF apparaît dans l'ovocyte (Wasserman et Masui, 1975a).

Des ARNm exogènes injectés dans des ovocytes de stade VI sont traduits au même niveau que les ARNm endogènes. Ces travaux suggèrent que la traduction est limitée, au moins en partie, par la machinerie de traduction (Laskey et coll., 1977 ; Richter et Smith, 1981). La quantité d'ARNm au niveau des polysomes double durant la reprise méiotique (Woodland, 1974). Cependant, dans les ovocytes de stade VI, la quantité de ribosomes est largement supérieure à la quantité nécessaire pour la traduction (Smith, 1986 ; Taylor et coll., 1985). Il est donc probable que certains facteurs empêchent le recrutement des ARNm au niveau des ribosomes (Richter et coll., 1982). L'augmentation de six à huit fois de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 coïncide avec l'augmentation de la synthèse protéique (Hanocq-Quertier et Baltus, 1981 ; Wasserman et Houle, 1984). D'autres facteurs pourraient également promouvoir la synthèse protéique, comme la disponibilité du facteur d'initiation eIF-4A qui pourrait être un facteur limitant dans l'ovocyte de Xénope (Audet et coll., 1987). Des études plus récentes démontrent que la polyadénylation des ARNm lors de la reprise méiotique est un processus essentiel dans le contrôle de la traduction des ARNm (Sheets et coll., 1995 ; de Moor et Richter, 2001 ; Mendez et Richter, 2001).

Figure 21 : Polyadénylation des ARNm et synthèse protéique durant la reprise méiotique

Durant la maturation, la synthèse de p39^{Mos} débute avant celles de la cycline B et de Cdk2. Les ARNm de p39^{Mos}, de Cdk2, des cyclines A1, B1 et B2 et des autres ARNm dormants dans les ovocytes de stades VI ont une queue poly(A) courte (- A). Rapidement après la stimulation de la maturation, la queue poly(A) s’allonge (- AAAAAA), ce qui permet la traduction des protéines. L’état de polyadénylation des différents ARNm varie au cours de la maturation (d’après Stebbins-Boaz et Richter, 1994).



IV.2- La polyadénylation des ARNm

La polyadénylation cytoplasmique des ARNm d'origine maternelle est un processus essentiel durant la reprise méiotique qui permet de réguler finement l'expression des protéines dans le temps et dans l'espace. Le contrôle traductionnel des ARNm est généralement corrélé avec un changement de la polyadénylation des ARNm (Richter, 1991). Durant la reprise méiotique, certains ARNm dormants voient leur queue poly(A) s'allonger d'une centaine de nucléotides permettant ainsi leur traduction (Huarte et coll., 1987 ; Vassalli et coll., 1989 ; Paris et Richter, 1990 ; Sheets et coll., 1994 ; Stebbins-Boaz et Richter, 1994 ; Figure 21).

Lors de la polyadénylation cytoplasmique, deux séquences agissent en *cis* dans la partie 3' UTR des ARNm : le signal de polyadénylation A₂UA₃ et le CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element). Le CPE, généralement localisé une cinquantaine de bases en amont du signal de polyadénylation, est riche en uridine (Mendez et Richter, 2001). Au moins trois facteurs agissent en *trans* : la PAP (Poly(A)Polymerase), le CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), et la CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein). Le complexe de polyadénylation fait intervenir d'autres facteurs qui peuvent influencer la polyadénylation.

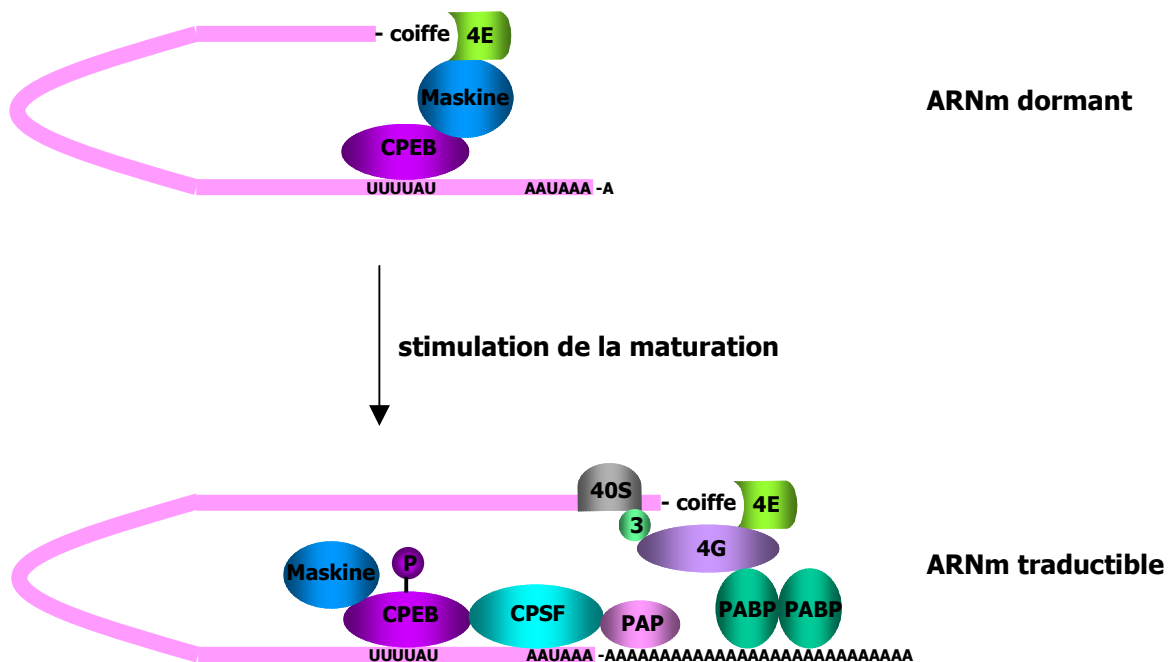
La répression de la traduction avant la stimulation de la reprise méiotique fait intervenir la Maskine. Cette protéine, liée à la coiffe, s'associe à la CPEB et au facteur eIF-4^E (Stebbins-Boaz et coll., 1999 ; Figure 22). L'interaction Maskine-eIF-4E prévient l'association du facteur eIF-4G avec eIF-4E, inhibant ainsi la traduction. La dissociation du complexe Maskine-eIF-4E, autorise le recrutement de eIF-4G, et coïncide avec la polyadénylation cytoplasmique (Stebbins-Boaz et coll., 1999).

En plus de la Maskine, une autre protéine, Pumilio, est également impliquée dans la répression de la traduction des ARNm. Pumilio appartient à un groupe de protéines qui lie les ARN. Conservé au cours de l'évolution, ce groupe de protéines a un rôle dans le contrôle transcriptionnel chez différents organismes (Kuersten et Goodwin, 2003 ; Crittenden et coll., 2003 ; Gu et coll., 2004). Le mode d'action de Pumilio est encore mal connu, mais de très récents travaux ont montré qu'il intervient dans la régulation de la traduction de Ringo (Wickens et coll., 2002).

La coiffe en 5' pourrait stimuler la traduction en facilitant le recrutement de la sous-unité ribosomale 40 S. La méthylation du ribose joue un rôle important dans l'activation de la traduction. L'inhibition de la méthylation par le S-isobutylthioadenosine, un inhibiteur

Figure 22 : Mécanisme de contrôle traductionnel des ARNm

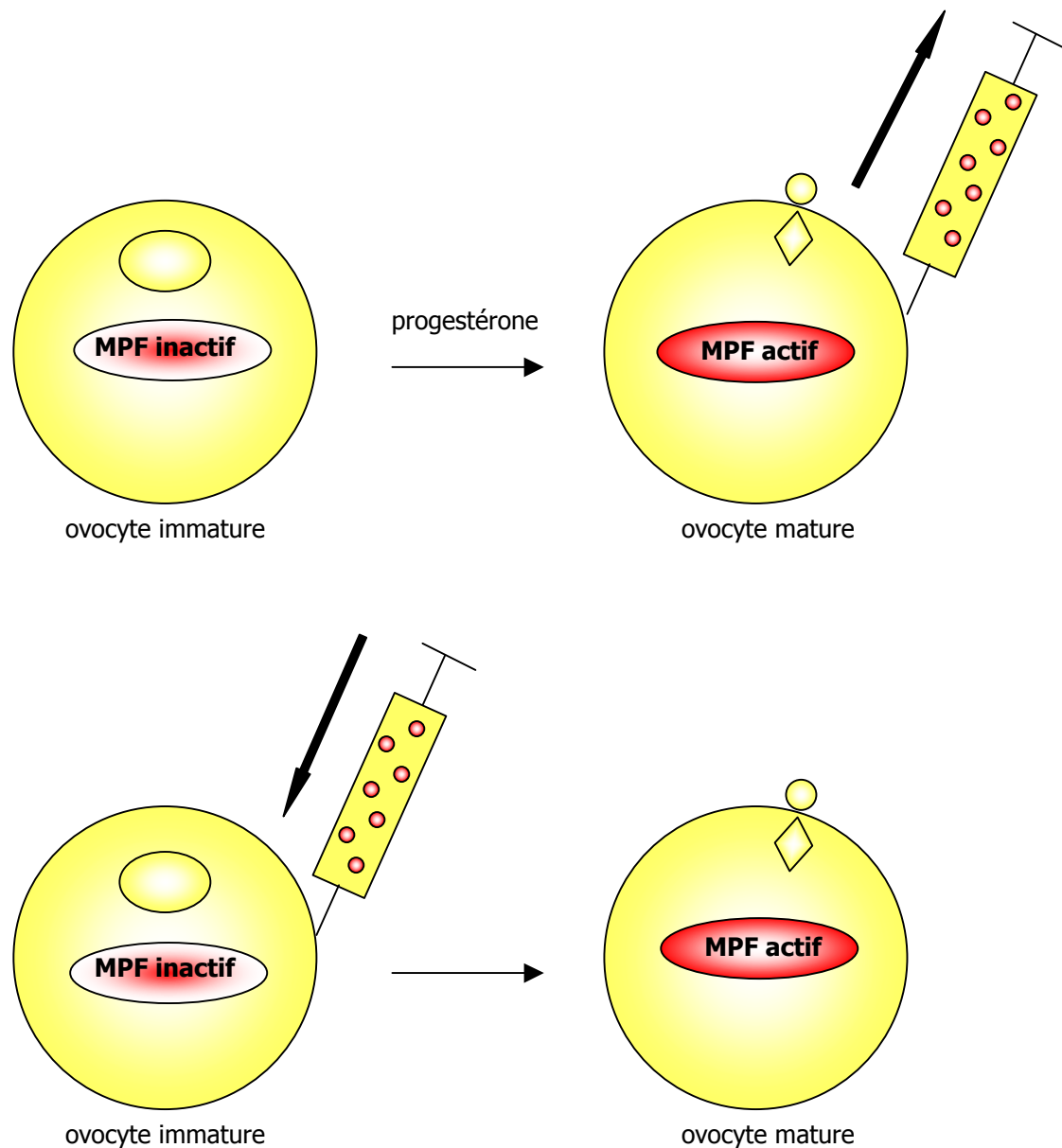
Dans les ovocytes immatures, les ARNm présentant un CPE au niveau de leur extrémité 3' UTR sont traductionnellement inactifs et forment un complexe avec la CPEB, la Maskine et le facteur eIF4E. Lorsque la maturation est stimulée, la phosphorylation de la CPEB permet le recrutement du CPSF et de la PAP, laquelle ajoute des adénosines au niveau de la queue poly(A). Simultanément à l'élongation de la queue poly(A), la Maskine se dissocie du facteur eIF4E. Il est probable que la dissociation maskine-eIF4E résulte de la formation d'un complexe plus stable entre la PABP et eIF4G que celui entre la Maskine et eIF4E. Le complexe entre la PABP et eIF4G permet l'assemblage de la sous-unité 40S et l'ouverture du cadre de lecture (d'après Mendez et Richter, 2001).



des méthyltransférase, a peu d'effet sur la polyadénylation de p39^{Mos} ou la synthèse protéique générale mais inhibe la synthèse de p39^{Mos} ainsi que la reprise méiotique (Kuge et coll., 1998). Le groupe N-7 méthyl de la coiffe serait également impliqué dans l'efficacité de la traduction probablement en favorisant la liaison au facteur eIF-4E (Both et coll., 1975a et b). Cependant, les travaux de Keiper et Rhoads (1997) suggèrent que la traduction des ARNm pourrait être indépendante de la coiffe ou du facteur eIF-4G.

Figure 23 : Mise en évidence du MPF

La micro-injection, dans un ovocyte immature bloqué en prophase I, de cytoplasme prélevé dans un ovocyte mature bloqué en métaphase II induit l'entrée en méiose de l'ovocyte micro-injecté. Cette expérience montre que le cytoplasme de l'ovocyte mature contient un composé diffusible, le MPF, suffisant pour induire l'entrée en méiose.



Chapitre V : Le MPF et les complexes Cdk/Cyc

V.1- Mise en évidence

Les expériences de transfert de cytoplasme d'ovocytes matures de *Rana pipiens* dans des ovocytes immatures receveurs ont démontré l'existence d'un facteur cytoplasmique : le MPF (Maturation Promoting Factor), capable d'induire l'entrée en méiose dans les ovocytes receveurs (Masui et Markert, 1971 ; Figure 23). Les expériences de micro-injections croisées entre ovocytes d'espèces différentes (Amphibiens, Souris, Etoile 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). D'une manière plus générale, ce même facteur a été identifié comme responsable de l'entrée en mitose (Sunkara et coll., 1979 ; Nelkin et coll., 1980).

V.2- Purification et identification

Mis en évidence en 1971, le MPF ne sera identifié et caractérisé précisément qu'en 1988. Le MPF est constitué principalement de deux sous-unités protéiques : une sous-unité catalytique, Cdk1 de 32 KDa, et une sous-unité régulatrice, la cycline de 45 KDa.

V.2.1- Cdk1

La purification a été mise en oeuvre pour la première fois dans les ovocytes de Xénope (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 orthologues de ce gène ont été retrouvés dans de nombreuses espèces. Ils codent des protéines très conservées dont la masse varie entre 32 et 34 kDa et qui contiennent toutes une séquence de 16 acides aminés renfermant un motif « PSTAIR ». Ces protéines sont des sérine / thréonine kinases. Cdk1, également appelée p34^{Cdc2}, a été clonée chez le Xénope (Milarski et coll., 1991). Cdk1 est le premier membre d'une famille de kinases dont l'activité nécessite leur liaison à une cycline (Doree et Hunt, 2002).

Figure 24 : Structure des cyclines B

Les cyclines possèdent trois domaines qui sont essentiels pour leur liaison avec les Cdk (cyclin box), pour leur localisation (signal de rétention cytoplasmique) et leur dégradation (destruction box). La « destruction box » est responsable de la dégradation de la cycline par le protéasome après avoir été ubiquitinylée.

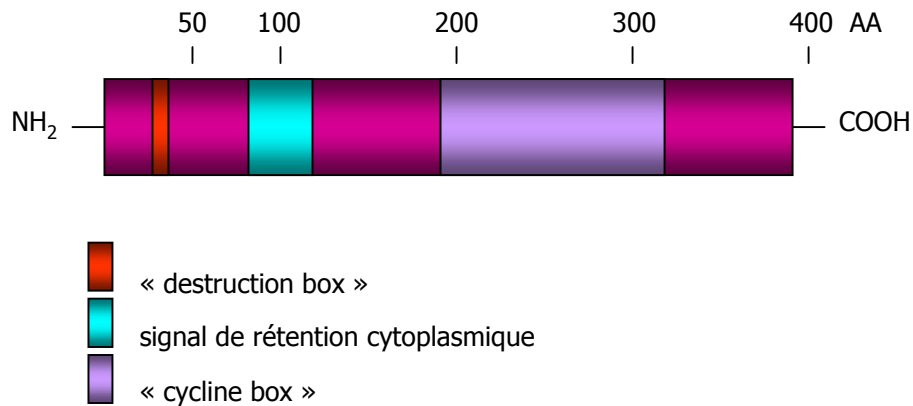
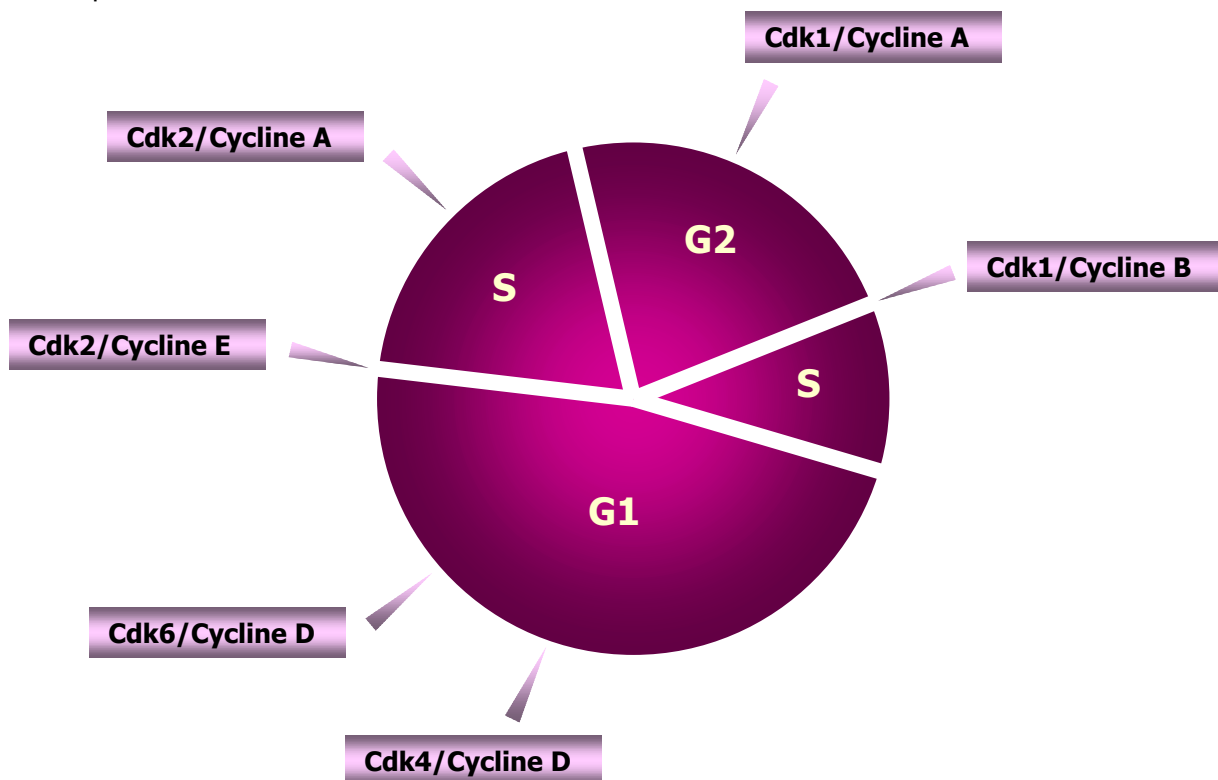


Figure 25 : Différents complexes Cdk/Cyc impliqués dans la régulation du cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, six complexes Cdk/Cyc interviennent à des moments précis du cycle cellulaire et assurent le passage d'une phase à l'autre. Chaque Cdk agit sur un substrat bien précis.



V.2.2- La cycline B

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 a été identifiée comme composant du MPF chez d'autres espèces dès 1989 (Minshull et coll., 1989).

Les premières cyclines 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 extraits cytoplasmiques d'œufs de Xénope, les niveaux de cycline B évoluent de manière cyclique (Murray et Kirschner, 1989). Si la synthèse protéique est inhibée, l'apparition cyclique des cyclines est supprimée. Par ailleurs, après un traitement à la RNase, l'activité MPF réapparaît de manière cyclique si l'ARNm de la cycline B d'Oursin est injecté.

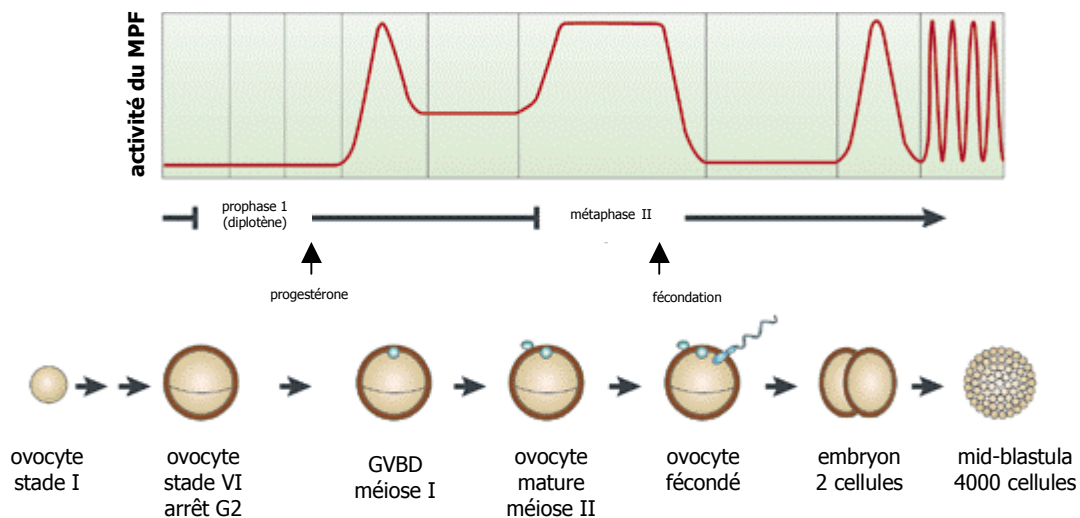
Les cyclines possèdent trois domaines essentiels (Figure 24):

- La « cyclin box » qui est une région consensus d'environ une centaine d'acides aminés localisée dans la moitié C-terminale de la protéine. Cette région intervient dans la liaison de la cycline B avec Cdk1.
- La « destruction box », située dans la partie N-terminale et qui consiste en une séquence de neuf résidus. Elle est requise pour la destruction de la protéine lors de la transition métaphase-anaphase.
- Un signal de rétention cytoplasmique, d'environ 40 résidus, localisé entre la « cyclin box » et la « destruction box ». Il serait responsable du maintien de la cycline B dans le cytoplasme lors de la phase G2 (Hunt, 1991 ; Pines et Hunter, 1994).

Le MPF est donc constitué par l'association de la cycline B et de Cdk1. De multiples complexes Cdk/Cyc sont impliqués dans les différentes phases du cycle cellulaire (Figure 25). Cdk1 porte l'activité kinasique alors que la cycline B a un rôle essentiellement régulateur. La cycline est également impliquée dans la spécificité du substrat et dans la localisation du complexe (Booher et coll., 1989). Actuellement, 14 types de cyclines (de A à L et T) ainsi que 11 Cdk sont connues. L'hétérodimère composé de Cdk1/Cyc B est le complexe universellement reconnu comme responsable de l'entrée et de la sortie de phase M.

Figure 26 : Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

Après la GVBD, l'activité du MPF décline transitoirement pour permettre la transition métaphase I/anaphase I et la sortie de la première méiose. Cette décroissance est insuffisante pour permettre l'entrée en interphase. Ensuite, son activité augmente rapidement lors de l'entrée en métaphase II et reste élevée dans l'ovocyte bloqué en métaphase II. La sortie de méiose II nécessite la chute de l'activité du MPF (d'après Mender et Richter, 2001).



V.3- Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique

L'activité du MPF est généralement mesurée par sa capacité à phosphoryler l'une de ses cibles : l'histone H1. L'activation du MPF déclenche l'entrée en phase M alors que la sortie de phase M nécessite son inactivation. L'activité du MPF n'est pas constante durant la méiose : lors de la transition métaphase - anaphase I, la diminution de l'activité H1 kinase est concomitante avec la sortie de la première division de méiose (Kobayashu et coll., 1991 ; Ohsumi et coll., 1994 ; Roy et coll., 1996 ; Gross et coll., 2000 ; Figure 26). 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 (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 du MPF reste élevée et ne disparaît qu'au moment de la fécondation, permettant la sortie de méiose II et la reformation de l'enveloppe nucléaire pour donner le pronucléus femelle (Lorca et coll., 1992).

V.4- Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique

Différentes protéines kinases ou protéines phosphatases, ainsi que des protéines nouvellement synthétisées, interviennent dans la régulation du MPF au cours de la maturation des ovocytes d'Amphibien (Figure 27).

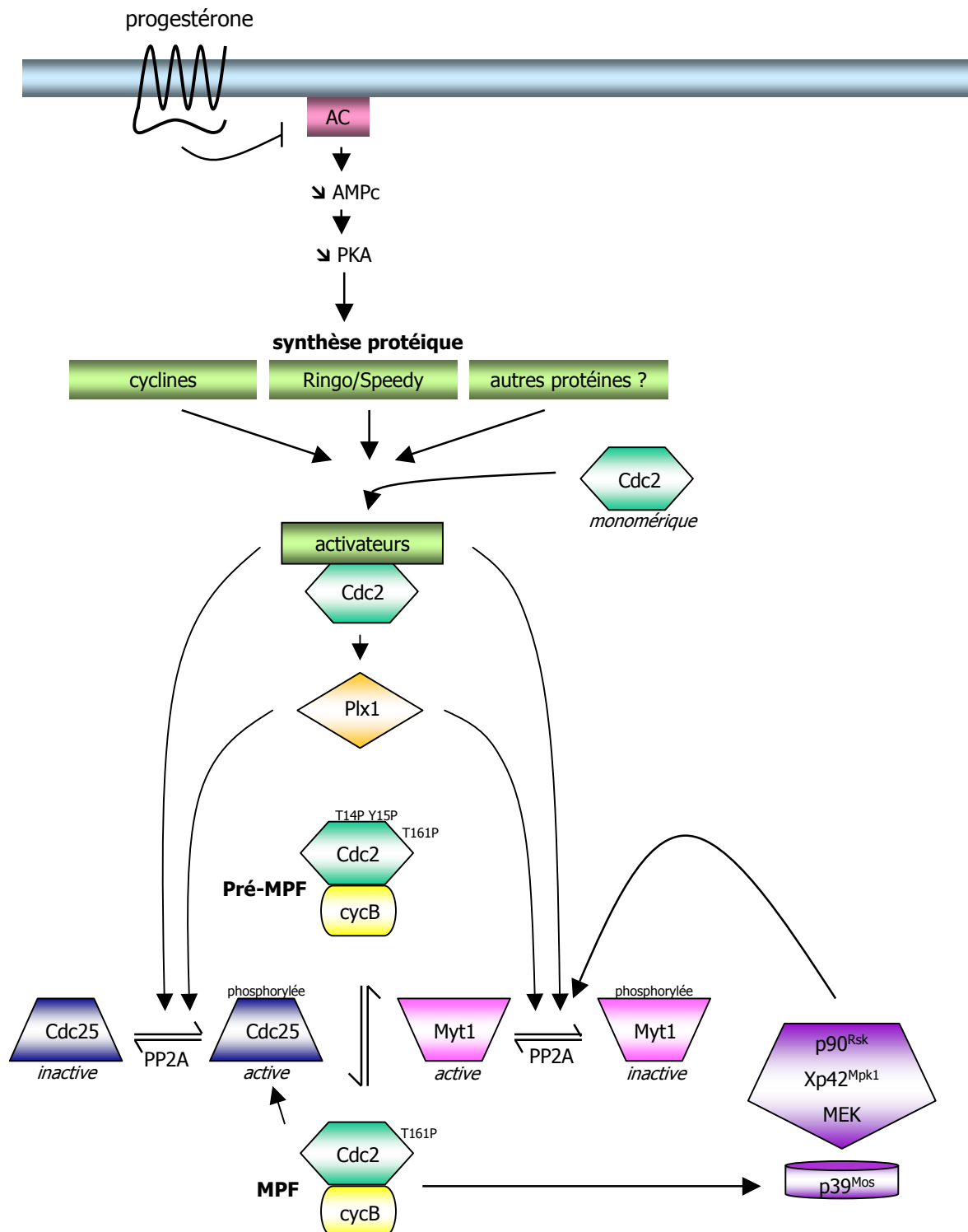
V.4.1- La CAK

La phosphorylation de Cdk1 sur le résidu thréonine 161 change sa conformation et facilite sa liaison avec la cycline (Jeffrey et coll., 1995 ; Paulovich et Hartwell, 1995). Elle a lieu en phase G2 et sa déphosphorylation, par la phosphatase KAP, nécessaire à l'inactivation de Cdk1, se produit après la dégradation de la cycline B (Lorca et coll., 1992 ; Hannon et coll., 1994 ; Poon et Hunter, 1995 ; Hanlon et Barford, 1998). La phosphorylation sur le résidu thréonine 161 est catalysée par une enzyme appelée CAK (Cdk Activating Kinase). La liaison de la cycline B à Cdk1 ne suffit pas à induire l'activité du MPF.

La CAK est constituée par le complexe Cyc H/Cdk7/Mat1 (Fesquet et coll., 1993 ; Poon et coll., 1993 ; Solomon et coll., 1993 ; Adamczewski et coll., 1996 ; Nigg, 1996). Cdk7, également appelé MO15, est la sous-unité catalytique (Solomon et coll., 1993) et la

Figure 27 : Mécanismes d'activation du MPF après stimulation par la progestérone

Suite à la stimulation par la progestérone, le niveau d'AMPc chute entraînant une diminution de l'activité de la PKA nécessaire à l'activation de Cdk1. La synthèse protéique est requise pour initier l'activation du MPF, trois protéines pourraient être impliquées: les cyclines, RINGO/Speedy et p39^{Mos}. L'activation d'une faible quantité de MPF serait suffisante pour déclencher la boucle d'auto-amplification du MPF par activation directe de Cdc25 et de la Plx1 et par inhibition de Myt1. De plus, le MPF actif est capable de stimuler la synthèse de p39^{Mos}, qui par une boucle de rétrocontrôle positif mettant en jeu Mek-Xp41^{Mpk1}-p90^{Rsk}, est capable d'inhiber Myt1 (modifié d'après Karaïskou et coll., 2001).



cycline H est la sous-unité régulatrice (Fisher et Morgan, 1994 ; Makela et coll., 1994). A la différence des autres cyclines, le taux de cycline H reste constant au cours du cycle cellulaire. Mat1 serait impliquée dans l'association de la cycline H avec Cdk7 et pourrait réguler l'activité de la CAK en jouant le rôle de facteur d'assemblage (Tassan et coll., 1994 ; Nigg, 1995). Après formation du complexe Cdk1/Cyc B, Ckk1 est phosphorylée sur 3 résidus : la thréonine 14, la tyrosine 15 et la thréonine 161.

V.4.2- Myt 1 et Wee 1

Dès sa synthèse, la cycline B interagit avec Cdk1 pour former le pré-MPF. Cdk1 est maintenue inactive par phosphorylation sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15. Ces résidus sont phosphorylés lorsque Cdk1 s'associe à la cycline B2 (Solomon et coll., 1990, 1992 ; Meijer et coll., 1991). Ces deux résidus sont situés au cœur du domaine de fixation de l'ATP de Cdk1 et leur phosphorylation inhibe la liaison de l'ATP (Gould et Nurse, 1989).

L'une des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de ces deux résidus est la kinase membranaire Myt 1 (Mueller et coll., 1995; Liu et coll., 1997; Palmer et coll., 1998). Myt 1 est présente dans les ovocytes dès le stade I et sa quantité augmente jusqu'au stade IV (Furuno et coll., 2003). Les interactions entre le complexe Cdk1/Cyc B et Myt 1 se feraient *via* le domaine C-terminal de Myt 1. Cette liaison serait responsable de la séquestration du complexe Cdk1/Cyc B par Myt 1 dans le cytoplasme (Wells et coll., 1999). Myt 1 est elle-même contrôlée par des phosphorylations qui empêchent son activité (Mueller et coll., 1995). Ces phosphorylations sont catalysées par deux membres de la voie Xp42^{Mpk1} de l'ovocyte : p39^{Mos} (Peter et coll., 2002) et p90^{Rsk} (Palmer et coll., 1998). Dans les ovocytes de l'Etoile de mer *Asterina pectinifera*, Myt 1 est également phosphorylée par PKB/Akt (Okumura et coll., 2002).

Une autre kinase inhibitrice, Wee 1, présente une forte homologie avec Myt 1. Elle est localisée dans le noyau et ne phosphoryle que le résidu tyrosine 15 de Cdk1 (Featherstone et Russell, 1991 ; Parker et coll., 1992 ; Booher et coll., 1993 ; Lee et coll., 1994 ; Watanabe et coll., 1995). La quantité de Wee 1 varie au cours de la croissance ovocytaire : présente dans le stade I de l'ovogenèse, elle diminue progressivement pour disparaître totalement dans l'ovocyte de stade VI (Nakajo et coll., 2000 ; Furuno et coll., 2003). Elle réapparaît une heure à une heure trente après la GVBD, puis durant la méiose II et les cycles de divisions embryonnaires précoces (Murakami et Vande Woude, 1998 ; Nakajo et coll., 2000). La surexpression de Wee 1 réduit fortement la GVBD lors d'une stimulation

par la progestérone. Dans ces ovocytes, la phosphorylation de la tyrosine 15 de Cdk1 est maintenue (Nakajo et coll., 2000).

V.4.3- Cdc25

Cdc25 est la phosphatase responsable de l'activation du MPF par déphosphorylation de Cdk1 sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15. Cdc25 est une phosphatase à double spécificité, capable de déphosphoryler des résidus sérine / thréonine et des résidus tyrosines (Dunphy et Kumagai, 1991 ; Gautier et Maller, 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1991 ; Strausfeld et coll., 1991). Trois types de protéines phosphatases Cdc25 ont été identifiées (A, B et C ; Nilsson et Hoffmann, 2000). Chez les mammifères, ces phosphatases sont relativement homologues dans leurs domaines C-terminal (Sadhu et coll., 1990 ; Galaktionov et Beach, 1991).

Les premiers travaux réalisés sur les phosphatases ont montré que chacune d'entre-elles est impliquée dans une étape précise du cycle. Des travaux récents ont précisé que les trois phosphatases jouent un rôle clef dans la transition G1/S et G2/M (Boutros et coll., 2006).

Trois isoformes fortement homologues ont été clonées chez le Xénope (Kumagai et Dunphy, 1991 ; Izumi et coll., 1992). La micro-injection d'une protéine recombinante Cdc25 (A, B ou C) provoque la reprise méiotique jusqu'en métaphase I (Izumi et coll., 1992 ; Hoffmann et coll., 1993 ; Rime et coll., 1994). L'activité de Cdc25 est régulée par son état de phosphorylation. Dans les ovocytes immatures bloqués en prophase I, Cdc25 est maintenue déphosphorylée et inactive par une phosphatase sensible à l'acide okadaïque : la phosphatase PP2A (Izumi et coll., 1992, Kumagai et Dunphy, 1992 ; Mueller et coll., 1995). Au cours de la phase M, Cdc25 est activée et hyperphosphorylée dans son domaine N-terminal par la kinase Plx1 (Polo-like kinase de *Xenopus* 1 ; Izumi et coll., 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1996 ; Qian et coll., 1998a).

La micro-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). Cependant, la micro-injection de Cdc25 restaure les effets délétères de la micro-injection d'anticorps anti-Plx1. L'activité de Plx1, régulée par phosphorylation, est sous le contrôle de la kinase Plkk1 (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.

Cdc25 peut également interagir avec des protéines régulatrices. La phosphorylation de Cdc25 sur le résidu sérine 287 lie cette phosphatase aux protéines 14-3-3, ce qui provoque sa séquestration et son inhibition (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 sérine 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 sérine 287 de Cdc25 (Hutchins et coll., 2002; Margolis et coll., 2003).

V.4.4- Synthèse et dégradation de la cycline B

La liaison de la cycline B génère un changement de conformation qui démasque le site catalytique de Cdk1 et favorise son activité sérine / thréonine kinase (De Bondt et coll., 1993). Dans les ovocytes arrêtés en prophase I, environ 10 % des Cdk1 sont associées avec le stock maternel de cyclines B (essentiellement les cyclines B2 et B5). Cdk1 est phosphorylée sur le résidu thréonine 161, mais elle est maintenue inactive par phosphorylation sur les résidus tyrosine 15 et thréonine 14. 90% du stock de Cdk1 est sous forme libre, présentant une activité kinasique faible (Lorca et coll., 1992). Son activité dépend de sa liaison avec la cycline B ainsi que des modifications de son état de phosphorylation (Solomon et coll., 1992 ; Solomon, 1993, 1994). Toutes les cyclines s'associent avec les Cdk par l'intermédiaire de la région « cyclin box » (Nugent et coll., 1991; Kobayashi et coll., 1992; Lees et Harlow, 1993). La micro-injection de ce domaine de liaison est suffisante pour induire la reprise méiotique des ovocytes de Xénope (Lees et Harlow, 1993). La partie N-terminale de la « cyclin box » stabilise le complexe Cdk/Cyc (Endicott et coll., 1999).

Cinq types de cyclines B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Minshull et coll., 1989 ; Brandeis et coll., 1998), et deux sous-types de cyclines, les cyclines B1 et B2, sont majoritairement présents dans les ovocytes et les embryons de Xénope (Minshull et coll., 1990 ; Kobayashi et coll., 1991). La cycline B2 est présente dès le stade I. Sa quantité augmente fortement à partir du stade IV (Furuno et coll., 2003). Les cyclines B2 et B5 sont stockées dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF. En présence de progestérone, les cyclines B1 et B4 sont synthétisées *de novo* juste avant la GVBD (Kobayashi et coll., 1991; Rime et coll., 1994; Hocheegger 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). La synthèse des cyclines B1 et B4 se fait en deux phases : la première juste avant la GVBD et la seconde, de plus grande importance, en métaphase II (Kobayashi et coll., 1991 ; 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 phosphorylation de la séquence d'export nucléaire située dans la partie N-terminale de la cycline B est nécessaire, d'une part, pour l'accumulation de la cycline B dans la vésicule germinative et d'autre part, pour l'activité du complexe Cdk1/Cyc B1 (Pines et Hunter, 1994 ; Yang et coll., 1998 ; Hagting et coll., 1999), ainsi que du complexe Cdk1/Cyc B2 (Yoshitome et coll., 1998). Le MPF est responsable de la phosphorylation de la cycline B intracomplexe chez l'Etoile de mer (Borgne et coll., 1999). Dans l'ovocyte de Xénope, la phosphorylation de la cycline B se produit au même moment que l'activation du MPF (Minshull et coll., 1991). *In vivo*, Cdk1 phosphoryle la cycline B2 sur son résidu sérine 90 (Gautier et coll., 1990 ; Izumi et Maller, 1991). Une forme particulière de la Calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase II (CaMKII), appelée Cyk, a été identifiée dans les ovocytes. Cette kinase, impliquée dans la phosphorylation de la cycline B2, est activée avant le MPF. Elle phosphoryle, *in vitro*, la cycline B2 sur les résidus thréonine 41 et sérine 53. Cependant, une mutation inhibitrice ou activatrice de ces sites de phosphorylation ne révèle aucune implication de la phosphorylation dans la reprise méiotique ou la dégradation de la cycline (Derua et coll., 1997 ; Stevens et coll., 1999).

La quantité de cycline B stockée dans les ovocytes immatures, sous forme de pré-MPF, est suffisante pour permettre la GVBD, indépendamment de la synthèse de nouvelles cyclines. La micro-injection d'antisens empêchant la synthèse des cyclines B1 et B2 n'inhibe pas l'activation du MPF induite par la progestérone (Minshull et coll., 1991). En accord avec ces résultats, Hochegger et coll. (2001) ont montré que la micro-injection d'oligonucléotides antisens ciblant spécifiquement les cyclines B1, B2, B4, B5 ne bloque pas le recrutement du MPF et la GVBD en réponse à la progestérone. Cependant, dans les ovocytes de Xénope, la micro-injection de cyclines A ou B, sous forme d'ARNm ou de protéines, est suffisante pour induire 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). Ainsi, en réponse à la progestérone, la formation de nouveau complexe MPF actif par association de Cdk1 monomérique et de cycline nouvellement formée pourrait

jouer un rôle important dans le recrutement du stock de pré-MPF et dans l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF.

La quantité de cyclines B et l'activité H1 kinase diminuent de 50 à 70% entre les deux divisions de méiose (Kobayashi et coll., 1991 ; Ohsumi et coll., 1994 ; Roy et coll., 1996 ; Gross et coll., 2000). Cependant, 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). La présence de formes non dégradables de la cycline B empêche la sortie en phase M dans des extraits d'œufs non fécondés de Xénope (Murray et coll., 1989).

L'ubiquitine ligase qui est impliquée dans la transition métaphase-anaphase est l'APC (Anaphase Promoting Complex). Son activation 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., 1998 a et b; 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. 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'ubiquitinylation est réalisée par l'interaction d'une ubiquitine-ligase avec une séquence consensus, la « destruction box ». La délétion des 90 acides aminés N-terminaux ou des mutations de la « destruction box » empêchent la dégradation de la cycline. La micro-injection d'une forme non dégradable de cycline B dans les ovocytes de Xénope déclenche la reprise de la méiose mais les ovocytes restent bloqués en métaphase I (Huchon et coll., 1993).

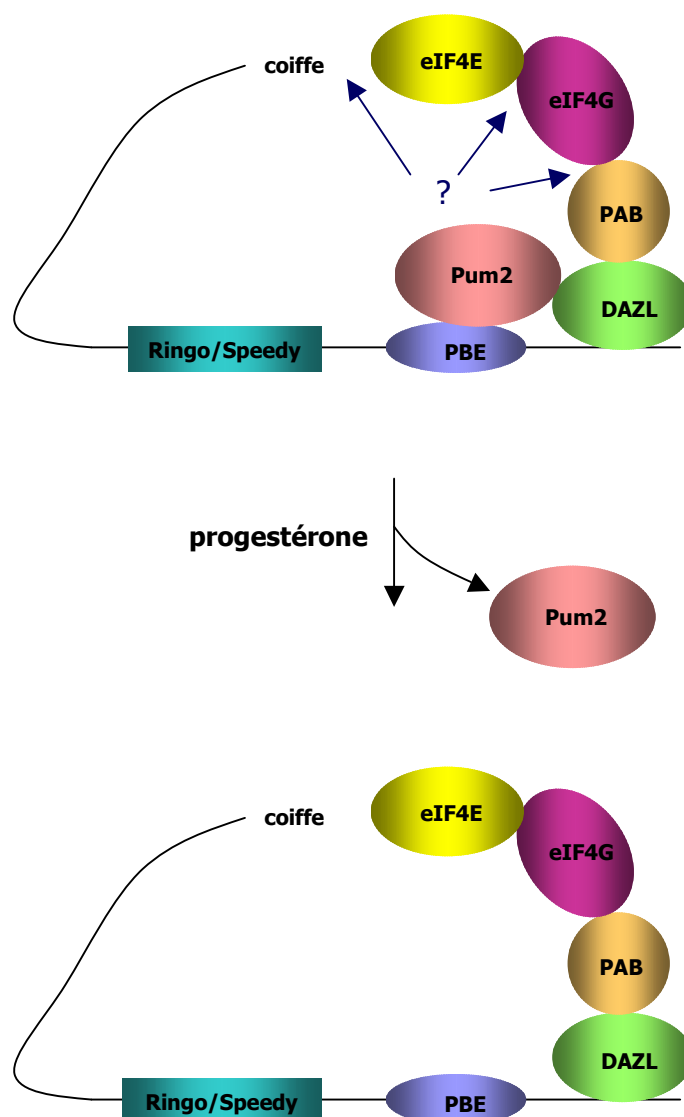
V.4.5- Protéines associées à Cdk1

V.4.5.1- Xe-p9

p13^{Suc1} est la première molécule associée au MPF qui a été identifiée chez la levure fissionnaire. Elle porte le nom de Cks1 chez la levure bourgeonnante. *In vitro*, cette protéine se lie à Cdk1 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). Elle facilite la phosphorylation de Cdc25, Myt 1 et Wee 1 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

Figure 28 : Régulation de la traduction de l'ARNm de Ringo/Speedy par Pum 2

Dans les ovocytes immatures, Pum2 lie le PBE et interagit également avec DAZL, une protéine liant les ARNm, et la PAB. Le complexe peut également contenir le facteur eIF4G, protéine importante pour le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'ARNm, ou le facteur eIF4E qui lie la coiffe. Pum2 inhibe la traduction de l'ARNm de Ringo/Speedy en interférant ou en modifiant l'interaction entre la coiffe et eIF4E, ou l'interaction entre eIF4E et eIF4G ou l'interaction entre eIF4G et la PAB. Suite à la stimulation par la progestérone, Pum2 se dissocie du complexe permettant la traduction de l'ARNm Ringo/Speedy (d'après Padmananbhan et Richter, 2006).



(Patra et Dunphy, 1998). Ainsi, Xe-p9 semble impliquée dans la dégradation de la cycline B par l'APC (Patra et Dunphy, 1998).

V.4.5.2- Ringo/Speedy

La protéine Ringo, également 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). Ringo se lie à Cdk1 monomérique et l'active tandis qu'elle est incapable de se fixer à Cdk1 lorsque celle-ci est associée à la cycline B (Ferby et coll., 1999 ; Lenormand et coll., 1999 ; Karaïskou et coll., 2001). Cette activation de Cdk1 est indépendante de la phosphorylation du résidu thréonine 161 (Karaïskou et coll., 2001). Ainsi en réponse à la progestérone, Ringo nouvellement formée pourrait lier Cdk1 libre monomérique présente en excès dans les ovocytes arrêtés en prophase I (Rempel et coll., 1995). Les complexes Cdk1-Ringo pourraient permettre d'acquérir directement une activité kinasique en réponse à la progestérone et d'amplifier la quantité initiale de MPF actif.

L'ARNm Ringo est rapidement traduit dès la stimulation de la reprise méiotique. La répression de l'ARNm Ringo est due à la présence de deux PBE (Pumilio-Binding Elements) putatifs dans la région 3' de l'UTR qui permettent la liaison de Pumilio 2 (Pum2), un membre de la famille des protéines PUF (Wickens et coll., 2002). Pum2 interagit également avec DAZL, une protéine liant l'ARNm et la PABP (Figure 28). En réponse à la progestérone, Pum2 se dissocie du complexe et l'ARNm de Ringo est traduit (Padmanabhan et Richter, 2006).

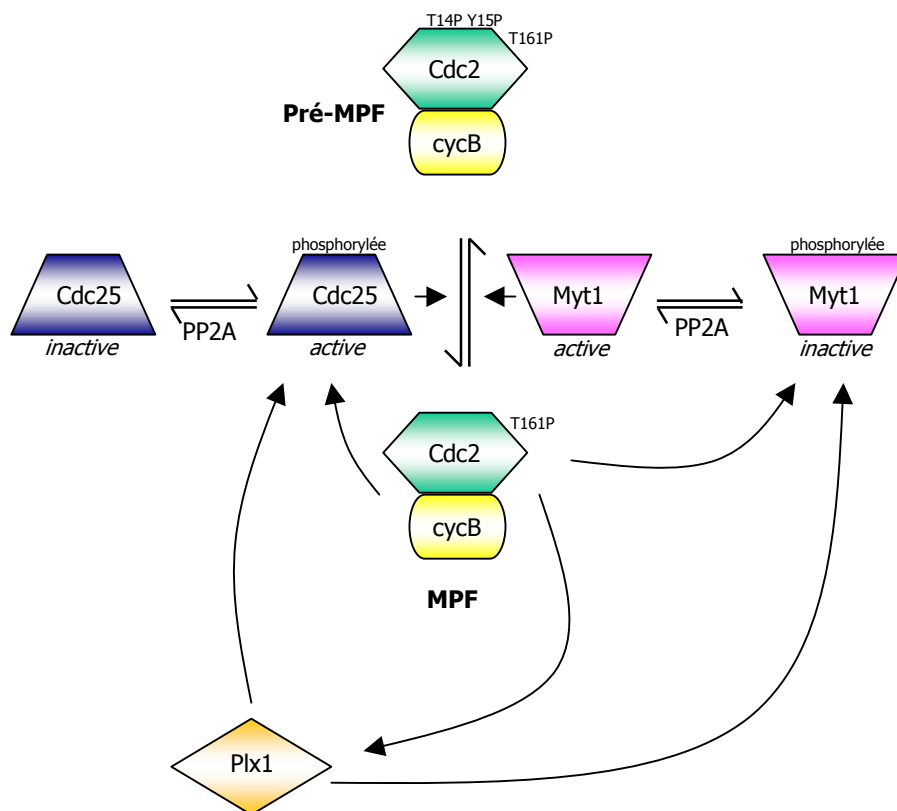
La micro-injection de Ringo dans des ovocytes immatures entraîne les activations du MPF et de la voie MAPK et la GVBD en absence de stimulation hormonale. La micro-injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm Ringo bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Ferby et coll., 1999 ; Lenormand et coll., 1999). Toutefois, le rôle physiologique exact de cette protéine dans la reprise méiotique reste à déterminer.

V .5- La boucle d'auto-amplification du MPF

La micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures, contenant du MPF actif, dans un ovocyte immature arrêté en prophase I, est suffisant pour induire la reprise méiotique, même en présence d'inhibiteur de synthèse protéique (Reynhout et Smith, 1974 ; Wasserman et Masui, 1975a). La réalisation d'une série de transferts est également possible, l'ovocyte receveur devenant l'ovocyte donneur, a permis de mettre en évidence le caractère auto-catalytique du processus d'auto-amplification du MPF (Masui et Markert, 1971). Certains traitements qui aboutissent à l'activation d'une petite quantité de pré-MPF sont suffisants

Figure 29 : Processus d'auto-amplification du MPF

La boucle d'auto-amplification a été initialement décrite pour son caractère auto-catalytique. Le MPF actif est capable d'activer, par phosphorylation, directement deux protéines : la Plx1 et Cdc25 qui contribuent, en retour, à l'activation du pré-MPF. De plus, le MPF et la Plx1 sont capables d'inhiber, par phosphorylation, Myt1, un inhibiteur du MPF.



pour déclencher l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF et l'entrée en méiose : la micro-injection de Cdc25 ou la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures (qui activent directement le pré-MPF), la micro-injection de Ringo (qui lie et active les molécules de Cdk1) et la micro-injection d'acide okadaïque (qui inhibe PP1/PP2A) (Bialojan et Takai, 1988 ; Goris et coll., 1989 ; Ferby et coll., 1999 ; Rime et coll., 1994 ; Taieb et coll., 1997, Lenormand et coll., 1999). Dès la mise en évidence la présence d'une activation auto-catalytique du MPF par Masui et Markert (1971), des mécanismes moléculaires ont été proposés afin d'expliquer les propriétés auto-catalytiques du MPF actif (Figure 29).

En prophase I, le pré-MPF est maintenu inactif par deux phosphorylations inhibitrices sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15, sous le contrôle d'une kinase Myt 1 active et d'une phosphatase Cdc25 inactive (Gautier et coll., 1989 ; Izumi et coll., 1992 ; Jessus et coll., 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1992 ; Mueller et coll., 1995 ; Murakami et Vande-Woude, 1998). Myt 1 et Cdc25 sont hypophosphorylées, leur niveau de phosphorylation étant probablement contrôlé par PP2A (Izumi et coll., 1992 ; Jessus et coll., 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1992 ; Mueller et coll., 1995). Le stock de pré-MPF peut-être directement activé par déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 par la phosphatase Cdc25. Juste avant l'entrée en phase M, Cdc25 et Myt 1 deviennent hyperphosphorylées, Cdc25 est alors fonctionnelle et active tandis que Myt 1 est inhibée (Izumi et coll., 1992 ; Kumagai et Dunphy, 1992 ; Mueller et coll., 1995). L'action de la PP2A est probablement sous régulée en présence de la progestérone.

La phosphorylation de Cdc25 est contrôlée au moins par deux kinases : Cdk1 et Plx1 (Izumi et Maller, 1993, Karaïskou et coll., 1999 ; Kumagai et Dunphy, 1996). *In vitro*, le MPF phosphoryle et active Cdc25 sur au moins cinq résidus situés dans la partie N-terminale régulatrice : les thréonines 48, 67 et 138 et les sérines 205 et 285 (Hoffmann et coll., 1993 ; Izumi et Maller, 1993 ; Strausfeld et coll., 1994). La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'auto-amplification 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 micro-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). De plus, l'activation et l'auto-amplification du MPF nécessite la présence de Plx1. Dans les ovocytes de Xénope, l'activité de Plx1 pourrait être sous le contrôle de Cdk1 lui-même (Abrieu et coll., 1998 ; Karaïskou et coll., 1999 ; Qian et coll., 2001).

L'hyperphosphorylation de Myt 1 pourrait être régulée par une voie similaire à Cdc25. La kinase Cdk1 phosphoryle Myt 1 *in vitro* (Booher et coll., 1997). Il a été montré que

l'homologue de Plx1, chez la levure, peut former un complexe avec Wee 1 juste avant l'entrée en phase M (Bartholomew et coll., 2001).

La traduction des ARNm est nécessaire pour la reprise méiotique induite par la progestérone, elle joue un rôle essentiel pour l'initiation de l'activation du MPF. Cependant, l'activation de la boucle d'auto-amplification est indépendante de la synthèse protéique (Wasserman et Masui, 1975a). L'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF constitue la deuxième étape de l'activation de la voie MPF. La synthèse de nouvelles protéines impliquées dans l'activation de MPF dépend de deux critères : leur synthèse ou leur accumulation prend place avant ou indépendamment de l'activation du MPF et pourrait être contrôlée par la diminution de l'AMPc. Certaines protéines sont considérées comme essentielles : les cyclines (Frank-Vaillant, 1999 ; Rime et coll., 1992), Ringo (Ferby et coll., 1999 ; Lenormand et coll., 1999) fournissant ainsi une petite quantité de MPF actif capable de déclencher la boucle d'auto-amplification, et l'accumulation de p39^{Mos} qui conduit à l'activation de la cascade MAPK (Nebreda et Hunt, 1993 ; Posada et coll., 1993). Cette dernière voie, lorsqu'elle est activée indépendamment, peut déclencher l'activation du MPF (Sagata et coll., 1988 ; Haccard et coll., 1995 ; Huang et coll., 1995 ; Sagata et coll., 1989a). Elle soutient l'activation du MPF en inhibant Myt1 *via* la phosphorylation de cette protéine par p90^{Rsk} (Palmer et coll., 1998).

V.6- Cibles du MPF

La phosphorylation de différents substrats par le MPF est requise pour les événements cytologiques de la reprise méiotique et d'une manière plus générale, pour l'entrée en phase M. Le MPF est capable de phosphoryler de nombreux substrats mais nous ne détaillerons que les principaux.

V.6.1- La CPEB

Le MPF contrôle la synthèse protéique par l'intermédiaire de la voie CPEB. Après la phosphorylation précoce de la CPEB par Aurora A/Eg2, la CPEB subit une deuxième vague de phosphorylation par Cdk1 (Paris et coll., 1991; Hake et Richter, 1994; De Moor et Richter, 1997). Cette dernière se produit sur le résidu sérine 210 et cible la CPEB pour la dégradation (Hake et Richter, 1994) ou régule son association avec d'autres protéines comme la Maskine (Stebbins-Boaz et coll., 1999). La destruction de la CPEB est nécessaire pour la

polyadénylation et la traduction des ARNm tardifs comme la cycline B1 ou l'histone H4 (Mendez et coll., 2002 ; Figure 23).

V.6.2- Facteur d'élongation EF1

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

V.6.3- Les lamines

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 Cdk1 (Peter et coll., 1990). Ces sites peuvent également être phosphorylés par les MAPK (Peter et coll., 1992). Cependant, la phosphorylation des lamines par Cdk1 n'est pas suffisante. Dans des extraits acellulaires, des noyaux interphasiques ne subissent pas la GVBD, même si les lamines sont phosphorylées par du MPF purifié (Peter et coll., 1990).

V.6.4- Les histones

L'activité histone H1 kinase, associée à l'activité du MPF, augmente fortement avant l'entrée en phase M. Le MPF phosphoryle l'histone H1 *in vitro* et *in vivo* (Guo et 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).

V.6.5- LES MAPs

Le MPF est associé aux microtubules par l'intermédiaire de Map4 (Microtubule-Associated Proteins 4 ; Fellous et coll., 1994 ; Ookata et coll., 1995). *In vitro*, Cdk1 régule la vitesse d'élongation des microtubules (Verde et coll., 1990 ; Verde et coll., 1992). Cdk1 phosphoryle Map4 et inhibe ainsi son activité stabilisatrice des

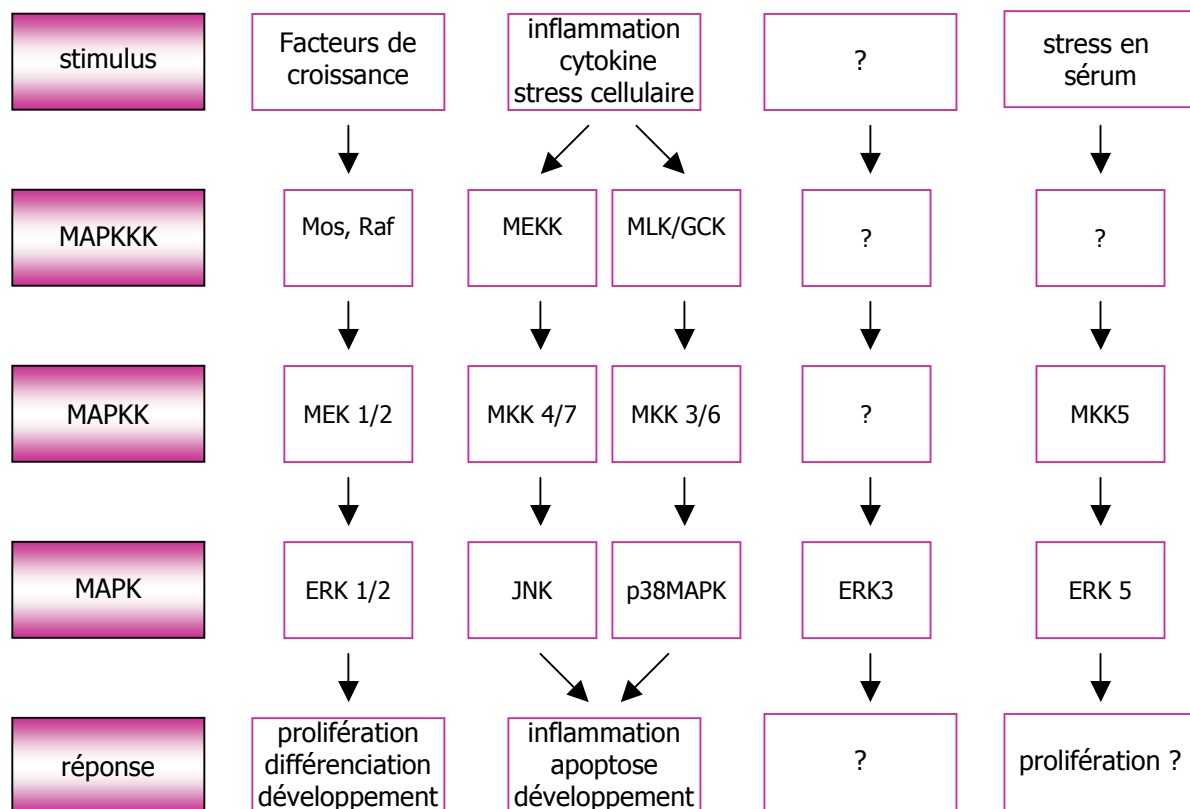
microtubules. Néanmoins Map4 ne perd pas sa capacité de fixation aux microtubules, ce qui maintient la localisation du MPF au niveau du fuseau de division (Ookata et coll., 1995).

L'association de Cdk1 à d'autres MAPs n'est pas exclue. Le MPF phosphoryle également Map2 (Faruki et coll., 1992 ; Itoh et coll., 1997) ce qui entraîne d'une part, une diminution de la capacité de fixation de Map2 sur la tubuline et d'autre part, une diminution de la polymérisation des microtubules (Burns et coll., 1984).

XMap215 est aussi phosphorylée *in vitro* par Cdk1 (Vasquez et coll., 1999). Toutes ces MAPs peuvent être phosphorylées par les MAPK.

Figure 30 : Différentes voies MAPK dans la cellule

Les différentes voies MAP kinases sont constituées de trois modules qui sont séquentiellement activées par phosphorylation. Lorsque la MAPK est activée, elle phosphoryle différentes cibles comme des facteurs de transcription, des kinases... Chaque voie MAP kinase induit préférentiellement une réponse cellulaire comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation en réponse à un stimulus particulier (Modifié d'après Cook et coll., 2000 et Tanoue et Nishida, 2003).



Chapitre VI : Les voies MAPK

VI.1- Généralités

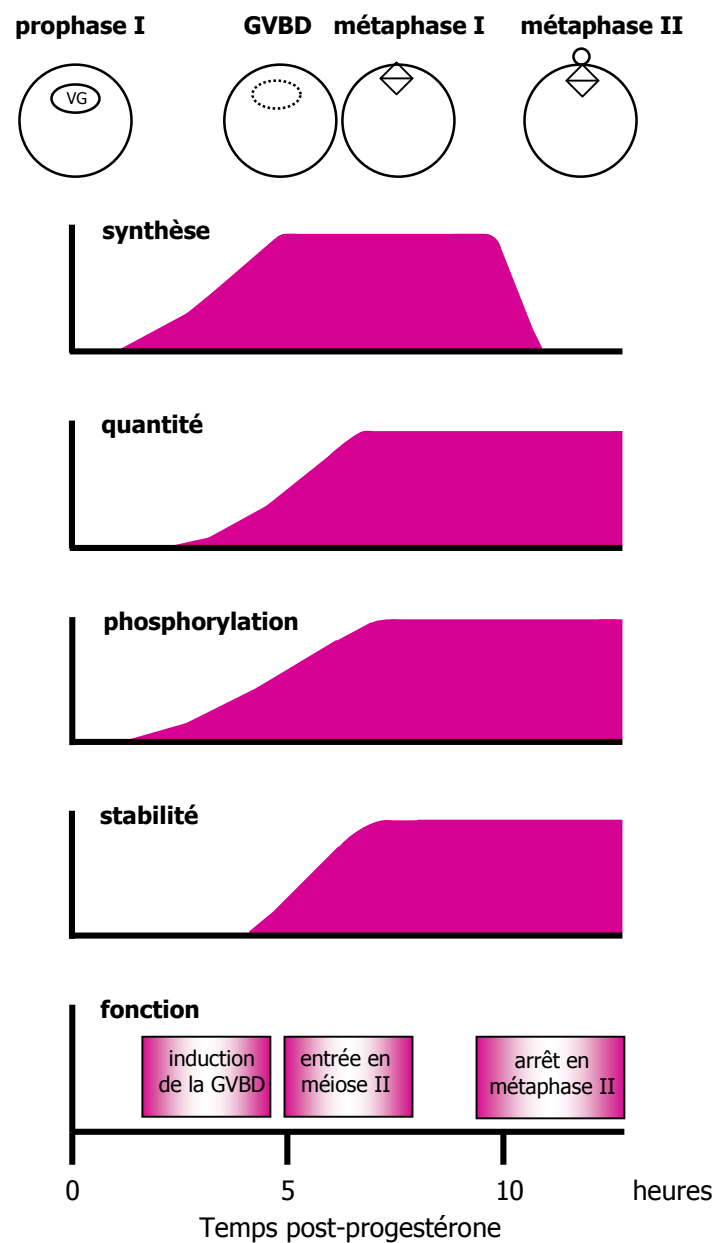
Chez les eucaryotes, les MAPK ont été fortement conservées au cours de l'évolution, de la levure aux mammifères. Ces enzymes appartiennent à la grande famille des sérine / thréonine kinases et fonctionnent en cascades. Elles sont activées par de multiples signaux tels que des facteurs de croissance, des substances mitogènes, des hormones, des cytokines ou encore des signaux de stress. Elles constituent des modules de signalisation qui transmettent des signaux extracellulaires de la membrane au noyau. Les MAPK sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme le développement, la différenciation, la division, la motilité et l'apoptose. Les modules sont toujours constitués de trois protéines qui s'activent l'une l'autre par des phosphorylations successives : les MAP kinase kinase kinases (MAPKKK) activent les MAP kinase kinases (MAPKK) qui activent ensuite les MAPK (Figure 30). Chez les métazoaires et les vertébrés, cinq familles ont été jusqu'à présent identifiées et sont activées en réponse à un ou des stimuli (us) particulier(s) :

- Les MAPK-Erk répondent aux signaux extracellulaires stimulant la croissance ou la différenciation. Les modules MAPKKK et MAPKK sont appelés respectivement MAPK/Erk kinase kinase (MEKK) et MAPK/Erk kinase (MEK) dans le cas des voies des MAPK-Erk 1 et 2 (Tanoue et Nishida, 2003).
- Les MAPK-JNK (c-Jun N-terminal Kinases) ou SAP kinases (Stress Activated Protein kinases) sont activées par des signaux de stress.
- Les MAPK de la famille de $p38^{\text{MAPK}}$ répondent également à des signaux de stress.
- La MAPK-Erk5 (encore appelée Big MAPK) est impliquée dans la réponse aux signaux de stress nutritionnel.
- La MAPK-Erk3 est encore très mal connue.

Ces cascades de phosphorylations sont également régulées par des protéines phosphatases à double spécificité (qui déphosphorylent les résidus sérine / thréonine et tyrosine). Ces phosphatases sont spécifiques des MAPK et sont appelées MAPK phosphatases.

Figure 31 : Expression, modification et fonction de la protéine p39^{Mos} durant la reprise méiotique

La synthèse de p39^{Mos} se stabilise après la GVBD et s'arrête dans les ovocytes bloqués en métaphase II, bien que sa quantité soit constante dans l'ovocyte après la GVBD. La phosphorylation de la protéine p39^{Mos} débute rapidement après la stimulation de la maturation et p39^{Mos} est pleinement phosphorylée après la GVBD, sa stabilité augmente rapidement lors de la GVBD (d'après Nishizawa et coll., 1992).



VI.2- Les modules identifiés dans l'ovocyte

VI.2.1- Les différentes MAPKKK

VI.2.1.1- p39^{Mos}

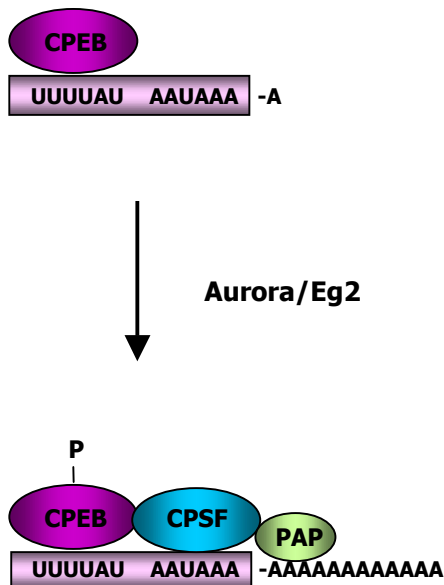
Le proto-oncogène p39^{Mos} est l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-mos* du virus responsable du sarcome murin de Moloney (Oskarsson et coll., 1980; Van Beveren et coll., 1981). p39^{Mos} est une protéine à activité sérine / thréonine kinase (Watanabe et coll., 1989) fortement exprimée dans les cellules germinales femelles. Elle active une MAPK kinase, laquelle active MAPK/Xp42^{Mpk1} (Nebreda et Hunt 1993 ; Posada et coll., 1993 ; Sagata et coll., 1988). La protéine p39^{Mos} est absente dans les ovocytes arrêtés en prophase I, elle est détectée durant la reprise méiotique de l'ovocyte (Sagata et coll., 1988 ; Freeman et coll., 1989, Paules et coll., 1989 ; Sagata et coll., 1989a). Son expression est nécessaire pour la progression à travers les différentes étapes de la méiose (GVBD et méiose I : Sagata et coll., 1988 ; Paules et coll., 1989 ; Zhao et coll., 1990 / méiose II : Sagata et coll., 1989b; O'Keefe et coll., 1989 ; Daar et coll., 1991 ; Kanki et Donoghue, 1991). p39^{Mos} est stockée dans les ovocytes matures, elle est rapidement dégradée après la fécondation (Sagata et coll., 1988 ; Watanabe et coll., 1989, 1991 ; Lorca et coll., 1991 ; Figure 31).

Au cours de la reprise méiotique, l'accumulation de p39^{Mos} résulte, d'une part, de sa synthèse et d'autre part, de sa stabilisation. Dans l'ovocyte en prophase I, l'absence de queue poly(A) sur les ARNm de p39^{Mos} empêche leur traduction. Après stimulation par la progestérone, l'ARNm codant p39^{Mos} est l'un des premiers à être polyadénylé et traduit (Gebauer et coll., 1994; Sheets et coll., 1995). La polyadénylation de ce dernier nécessite la phosphorylation précoce de la CPEB sur la sérine 174 par Aurora A/Eg2 (Hake et Richter, 1994; Paris et coll., 1991; De Moor et Richter, 1997). La phosphorylation de la CPEB est nécessaire et suffisante pour déclencher la polyadénylation de p39^{Mos}, elle permet le recrutement du CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) au niveau du signal de polyadénylation (Mendez et coll., 2000 a et b). Dans les ovocytes immatures, un faible niveau de CPEB phosphorylée est détecté. Elle devient hautement phosphorylée précocement durant la reprise méiotique, simultanément à la polyadénylation de l'ARNm p39^{Mos}. La micro-injection d'une protéine CPEB mutante pour ce résidu, empêchant sa phosphorylation, agit comme un dominant négatif qui bloque la synthèse de p39^{Mos}. A l'inverse, une protéine CPEB mutante, chargée d'acide aspartique mimant la phosphorylation, est suffisante pour stimuler la polyadénylation de l'ARNm p39^{Mos} et l'accumulation de la protéine, même en absence de progestérone (Mendez et coll., 2000a).

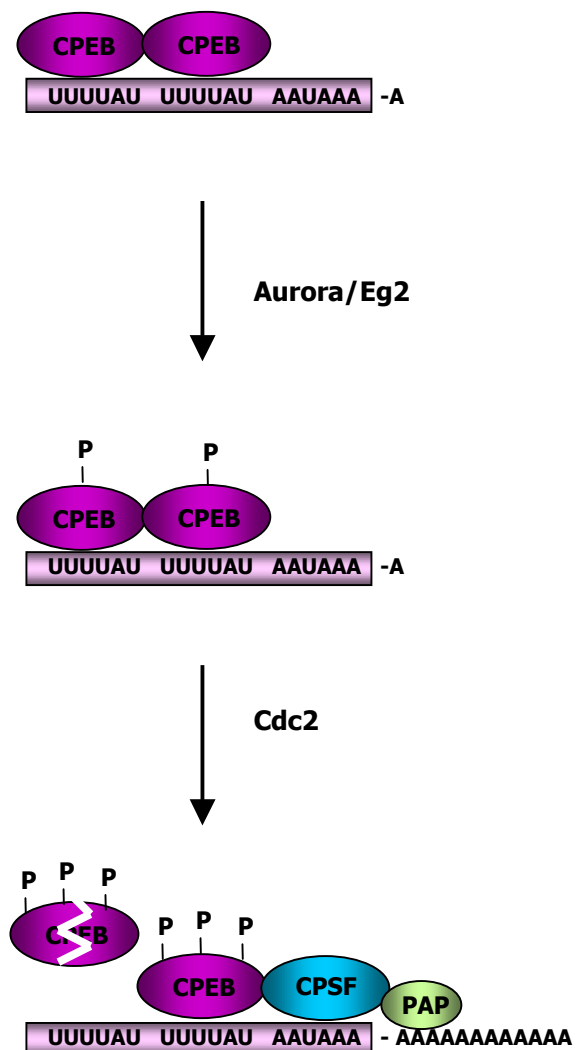
Figure 32 : Régulation de la polyadénylation *via* la dégradation de la CPEB

Après stimulation par la progestérone, la CPEB est rapidement phosphorylée par Aurora A/Eg2 et l'ARNm de p39^{Mos} est polyadénylé. Ce dernier est responsable d'une seconde vague de phosphorylation de la CPEB qui entraîne sa destruction partielle. La destruction du dimère de CPEB permet le recrutement de la PAP et la polyadénylation des ARNm tardifs comme celui des cyclines (d'après De Moor et Richter, 1997 ; Mendez et coll., 2002).

ARNm p39^{Mos}



ARNm cycline



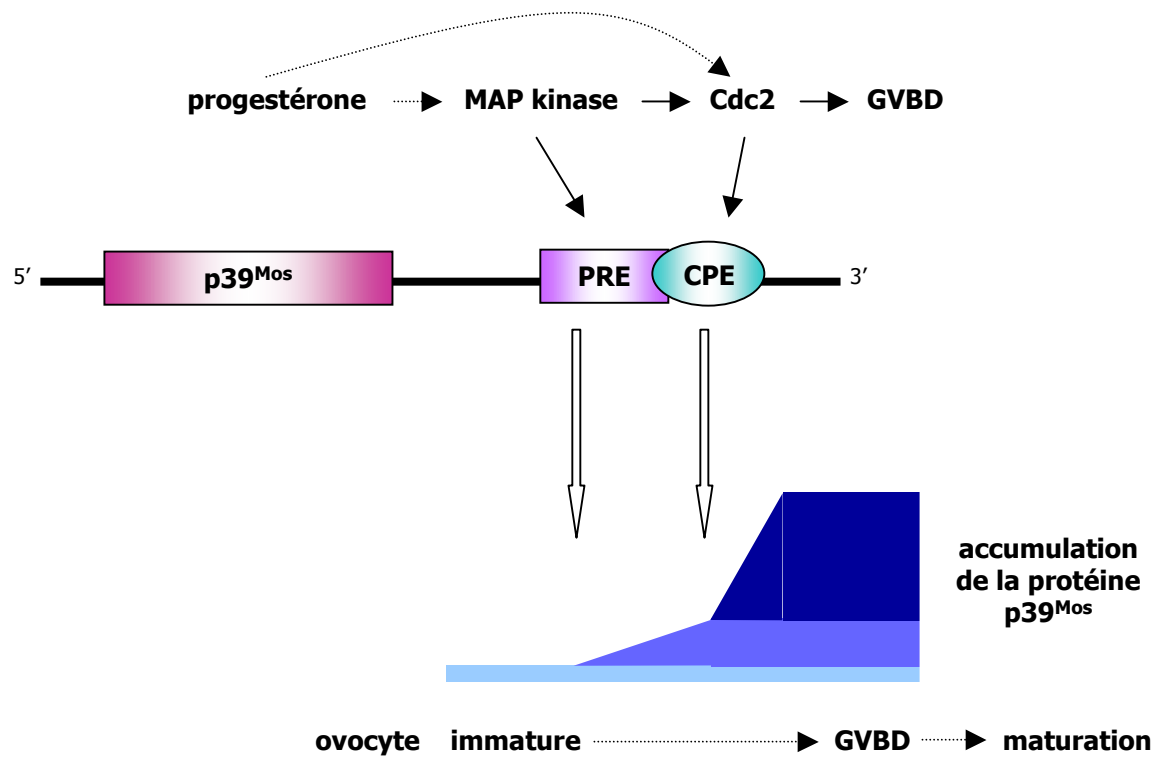
La polyadénylation séquentielle des ARNm est régulée par le nombre de CPE présent au niveau 3'UTR des ARNm. L'ARNm de p39^{Mos}, qui est polyadénylé précocement, présente un seul CPE alors que les ARNm traduits tardivement, comme ceux codant l'histone B4 ou les cyclines B1 et A1, ont deux CPE. Les travaux de De Moor et Richter (1997) ont montré que, si un des deux CPE de la cycline B1 est retiré, la polyadénylation de l'ARNm devient indépendant de p39^{Mos} et de Cdk1 et l'ARNm est polyadénylé précocement. Il est possible que les deux CPE, et ainsi les deux CPEB qui les lient, puissent inhiber la formation d'un complexe de polyadénylation actif par dimérisation ou interaction avec d'autres facteurs qui lieraient les deux CPEB (Mendez et coll., 2000a ; Figure 32). Une telle configuration de facteurs empêcherait l'interaction précoce de la CPEB avec le CPSF durant la reprise méiotique. La destruction partielle de la CPEB, induite par Cdk1, libérerait une de ses molécules qui interagit avec le CPSF et permettrait la polyadénylation et la traduction des ARNm (Paris et coll., 1991; Hake et Richter, 1994; Katsu et coll., 1999).

Des travaux récents suggèrent que l'activation traductionnelle initiale de p39^{Mos} implique un nouvel élément régulateur, le PRE (Polyadenylation Response Element) localisé dans le 3' UTR de l'ARNm (Charlesworth et coll., 2002). Alors que le PRE et le CPE se chevauchent partiellement à l'intérieur du 3' UTR, ils sont fonctionnellement différents. La polyadénylation et la traduction stimulées par le PRE précèdent celles stimulées par le CPE. Le PRE est la cible des MAPK alors que la polyadénylation cytoplasmique dirigée par le CPE est stimulée par Cdk1. Ces résultats expliqueraient l'accumulation biphasique de p39^{Mos} observée lors de la stimulation de la progestérone (Gotoh et coll., 1995). La progestérone stimule très précocement et temporairement l'activation de la traduction de p39^{Mos} par le PRE *via* la voie des MAPK indépendamment de la CPEB et de Aurora A/Eg2. Cependant, avant la GVBD, la régulation de la CPEB par Aurora A/Eg2 ainsi que l'activation de Cdk1 et la traduction des ARNm dépendantes du CPE sont nécessaires pour l'accumulation de p39^{Mos}. Lors de l'absence de traduction des ARNm de p39^{Mos} dépendant de la CPEB, la synthèse de p39^{Mos} stimulée par le PRE n'est pas suffisante pour atteindre le niveau nécessaire pour déclencher la reprise méiotique. Ceci pourrait être dû à la nature transitoire de la polyadénylation induite par le PRE. Les séquences PRE et CPE pourraient fonctionner séquentiellement pour initier et maintenir l'accumulation de la protéine p39^{Mos} *in vivo* en réponse à la progestérone (Charlesworth et coll., 2002 ; Figure 33).

La protéine p39^{Mos} synthétisée avant la GVBD présente un niveau partiel de phosphorylation associé à une certaine instabilité (Sagata et coll., 1989 ; Watanabe et coll., 1989). Cependant, cet état paraît suffisant pour stimuler la cascade MAPK et la GVBD (Sagata et coll., 1988 ; Sagata et coll., 1989 ; Freeman et coll., 1989). Pendant et après la

Figure 33 : Contrôle traductionnel de l'accumulation séquentielle de la protéine p39^{Mos}

Dans ce modèle, l'activation de la traduction de p39^{Mos} *via* le PRE (Polyadenylation Response Element) précède l'activation de la traduction par le CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element) suggérant une activation plus précoce de la voie MAPK que celle du MPF après une stimulation par la progestérone (modifié d'après Charlesworth et coll., 2002).



GVBD, la phosphorylation de p39^{Mos} augmente progressivement, p39^{Mos} est totalement phosphorylée et métaboliquement stable dans les ovocytes matures (Watanabe et coll., 1989). Trois résidus de p39^{Mos}, la sérine 3 (Freeman et coll., 1992 ; Nishizawa et coll., 1992), la sérine 16 (Bai et coll., 1991 ; Pham et coll., 1999) et la sérine 25 (Yang et coll., 1996), ont été identifiés comme des sites majeurs de phosphorylation.

La phosphorylation de la sérine 3 facilite l'association de p39^{Mos} avec Mek (Chen et Cooper, 1995). Ce résidu est une cible d'auto-phosphorylation (Nishizawa et coll., 1992) bien que sa phosphorylation soit toujours observée même si l'activité kinase de p39^{Mos} est supprimée par mutation (Freeman et coll., 1992). *In vitro*, les MAPK phosphorylent le résidu sérine 3 (Matten et coll., 1996). Au moment de la GVBD, la phosphorylation de la sérine 3 augmente la stabilité de p39^{Mos} en empêchant la reconnaissance par une ubiquitine ligase du résidu proline 2 adjacent (Freeman et coll., 1992 ; Nishizawa et coll., 1992, 1993). Selon certains 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 sérine 3, qui inhibe la dégradation de la protéine (Sheng et coll., 2002).

Les MAPK (Matten et coll., 1996), ainsi que le MPF (Liu et coll., 1990), sont également capables, *in vitro*, de phosphoryler le résidu sérine 16. Dans les cellules COS transfectées exprimant p39^{Mos}, la phosphorylation de la sérine 16 de p39^{Mos} inhibe sa dégradation (Pham et coll., 1999).

Dans les cellules somatiques, la sérine 25 est le site majeur de phosphorylation du produit de l'oncogène v-Mos. Ce résidu est phosphorylé par la PKA. Cette phosphorylation provoque une légère activation de l'activité de p39^{Mos} (Yang et coll., 1996). Pourtant, la phosphorylation de ce site pourrait servir à inhiber l'activation de p39^{Mos} induite par la phosphorylation de la sérine 3 (Yang et coll., 1998).

L'inhibition des mécanismes de dégradation de p39^{Mos} facilite son accumulation. La micro-injection d'une protéine Cdk1 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). *In vitro*, Cdk1 phosphoryle et stabilise p39^{Mos} (Singh et Arlinghaus, 1997; Pham et coll., 1999; Castro et coll., 2001).

La protéine Cdh1, constituant de l'APC, pourrait également être impliquée dans l'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1}. Sa synthèse est requise pour la GVBD induite par la progestérone. 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 $Xp42^{Mpk1}$. Le rôle de Cdh1 lors de la reprise méiotique serait indépendant de l'APC (Papin et coll., 2004).

$p39^{Mos}$ est dégradée peu après la fécondation. Cette dégradation est dépendante de l'ubiquitinylation mais est indépendante de $p55^{Cdc20}$ (Nishizawa et coll., 1992, 1993). 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).

Plusieurs travaux ont mis en évidence que $p39^{Mos}$ active la voie des MAPK- $Xp42^{Mpk1}$ kinases lors de la reprise méiotique stimulée par la progestérone. La micro-injection d'oligonucléotides antisens de $p39^{Mos}$ bloque la synthèse de $p39^{Mos}$ (Barrett et coll., 1990), l'activation de $Xp42^{Mpk1}$ (Dupré et coll. 2002) et l'activation de la MAPKAPK $p90^{Rsk}$ (Barrett et coll., 1990 ; Dupré et coll. 2002). La micro-injection de $p39^{Mos}$ déclenche la reprise méiotique (Sagata et coll., 1989a). Cependant, $p39^{Mos}$ ne semble pas essentielle à la GVBD, l'inhibition de sa synthèse par micro-injection d'oligonucléotides antisens de $p39^{Mos}$ de type Morpholino ou de type phosphorothioates ne bloque pas la GVBD induite par la progestérone (Dupré et coll., 2002 ; Baert et coll., 2003).

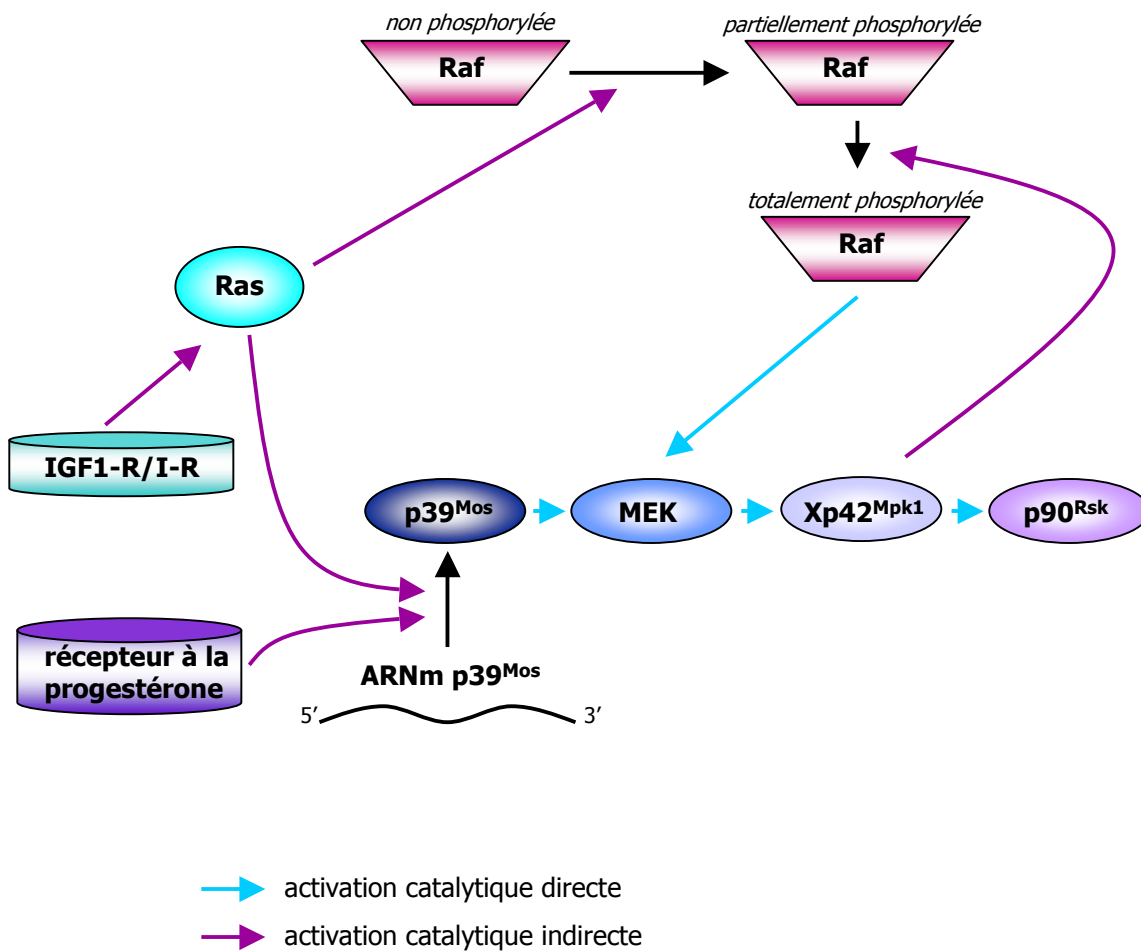
VI.2.1.2- Raf

La protéine Raf a été initialement identifiée comme étant une oncoprotéine rétrovirale à activité sérine / thréonine kinase (Rapp et coll., 1983 ; Moelling et coll., 1984). Elle présente trois régions conservées dans les différentes isoformes de Raf. La région CR1, localisée en position N-terminale, contient le domaine de liaison à $p21^{Ras}$ lorsque celui-ci 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). Egalement localisée en N-terminale, la région CR2 est un domaine riche en sérines et thréonines phosphorylables et responsables d'interactions protéiques affectant la localisation et l'activation de Raf (Morrison et coll., 1993 ; Yao et coll., 1995 ; Zimmermann et Moelling, 1999 ; Guan et coll., 2000 ; Zhang et Guan, 2000). Le domaine CR3, localisé dans la région C-terminale, contient le domaine kinase, essentiel pour l'activité de Raf (Heidecker et coll., 1990).

Au cours de la reprise méiotique, Raf-1 est phosphorylée et activée dans les ovocytes de Xénope (Fabian et coll., 1993 ; Muslin et coll., 1993b). La micro-injection d'une protéine Raf oncogénique entraîne la phosphorylation de $Xp42^{Mpk1}$ et la GVBD (Muslin et coll., 1993b) alors que des dominants négatifs de Raf empêchent l'activation de $Xp42^{Mpk1}$ lors d'une

Figure 34 : Modèle d'activation de la voie p39^{Mos}-Xp41^{Mpk1} après stimulation de la maturation par l'insuline ou par la progestérone

La phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk}, induite par l'insuline ou la progestérone, nécessite la synthèse de p39^{Mos}. La phosphorylation partielle de Raf est indépendante de la voie MAPK alors que la phosphorylation totale de Raf requiert activation de la voie p39^{Mos}-Xp41^{Mpk1} (d'après Baert et coll., 2003).



stimulation par la progestérone ou par la micro-injection d'une forme oncogénique de $p21^{\text{Ras}}$ (Fabian et coll., 1993 ; Muslin et coll., 1993b). La micro-injection d'une protéine Raf constitutivement active stimule l'activation de la voie MAPK malgré l'inhibition de la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ par des oligonucléotides phosphodiester antisens (Fabian et coll., 1993). Ces observations suggèrent que Raf est nécessaire à l'activation de la voie MAPK et qu'elle agit en aval de $p39^{\text{Mos}}$. Cependant, d'autres travaux sont en contradiction avec ces résultats. Dans des extraits acellulaires, l'activation de la voie MAPK par une protéine $p39^{\text{Mos}}$ purifiée n'est pas bloquée par l'ajout d'un dominant négatif de Raf (Shibuya et coll., 1996). L'activation de la voie $Xp42^{\text{Mpk1}}$ stimulée par la progestérone ou l'insuline semble dépendre uniquement de l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$. L'inactivation de la voie $p39^{\text{Mos}}-Xp42^{\text{Mpk1}}$ retarde la GVBD mais n'inhibe pas la reprise méiotique, par contre, la phosphorylation complète de Raf requiert l'activation de Mek1- $Xp42^{\text{Mpk1}}$ (Baert et coll., 2003 ; Figure 34). Des travaux plus récents ont souligné le rôle crucial de la voie PI3 kinase dans les mécanismes par lesquels les voies $p21^{\text{Ras}}$ déclenchent la GVBD, minimisant tout rôle physiologique de Raf dans la reprise méiotique (Gaffre et coll., 2006).

VI.2.2- Les voies MAPK

VI.2.2.1-La voie Mek1- $Xp42^{\text{Mpk1}}$

Chez les vertébrés, deux formes très similaires de protéine Erk sont exprimées : une protéine de 42 kDa ($p42^{\text{Erk2}}$) et une protéine de 44 kDa ($p44^{\text{Erk1}}$). Cependant, dans l'ovocyte de Xénope, une seule protéine Erk est exprimée : la protéine Erk2, également appelée $Xp42^{\text{Mpk1}}$, $Xp42^{\text{Erk}}$ ou $Xp42^{\text{MAPK}}$ (Ferrell et coll., 1991 ; Gotoh et coll., 1991 ; Jessus et coll., 1991 ; Posada et coll., 1991). Présente dès le stade I, son taux ne s'accroît significativement qu'à partir du stade IV (Furuno et coll., 2003). $Xp42^{\text{Mpk1}}$ est la première MAPK découverte dans les ovocytes de Xénope pour sa capacité à phosphoryler la protéine MAP2 lors de la reprise méiotique (Haccard et coll., 1990). Elle est l'homologue de la MAPK mammalienne $p42^{\text{Erk2}}$.

$Xp42^{\text{Mpk1}}$ est activée par la MAPK kinase (Mek) qui la phosphoryle sur les deux résidus thréonine 183 et tyrosine 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). Mek est détectée dans les ovocytes dès le stade I et sa quantité augmente au cours de l'ovogenèse (Furuno et coll., 2003).

VI.2.2.2-La voie JNK

Lors de la reprise méiotique, deux isoformes de JNK sont exprimées et activées dans l'ovocyte. 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, la micro-injection de p39^{Mos}, Mek ou Raf active 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.

VI.2.2.3- La voie MKK6/p38^{MAPK}

Dans les cellules de mammifères, quatre formes de MAPK de la famille p38 sont connues : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ (Johnson et Lapadat, 2002). Dans les ovocytes de Xénope, seules trois isoformes de p38^{MAPK} ont été identifiées : p38 α , p38 β et p38 γ . 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).

VI.2.3- Le module MAPKAP kinase

Le principal relais de la voie Mek1-Xp42^{Mpk1} est la protéine Xp90^{Rsk} (Ribosomal S6 subunit protein kinase ; Gross et coll., 2000). Elle a d'abord été découverte dans l'ovocyte de Xénope pour sa capacité à phosphoryler la sous-unité S6 du ribosome (Erikson et Maller, 1985). Elle est phosphorylée et activée pendant la reprise méiotique puis déphosphorylée et désactivée après la fécondation (Erikson et Maller, 1989). Deux isoformes 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). Les effets délétères de l'U0126, un inhibiteur des Mek 1 et 2, peuvent être supprimés par la micro-injection de p90^{Rsk} constitutivement active (Gross et coll., 2000).

VI.2.4- Les MK phosphatases

Les MAPK sont inactivées par déphosphorylation de leurs résidus thréonines et/ou tyrosines à l'intérieur de la boucle d'activation par les MAPK phosphatases (MKP). Les MKP sont divisées en trois groupes selon leur préférence à déphosphoryler le résidu tyrosine, le

résidu tyrosine ou thréonine, les résidus thréonines et tyrosines. Ces dernières sont également appelées phosphatases à double spécificité (DUSP ou DSP ; Farooq et coll., 2003). Une dizaine de MKP est identifiée (Theodosiou et Ashworth, 2002b).

Les mécanismes de régulation des MKP dans les ovocytes demeurent peu connus. Dans les ovocytes de Souris, une activité de type MAPK phosphatase est régulée négativement par l'accumulation de p39^{Mos} (Verlhac et coll., 2000b). 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, 2002a). XCL100 a été clonée chez le Xénope. Elle est la seule MKP connue dans les ovocytes immatures et matures dans lesquels elle est exprimée de manière constitutive. *In vitro*, XCL100 recombinante déphosphoryle les résidus thréonines et tyrosines de Xp42^{Mpk1} (Lewis et coll., 1995). La micro-injection de Mkp1 dans les ovocytes de Xénope inhibe partiellement la synthèse de p39^{Mos} qui pourrait être sous rétrocontrôle positif de Xp42^{Mpk1}. Ce rétrocontrôle pourrait impliquer un effet sur la polyadénylation puisque la micro-injection de Mkp3 bloque la polyadénylation de l'ARNm de p39^{Mos} induite par micro-injection d'une Mek constitutivement active (Howard et coll., 1999).

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

VI.3- Rôle des voies MAPK dans la reprise méiotique

Contrairement aux cellules somatiques, les voies MAPK n'ont pas de rôle génomique dans les ovocytes de Xénope puisque la reprise méiotique est indépendante de la transcription.

VI.3.1- Rôles des MAPK dans la GVBD

L'activation du MPF et la GVBD peuvent être stimulées par la voie MAPK en absence d'hormone dans les ovocytes de Xénope. La reprise méiotique peut être déclenchée par la micro-injection d'une protéine p21^{Ras} humaine (Birchmeier et coll., 1985), par la micro-injection d'une protéine p39^{Mos} recombinante (Yew et coll., 1992) ou de son ARNm (Freeman et coll., 1989 ; Sagata et coll., 1989a). L'activation du MPF et la GVBD peuvent être également stimulées par la micro-injection de formes constitutivement actives

Tableau 2 : Effets de différents inhibiteurs de la voie MAPK sur la reprise méiotique des ovocytes de Xénope

inhibiteur	effet	effet sur la GVBD		References
		Pg	insuline	
anticorps anti-Ras	inactive Ras	aucun	inhibition	Despande et Kung, 1987 Korn et coll., 1987
dominant négatif 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 de p39 ^{Mos}	inhibition	inhibition	Sagata et coll., 1988 Barrett et coll., 1990
p39 ^{Mos} -MAS	inhibe l'accumulation de p39 ^{Mos}	retard	N.D.	Dupré et coll., 2002
p39 ^{Mos} -PSAS	inhibe l'accumulation de p39 ^{Mos}	retard	retard	Baert et coll., 2003
geldanamycine	inhibe p39 ^{Mos}	retard	inhibition	Fisher et coll., 1999
facteur létal de la toxine de l'anthrax	clive et inactive l'ensemble de MEK	inhibition	N.D.	Duesbery et coll., 1998 Bodart et coll., 2002 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., 2002
anti-corps anti-Erk	inactive les MAP kinases	inhibition	N.D.	Gotoh et Nishida, 1994 Kosako et coll., 1994
ARNm MPK1	inactive Xp42 ^{mpk1}	inhibition	N.D.	Gotoh et coll., 1995 Howard et coll., 1999
ARNm MPK3	déphosphoryle Xp42 ^{mpk1}	retard	N.D.	Fisher et coll., 1999

MAS : oligonucléotides antisens Morpholino de p39^{Mos}

POAS : oligonucléotides phosphodiester antisens de p39^{Mos}

PSAS : oligonucléotides phosphorothioates antisens de p39^{Mos}

N.D. : non déterminé

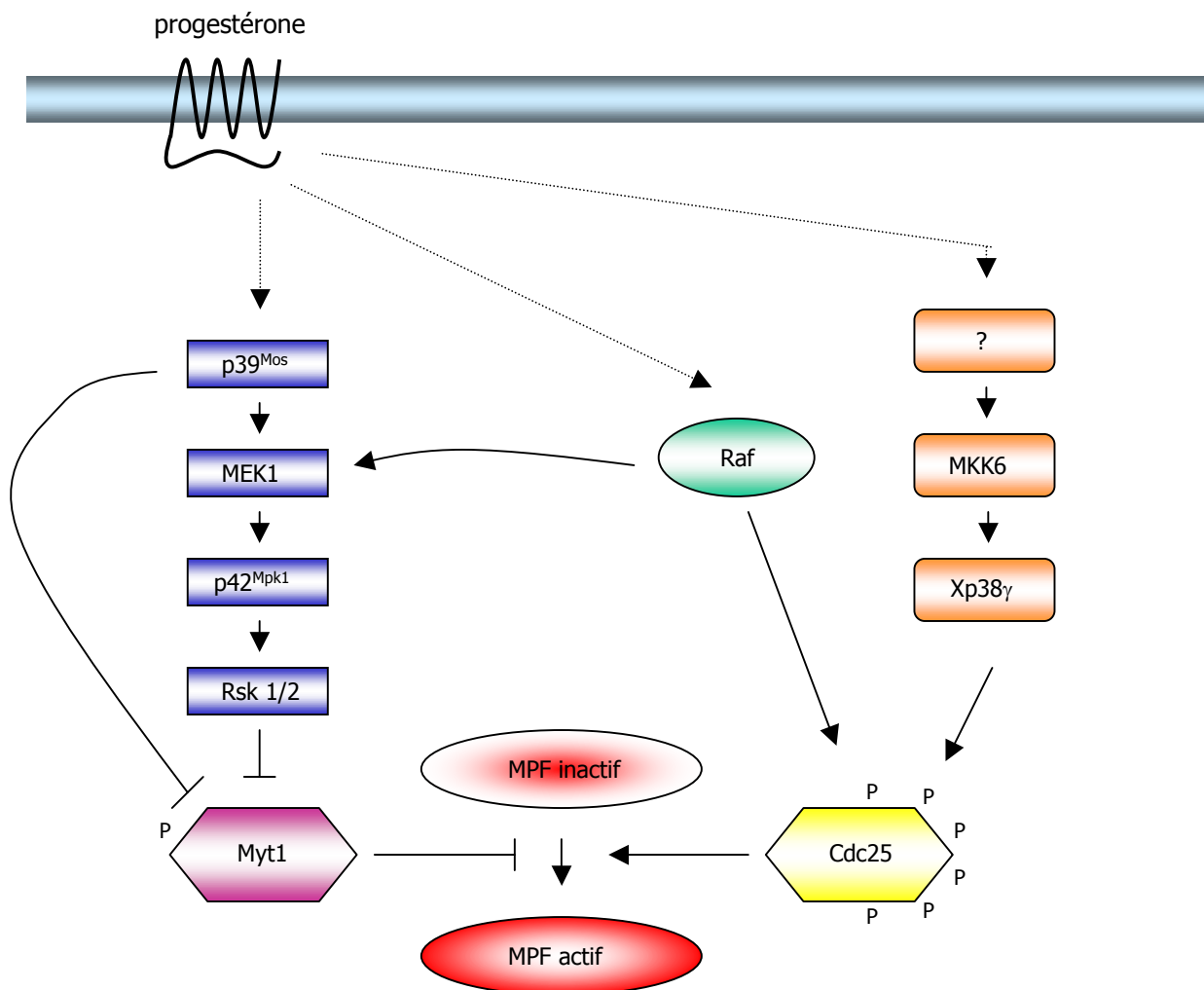
de Mek1 (Gotoh et coll., 1995 ; Huang et coll., 1995) ou de Mek2 (Bodart et coll., 2002), de Erk2 thiophosphorylée (Haccard et coll., 1995) ou de $p90^{Rsk}$ constitutivement active (Gross et coll., 2001). Par ailleurs, l'activation du MPF et la GVBD, déclenchées par micro-injection de $p39^{Mos}$, Mek1 ou Mek2, sont indépendantes de la synthèse protéique (Yew et coll., 1992 ; Gotoh et coll., 1995 ; Huang et coll., 1995 ; Bodart et coll., 2002), alors que la reprise méiotique stimulée par Erk 2 thiophosphorylé est dépendante de la traduction des ARNm (Haccard et coll., 1995).

L'inhibition de la voie MAPK a donné des résultats contradictoires en fonction des stratégies d'inhibition utilisées (Tableau 2). Certains auteurs montrent que l'inhibition de la cascade des MAPK empêche l'activation du MPF et la GVBD. La micro-injection d'oligonucléotides phosphodiester antisens dirigés contre $p39^{Mos}$ bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone ou par l'insuline (Sagata et coll., 1988 ; Barrett et coll., 1990). La micro-injection d'un anticorps neutralisant ou d'une forme dominant négatif de $p21^{Ras}$ n'empêche pas la reprise méiotique déclenchée par la progestérone mais bloque celle stimulée par l'insuline (Deshpande et Kung, 1987 ; Korn et coll., 1987). En présence de progestérone, la micro-injection d'une forme dominant négatif de Raf retarde (Fabian et coll., 1993) ou inhibe (Muslin et coll., 1993b) la reprise méiotique. Elle peut être également bloquée par micro-injection 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 ; Chopra et coll., 2003) ou par l'incubation des ovocytes en présence de PD98059, un inhibiteur de Mek1 et 2 (Cross et Smythe, 1998). Enfin, l'inhibition de $Xp42^{Mpk1}$ par micro-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.

A l'inverse, d'autres auteurs montrent que l'inhibition de la voie MAPK induit un simple retard de la GVBD lorsque les ovocytes sont traités par la progestérone. L'inhibition de la synthèse ou de l'activité de $p39^{Mos}$, par micro-injection d'oligonucléotides antisens de type Morpholino ou phosphorothioates (Dupre et coll., 2002 ; Baert et coll., 2003) ou par incubation en présence de geldanamycine, inhibiteur de Hsp90 (Fisher et coll., 1999, 2000), n'empêchent pas la GVBD mais la retardent. La présence d'U0126, inhibiteur de Mek1 et Mek2, conduit à des résultats similaires (Gross et coll., 2000). La micro-injection d'ARNm codant la phosphatase Mkp3 retarde également la GVBD (Fisher et coll., 1999). Bien que la surexpression de MKK6 et de $p38\gamma$ déclenche la GVBD, la micro-injection de formes mutantes dominants négatifs de $Xp38\gamma$ ou de MKK6 ne font que la retarder (Perdiguero et coll., 2003).

Figure 35 : Stimulation du MPF par les différents membres de la voie MAPK

Les différentes voies MAPK pourraient être impliquées dans l'activation du MPF en agissant essentiellement sur deux protéines : Myt1, un inhibiteur de l'activation du MPF et Cdc25, un activateur du MPF. p90^{Rsk} ainsi que p39^{Mos} seraient capables de phosphoryler et d'inhiber Myt1. Par ailleurs, *in vitro*, Raf1 est capable de phosphoryler et d'activer Cdc25 A et B, de la même manière, p38 γ est capable de phosphoryler et d'activer Cdc25.



VI.3.2- Mécanismes d'activation du MPF par les voies MAPK

Les MAPK participeraient à l'activation du MPF en inhibant Myt 1, protéine kinase inhibitrice de Cdk1. Myt 1 s'associe *via* son extrémité C-terminale à p90^{Rsk}. *In vitro*, cette association entraîne la phosphorylation et l'inactivation de Myt 1. Dans l'ovocyte, des complexes Myt 1 - p90^{Rsk} (de préférence hyperphosphorylée) ont été immunoprécipités. Ces observations suggèrent que p90^{Rsk} participe à l'activation du MPF en inhibant Myt 1 (Palmer et coll., 1998). Par ailleurs, p39^{Mos} est également capable d'interagir directement avec Myt 1 *in vitro*. p39^{Mos} phosphorylerait Myt 1 *in vivo* et faciliterait ainsi la conversion du pré-MPF en MPF, même en absence d'activation de la voie MAPK (Peter et coll., 2002). Bien que p39^{Mos} et p90^{Rsk} soient toutes deux inhibées en présence de geldanamycine, Myt 1 subit un retard de mobilité électrophorétique sur immunoempreinte. Ces résultats suggèrent une régulation complexe de Myt 1 par une autre voie que p39^{Mos}-Mek1-Xp42^{Mpk1}-p90^{Rsk} (Fisher et coll., 1999).

Les voies MAPK participent également à l'activation du MPF *via* la régulation positive de Cdc25 (Figure 35). Cdc25 est associée à Raf1 dans les ovocytes de Xénope bloqués en prophase I ou en métaphase II. *In vitro*, Raf1 phosphoryle et active Cdc25 A et B (Galaktionov et coll., 1995). Les MAPK de la famille p38 interviendraient également dans l'activation de Cdc25. L'activité phosphatase de Cdc25 a été testée *in vitro* en présence de Xp38γ et de Xp38α. Seule Xp38γ stimule l'activité de Cdc25, en phosphorylant le résidu sérine 205. La capacité de Xp38γ à activer le MPF en phosphorylant Cdc25 est néanmoins plus faible que celle de Plx1 (Perdiguer et coll., 2003).

VI.3.3- Suppression de la phase S

L'inactivation de la voie MAPK dans l'ovocyte de Xénope provoque une réplication précoce de l'ADN après la première division de méiose (Furuno et coll., 1994 ; Gross et coll., 2000 ; Dupre et coll., 2002). L'inhibition de Cdk1 à la transition méiose I-méiose II, par un dominant négatif, entraîne la reformation d'une enveloppe nucléaire et la réplication de l'ADN (Furuno et coll., 1994). De même, 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). Ainsi, la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} serait nécessaire pour réactiver prématurément le MPF et maintenir un certain niveau d'activité de celui-ci, ce qui empêcherait la réplication de l'ADN entre les deux divisions méiotiques dans les ovocytes de

Xénope (Sagata et coll., 1989b ; Yew et coll., 1992 ; Nebreda et coll., 1995 ; Masui, 2000 ; Abrieu et coll., 2001 ; Hochegger et coll., 2001).

VI.3.4- Activité CSF : stabilisation des cyclines

Le facteur responsable de l'arrêt des ovocytes de vertébrés en métaphase de deuxième division est le CSF (Cytostatic Factor ; Masui et Markert, 1971). La micro-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.

La nature du CSF est encore débattue. Cependant, lorsque les membres de la voie MAPK : p39^{Mos} (Sagata et coll., 1989b), Xp42^{Mpk1} (Haccard et coll., 1993) ou p90^{Rsk} (Gross et coll., 1999), sont injectés dans une cellule d'un embryon au stade 2, ils bloquent la division du blastomère injecté. Le même résultat est obtenu en injectant un ARNm codant une forme constitutivement active de Mek1 (Sagata, 1995). Par contre, 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. Dans les ovocytes matures, la dégradation de la cycline B est fortement inhibée (Murray et coll., 1989). p39^{Mos} pourrait être impliquée dans 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). 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., 1989b).

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 (Vorlauffer et Peters, 1998). Cependant, les MAPK ne semblent pas inactiver la voie de dégradation des cyclines mais plutôt prévenir la promotion de cette dégradation par le MPF (Abrieu et coll., 1996 ; Abrieu et coll., 2001). En plus de son implication dans l'activité CSF, p39^{Mos} stimule la synthèse des cyclines B1 : les ARNm de la cycline B1 contiennent dans leur UTR3' une séquence de type MRE (Mos Response Element ; Ballantyne et coll., 1997 ; de Moor et Richter, 1997). Cependant, l'inhibition de l'activité des Mek, par le PD98059, n'a pas d'effet sur la polyadénylation des ARNm de la cycline B1, ce qui suggère que la synthèse des cyclines B1 peut être stimulée par une voie indépendante des MAPK (Howard et coll., 1999).

La levée du blocage métaphasique, entraînant une dégradation complète et rapide des cyclines et la séparation des chromatides sœurs, requiert une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et l'activation de la CaMKII (Ca²⁺-calmoduline dépendante Kinase II ; Lorca et coll., 1991 ; Lorca et coll., 1993 ; Morin et coll., 1994). 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 en présence d'une activité MAPK 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.

VI.3.5- Régulation du point d'assemblage du fuseau et relations avec les microtubules

De nombreuses études réalisées dans les ovocytes de mammifères ont mis en évidence que la voie Mek-Erk intervient dans le contrôle de la formation et de la stabilité du fuseau. Dans les ovocytes de Porc et de Souris, les MAPK sont localisées au niveau du fuseau métaphasique et migrent 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, la micro-injection d'oligonucléotides antisens (Paules et coll., 1989) ou d'anticorps (Zhao et coll., 1991) dirigés contre p39^{Mos} bloque l'expulsion du premier globule polaire. La micro-injection d'un anticorps dirigé contre p39^{Mos} empêche la formation du fuseau méiotique (Zhao et coll., 1991). Pourtant, des ovocytes de Souris, chez lesquels l'activité MAPK est inhibée par mutation des deux allèles du gène codant p39^{Mos}, peuvent se diviser et expulser le premier globule polaire, même si ce dernier est anormalement grand (Verlhac et coll., 2000a). Une autre étude a montré que de nombreux ovocytes p39^{Mos}^{-/-} présentent des anomalies dans la répartition des chromosomes sur la plaque équatoriale du fuseau ainsi qu'une condensation plus faible de la chromatine (Araki et coll., 1996). De plus, les microtubules et la chromatine prennent un aspect interphasique entre la métaphase I et la métaphase II dans les ovocytes p39^{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).

Dans les modèles Amphibiens, les études concernant les MAPK et le fuseau de division sont beaucoup moins abondantes. 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 lorsque les ovocytes sont traités avec de l'U0126 (Gross et coll., 2000; Bodart et coll., 2002; Horne et Guadagno, 2003) ou micro-injectés d'oligonucléotides Morpholinos antisens dirigés contre p39^{Mos} (Dupre et coll., 2002). Chez *Rana japonica*, l'inhibition de Mek par l'U0126 ne permet pas l'organisation d'un MTOC à la base de la vésicule germinative. Les chromosomes ne se condensent que partiellement et aucun fuseau bipolaire ne s'organise (Kotani et Yamashita, 2002).

La voie Erk est également impliquée dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau (Spindle Checkpoint) qui inhibe la sortie de phase M jusqu'à l'attachement complet des chromosomes au fuseau (Wells et Murray, 1996). Au cours de ce processus, certaines protéines s'associent aux kinétochores lors de la métaphase (Chen et 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 impliquées 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).

L'ensemble des mécanismes moléculaires et cytologiques associés à la reprise méiotique est également accompagné d'un certain nombre de modifications ioniques.

Tableau 3 : Activité intracellulaire des principaux ions dans l'ovocyte de Xénope

espèce ionique	concentration en mM	auteurs
Na⁺	23	Kusano et coll., 1982
	6	Barish, 1983
	10	Costa et coll., 1989
	4	Milovanovic et coll., 1991
	9	Cougnon et coll., 1996
K⁺	148	Kusano et coll., 1982
	92	Barish, 1983
	117	Lotan et coll., 1982
	110	Costa et coll., 1989
	76	Cougnon et coll., 1996
Cl⁻	62	Kusano et coll., 1982
	54	Lotan et coll., 1982
	33	Barish, 1983
	38	Costa et coll., 1989
	50	Weber et coll., 1995
	24	Cougnon et coll., 1996
Ca²⁺	3.10 ⁻⁶	O'Connor et coll., 1977
	50-90.10 ⁻⁶	Brooker et coll., 1990
	30.10 ⁻⁶	Parker et Ivorra, 1993
	400.10 ⁻⁶	Wu et coll., 1998
Mg²⁺	> 0.5	Wu et coll., 1998

Tableau 4 : Valeur du potentiel d'équilibre pour les principaux ions dans l'ovocyte de Xénope

potentiel d'équilibre	mV	références
E_{Na+}	46	Kusano et coll., 1982
	61	Costa et coll., 1989
E_{K+}	-108	Kusano et coll., 1982
	-95	Costa et coll., 1989
E_{Cl-}	-14	Kusano et coll., 1982
	-28	Costa et coll., 1989

Chapitre VII : Événements ioniques de la reprise méiotique

VII.1- Caractéristiques électrophysiologiques de l'ovocyte immature

La membrane plasmique marque une frontière entre le compartiment interne et externe de la cellule. Cette compartimentalisation est essentielle pour l'activité de la cellule ainsi que pour sa viabilité. De nombreuses études ont été réalisées sur l'ovocyte de Xénope afin de déterminer les activités intracellulaires en différents ions. Les cations comme les ions potassiques sont majoritairement répartis dans le compartiment intracellulaire alors que les ions sodiques et calciques sont localisés principalement dans le compartiment extracellulaire.

Cependant, les résultats obtenus montrent une grande disparité dans les activités ioniques. Celle-ci peut s'expliquer par l'utilisation d'outils de mesure différents et par une large variabilité selon les femelles. Toutefois, les activités mesurées sur des ovocytes provenant d'une même femelle sont assez similaires (Tableau 3).

Une grande variabilité est également observée pour le potentiel d'équilibre des trois principaux ions présents dans l'ovocyte : sodiques, potassiques et chlores (Tableau 4). Ces différences de valeurs peuvent s'expliquer par des activités ioniques intracellulaires variables selon les auteurs.

La différence de distribution des charges électriques entre le milieu intracellulaire et extracellulaire crée un gradient électrique à travers la membrane : le potentiel de membrane ou de repos (mesuré en Volts). Le potentiel de repos est majoritairement déterminé et régulé par la concentration de potassium. Dans l'ovocyte immature, le potentiel de repos est négatif mais une grande variabilité est également observée selon les lots d'ovocytes (Tableau 5). Cependant, il est généralement compris entre -30 mV et -70 mV.

VII.2- Modifications ioniques membranaires associées à la reprise méiotique

La reprise méiotique est marquée par une modification des propriétés électriques de la membrane plasmique des ovocytes. Ces changements préparent l'ovocyte pour la fécondation et pour son transfert en eau douce lors de la ponte.

Tableau 5: Potentiel de membrane mesuré dans des ovocytes défolliculés

valeur du potentiel de membrane	références
- 27 mV	Kusano et coll., 1982
- 41 mV	Costa et coll., 1989
- 44 mV	Ackerman et coll., 1994
- 50 mV	Weber et coll., 1995
- 47 mV	Liebold et coll., 1996
- 59 mV	Milovanovic et coll., 1991

Au cours de la reprise méiotique, la membrane de l'ovocyte se dépolarise et la résistance membranaire augmente transitoirement lors de la GVBD (Moreau et coll., 1976 ; Bellé et coll., 1977 ; Ziegler et Morrill, 1977, Wallace et Steinhard, 1977 ; Kado et coll., 1981). Durant les deux à trois heures qui suivent la stimulation par la progestérone, la sélectivité aux ions potassiques diminue (Ziegler et Morrill, 1977 ; O'Connor et coll., 1977, Morrill et Ziegler, 1980) et la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ est inhibée par internalisation, ce qui contribue à la dépolarisation membranaire (Weinstein et coll., 1982 ; Schmalzing et coll., 1990). L'amplitude et l'évolution du potentiel de membrane lors de la reprise méiotique varient selon les espèces. La membrane des ovocytes de *Xenopus laevis* se dépolarise avant la GVBD d'environ 30 mV, puis se repolarise lors de la GVBD. Elle se dépolarise de nouveau après la GVBD (Lee et Steinhardt, 1981). Chez les ovocytes d'*Ambystoma* (Urodèle), la membrane s'hyperpolarise de quelques millivolts lorsque la progestérone est ajoutée, se dépolarise lentement durant les premières heures puis devient positive (+40 mV) après le début de la GVBD (Rodeau et Vilain, 1986).

Certains courants ioniques sont affectés au cours de la reprise méiotique. C'est le cas du courant chlore dépendant du calcium chez le Xénope. Durant les cinq à huit heures qui suivent la stimulation par la progestérone, l'amplitude du courant chlore sortant transitoire augmente puis diminue progressivement avant la GVBD pour disparaître totalement (Vilain et coll., 1989).

VII.3- Variations de calcium associées à la reprise méiotique

L'ion calcique est un second messenger universel essentiel pour de nombreuses réponses cellulaires. Le calcium, à la différence de la plupart des seconds messagers, ne peut pas être métabolisé. La régulation de sa concentration intracellulaire fait intervenir un certain nombre de protéines capables de lier le calcium ou de l'expulser hors de la cellule. Les signaux calciques sont régulés à la fois dans le temps, dans l'espace et en amplitude (Berridge et coll., 1998). Trois étapes du cycle cellulaire seraient dépendantes du calcium : la transition G0/G1, la transition G1/S et la transition G2/M (Berridge, 1995). Le rôle du calcium dans la reprise méiotique est à l'origine de nombreuses études dont les conclusions sont souvent controversées. Différentes techniques permettent de mesurer les variations de calcium dans l'ovocyte.

VII.3.1- Outils pour mesurer les variations de calcium dans l'ovocyte

De nombreuses études ont été réalisées dans l'ovocyte afin de déterminer d'une part, si la reprise méiotique est associée à une augmentation de la concentration calcique, et d'autre part, quel est son rôle dans les processus moléculaires de la reprise méiotique. Différentes méthodes ont été utilisées afin de mesurer les modifications de la concentration calcique intracellulaire.

VII.3.1.1- Le ^{45}Ca

L'incubation en présence de ^{45}Ca permet de mesurer les variations de la concentration calcique de l'ovocyte, soit en mesurant l'efflux de ^{45}Ca , soit en mesurant la radioactivité résiduelle de l'ovocyte (Marot et coll., 1976 ; O'Connor et coll., 1977; Shapira et coll., 1990 ; Duesbery et Masui, 1996).

VII.3.1.2- Les photoprotéines liant le calcium

De nombreux cnidaires présentent des protéines chémoluminescentes émettant des photons lorsqu'elles lient le calcium, telles que l'obéline, la clytine, la nitrocomine ou l'aéquorine (Shimomura, 1985 ; Tsuji et coll., 1995). L'aéquorine, extraite de la méduse *Aequorea forskålea*, est l'indicateur calcique bioluminescent le plus largement utilisé. Le complexe aéquorine comprend une molécule d'apoaéquorine, un luminophore (la coelenterazine) et une molécule d'oxygène (Shimomura et coll., 1988 ; Inouye et coll., 1989). Lorsque le calcium lie l'aéquorine, la molécule d'oxygène de l'aéquorine est libérée, la coelenterazine est oxydée et émet une lumière bleue.

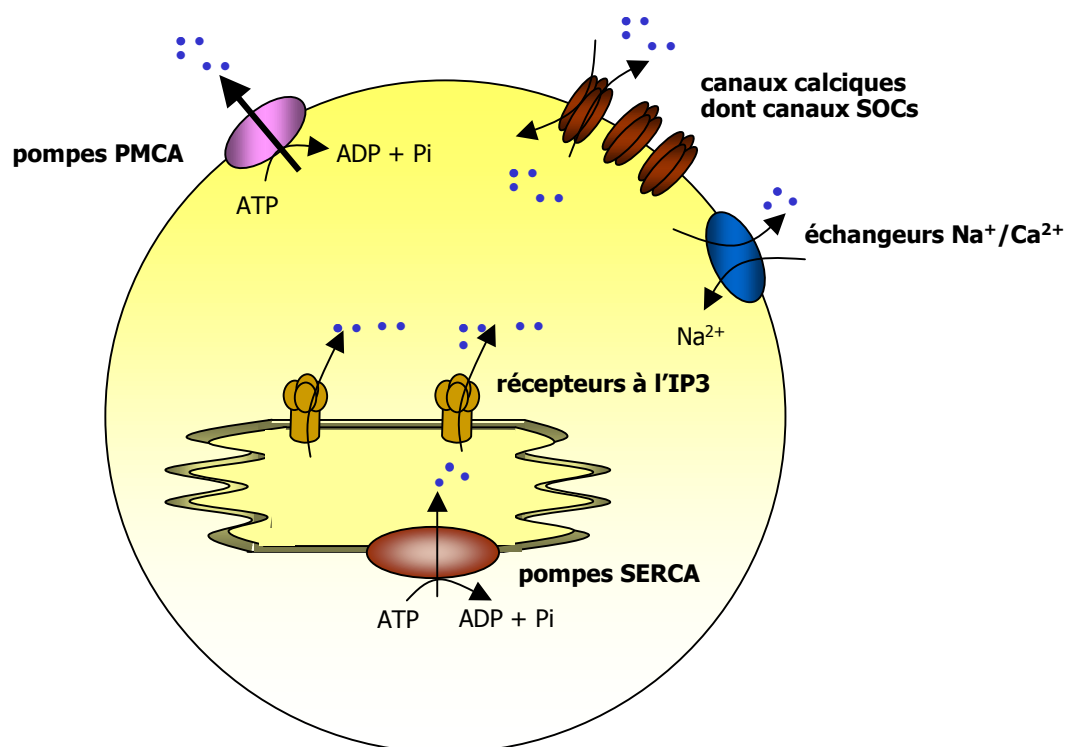
De nombreux auteurs ont utilisé cette technique afin de mesurer les variations de concentration calcique lors de la reprise méiotique (Belle et coll., 1977 ; Moreau et coll., 1980 ; Wasserman et coll., 1980 ; Cork et coll., 1987).

VII.3.1.3- Les sondes fluorescentes

Il existe différentes sondes fluorescentes permettant de visualiser les variations de calcium comme l'Indo-1, le Quin-2 et le Fura-2. Ces sondes sont généralement dérivées de chélateurs calciques et lient le calcium libre intracellulaire. La liaison au calcium induit à la fois une variation de l'intensité de la fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. Dans l'ovocyte de Xénope, le Fura-2 a souvent été utilisé pour détecter les variations de calcium (Ferguson et coll., 1991 ; Schultheiss et coll., 1997 ; Bodart et coll., 1999).

Figure 36 : Principaux mécanismes impliqués dans le maintien de la concentration calcique intracellulaire de l'ovocyte de Xénope

Différentes protéines sont impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire de calcium. Les pompes PMCA et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permettent l'expulsion du calcium hors de l'ovocyte. Au niveau du réticulum endoplasmique, les récepteurs à l'IP3 permettent la libération de calcium dans le cytoplasme. A l'inverse, les pompes SERCA assurent le remplissage du réticulum endoplasmique en calcium.



VII.3.1.4- Les courants chlores dépendant du calcium

Des canaux chlores dépendant du calcium ont été identifiés au niveau de la membrane plasmique des ovocytes de Xénope (Miledi et Parker, 1984). Bien que l'intensité des courants ne soit pas directement corrélée à la concentration calcique intracellulaire, ces courants peuvent être utilisés pour détecter des variations du niveau de calcium intracellulaire (Dascal, 1987 ; Parker et Miledi ; 1987 ; Hartzell, 1996 ; Hartzell et coll., 1997). Cette technique a été largement utilisée dans l'ovocyte de Xénope (Hartzell, 1996 ; Hartzell et coll., 1997 ; Kuruma et Hartzell, 2000 ; Kuruma et coll., 2000 ; Jeong et coll., 2004 ; Tang et coll., 2005).

VII.3.2- Mécanismes impliqués dans la régulation de la concentration calcique intracellulaire

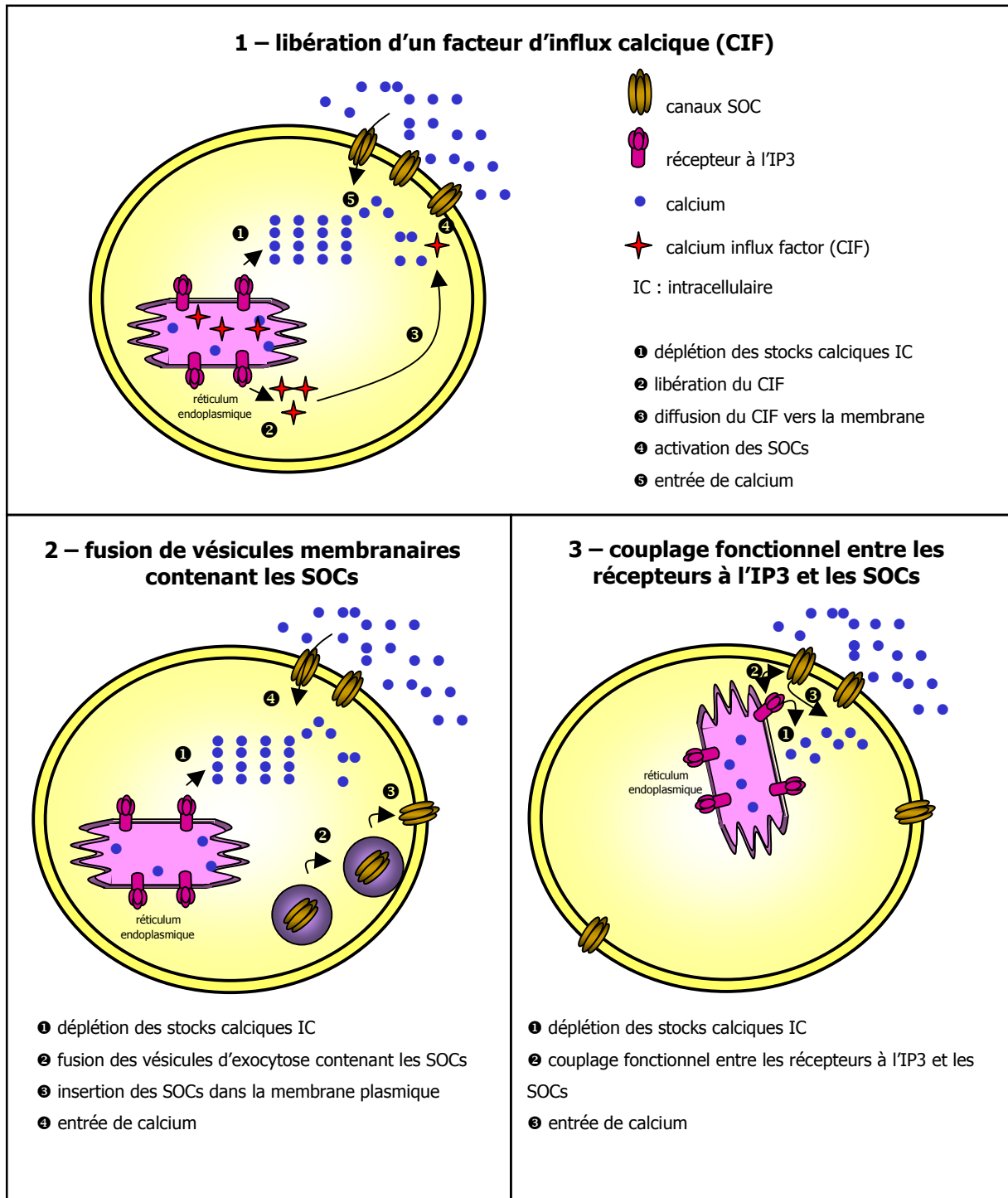
L'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique peut impliquer une libération du calcium à partir des stocks intracellulaires et/ou un influx de calcium venant du milieu extracellulaire (Figure 36).

Dans les cellules non excitables, la voie primaire d'entrée de calcium est l'entrée capacitive à travers l'activation du mécanisme SOCE (Store Operated Calcium Entry ; Berridge, 1995). L'influx de calcium est activé en réponse à la déplétion des stocks calciques intracellulaires. Les mécanismes couplant la déplétion des stocks intracellulaires à l'activation des SOCE restent mal identifiés. Trois modèles ont été proposés (Figure 37) : le « couplage physique » (Berridge, 1995 ; Kiselyov et coll., 1998), les « messagers diffusibles » (Randriamampita et Tsien, 1993 ; Csutora et coll., 1999) et les « vésicules de fusion » (Somasundaram et coll., 1995, Yao et coll., 1999).

Alors que dans la plupart des tissus, les cellules expriment des récepteurs à l'IP3 (IP3R) et des récepteurs à la ryanodine (RyR), les ovocytes de Xénope n'expriment que les récepteurs à l'IP3 (Parys et coll., 1992 ; Stehno-Bittel et coll., 1995) qui constituent les seuls canaux intervenant dans la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique (Parys et Bezprozvanny, 1995). Dans les ovocytes immatures, les récepteurs à l'IP3 sont distribués de manière diffuse au niveau du réticulum endoplasmique alors que dans les ovocytes matures, ils sont regroupés en « cluster » et leurs sensibilités au calcium et à l'IP3 sont modifiées, conduisant à une libération plus importante et plus durable du calcium (Parys et coll., 1994 ; Kume et coll., 1997 ; Machaca, 2004 ; El Jouni et coll., 2005). A l'inverse, la

Figure 37 : Différents modes de couplage entre la vidange des stocks calciques intracellulaires et l'activation des SOC

La fixation de l'IP3 à son récepteur, localisé au niveau du réticulum endoplasmique, provoque une libération de calcium. (1) A la suite de la déplétion des stocks intracellulaires de calcium, un facteur diffusible serait libéré à partir du réticulum endoplasmique et activerait les SOC. (2) La déplétion des stocks intracellulaires de calcium induirait la fusion de vésicules membranaires renfermant les SOC avec la membrane plasmique. (3) La déplétion des stocks intracellulaires de calcium entraînerait un changement de conformation des récepteurs à l'IP3, lequel est transmis aux canaux SOC situés au niveau de la membrane plasmique par une interaction directe protéine-protéine.



pompe SERCA (Sarcoendoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) est impliquée dans le remplissage du réticulum endoplasmique en calcium.

Au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte, la pompe PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) est responsable de l'extrusion du calcium hors de la cellule. La présence d'un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) a également été mise en évidence par l'équipe de Solis-Garrido et coll. (2004). Dans des conditions physiologiques normales, cet échangeur expulse le calcium hors de la cellule en contrepartie de l'entrée de sodium. Il serait co-localisé à proximité des récepteurs à l' IP_3 du réticulum endoplasmique et aurait un rôle essentiel dans l'extrusion du calcium libéré à partir du réticulum endoplasmique. L'ovocyte présente également, au niveau de la membrane plasmique, des canaux calciques dépendant du voltage (VDCC) notamment des canaux de type L et N (Lacerda et coll., 1994).

Les mitochondries pourraient également être impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique dans l'ovocyte de Xénope, notamment dans la régulation de l'initiation des vagues calciques. Elles sont localisées essentiellement au niveau cortical de l'ovocyte, avec des alternances de zones plus ou moins riches. Les « clusters » de récepteurs à IP_3 , au niveau du réticulum endoplasmique, situés à proximité de zones riches en mitochondries, sont rarement à l'origine de l'initiation de vagues calciques (Marchant et coll., 2002).

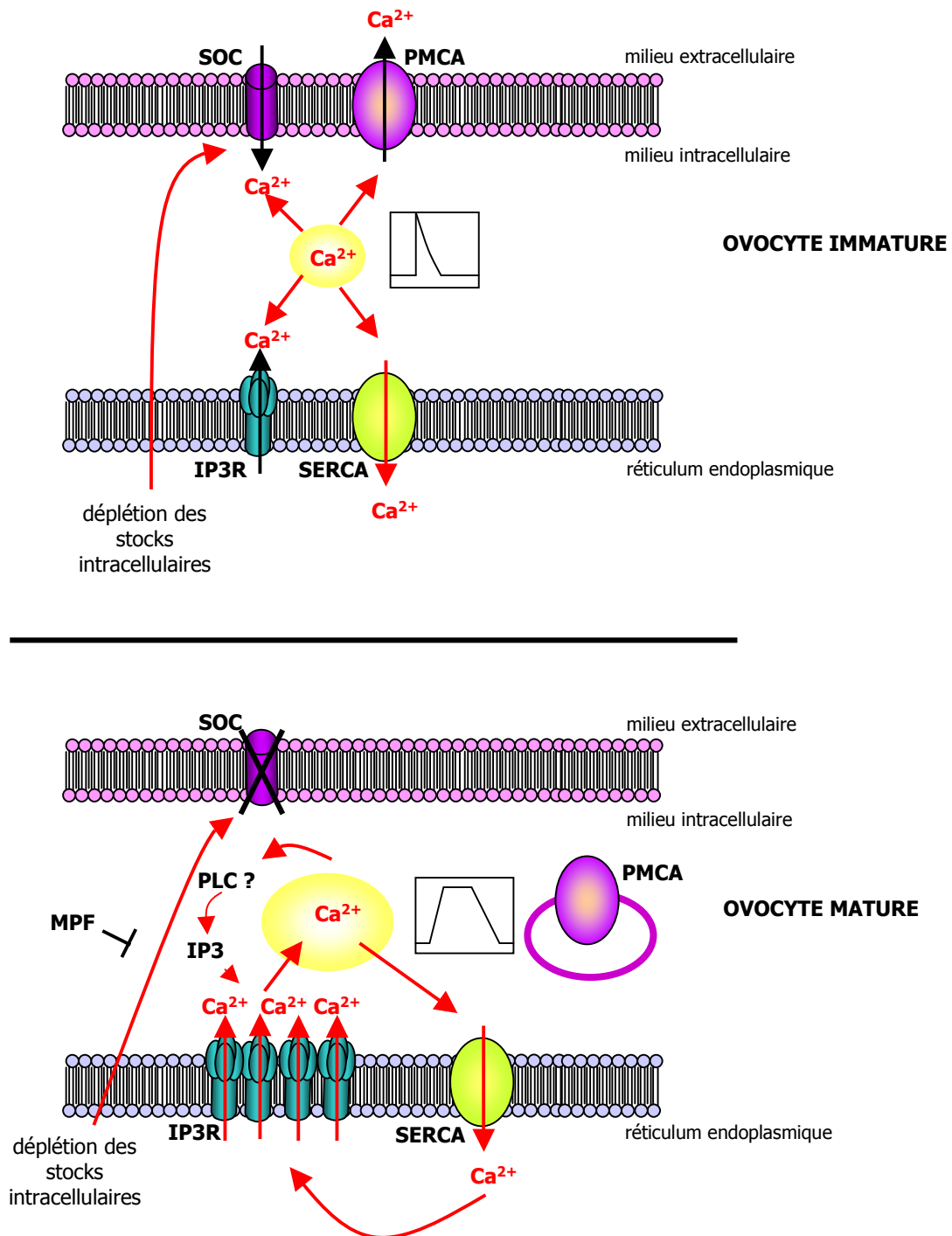
VII.3.3- Modification de la signalisation calcique durant la reprise méiotique de l'ovocyte

Durant la reprise méiotique, la voie de signalisation calcique subit des modifications fonctionnelles. Ces modifications préparent l'augmentation soutenue de calcium qui se produit lors de la fécondation et qui empêche la polyspermie (Kline et Nuccitelli, 1985 ; Kline, 1988) et induit l'exocytose des granules corticaux (Grey et coll., 1976). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire est aussi responsable de la levée du blocage en métaphase II par inactivation du CSF (Meyerhof et Masui, 1979).

Durant la reprise méiotique, l'entrée de calcium suite à l'activation des SOCs (store-operated Ca^{2+} channel) est inhibée (Machaca et Haun, 2000 ; Machaca et Haun, 2002). La micro-injection d' IP_3 induit une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires, qui à la différence des ovocytes immatures, n'est pas suivie d'un influx de calcium dans les ovocytes matures. Le courant I_{SOCE} est inactivé 15 min après la GVBD et reste inactivé jusqu'à la fin de la maturation. L'activation du MPF bloque le couplage entre la déplétion des stocks calciques intracellulaires et l'activation des SOCs (Machaca et Haun, 2002).

Figure 38 : Modifications de la signalisation calcique durant la reprise méiotique

Lors de la reprise méiotique, de nombreuses modifications touchent la voie de signalisation calcique. Les récepteurs à l'IP₃, localisés au niveau du réticulum endoplasmique, se regroupent en cluster. La pompe PMCA, localisée au niveau de la membrane plasmique, est internalisée. Le couplage entre la déplétion des stocks intracellulaires et l'activation des canaux SOCs n'a plus lieu dans les ovocytes matures (d'après El Jouni et coll., 2005).



De plus, la cinétique de libération du calcium dépendante de l'IP₃ est considérablement modifiée durant la reprise méiotique. Les vagues de libération calcique sont ralenties dans les ovocytes matures comparés aux ovocytes immatures (Lechleiter et Clapham, 1992 ; Fontanilla et Nuccitelli, 1998). Elles se propagent de manière saltatoire dans les ovocytes immatures (Callamaras et coll., 1998) et de manière continue dans les ovocytes matures (Nuccitelli et coll., 1993 ; Fontanilla et Nuccitelli, 1998 ; Dawson et coll., 1999). Le regroupement des sites de libération calcique durant la reprise méiotique pourrait expliquer ces différents modes de propagation des vagues calciques (Parys et coll., 1994 ; Kume et coll., 1997 ; Machaca, 2004 ; El Jouni et coll., 2005). Dans les ovocytes immatures, la libération rapide du calcium au niveau d'un site diffuse à un site voisin et induit la libération de calcium au niveau de ce dernier (Lechleiter et Clapham, 1992 ; Callamaras et coll., 1998). Par contre, la proximité physique des sites de libération dans les ovocytes matures conduit à la mise en place d'une vague continue où le calcium libéré au niveau d'un site diffuse sur de longues distances avant d'induire la libération à un site adjacent. Par ailleurs, bien que le calcium soit nécessaire comme co-agoniste pour le récepteur à l'IP₃, de fortes concentrations de calcium régulent négativement ces récepteurs (Bezprozvanny et coll., 1991 ; Mak et coll., 1998). Dans les ovocytes matures, les sites de libération sont proches les uns des autres et de fortes concentrations locales de calcium sont libérées à partir d'un site, lesquelles inhibent les récepteurs du site voisin. Les sites à proximité seront activés seulement quand la concentration locale sera diminuée, ralentissant de ce fait la vitesse de propagation. De plus, la pompe SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase), impliquée dans le remplissage du réticulum endoplasmique en calcium, est retrouvée en « clusters » dans les ovocytes matures (El Jouni et coll., 2005). La pompe PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase), chargée de l'extrusion du calcium dans le milieu extracellulaire, est internalisée et disparaît complètement de la membrane plasmique. Dans les ovocytes matures, elle est retrouvée dans des vésicules localisées sous la membrane plasmique (El Jouni et coll., 2005 ; Figure 38).

L'évolution de la concentration calcique au cours de la reprise méiotique a fait l'objet de plusieurs études (Tableau 6). Alors que certains travaux ont rapporté une augmentation transitoire du calcium durant la reprise méiotique induite par la progestérone (Wasserman et coll., 1980 ; Moreau et coll., 1980), d'autres études n'ont détecté aucune variation de la concentration calcique (Marot et coll., 1976, Bellé et coll., 1977, O'Connor et coll., 1977, Cork et coll., 1987). Une étude plus récente (Duesbery et Masui, 1996) met en évidence l'évolution de la mobilisation calcique au cours la reprise méiotique stimulée par la progestérone : influx de calcium avant d'atteindre 0.45 GVBD₅₀ suivi d'un efflux de calcium

Tableau 6 : Variations de la concentration calcique intracellulaire lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

variations de la concentration calcique intracellulaire lors de la reprise méiotique	outils	références
non	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	O'Connor et coll., 1977
augmentation transitoire	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	Wasserman et coll., 1980
augmentation transitoire	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	Duesbery et Masui, 1996
non	aéqueurine	Bellé, 1977
augmentation transitoire	aéqueurine	Moreau et coll., 1980
non	microélectrode	Robinson, 1985

Tableau 7 : Effet des variations artificielles de calcium sur la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

outils	effets	influence sur la maturation	références
A23187 + $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ élevée	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$	maturation sans stimulation hormonale	Wasserman et Masui, 1975
iontophorèse	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$	maturation sans stimulation hormonale	Moreau et coll., 1976
TMB-8	pas de libération de calcium à partir du RE	pas d'effet	Cork et coll., 1987
EGTA _{EC}	$\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$	retarde la maturation	Gelerstein et coll., 1988
EGTA _{EC}	$\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$	inhibe la maturation	Han et coll., 1995
0-Ca ²⁺ _{EC} +/- EGTA _{EC} ou BAPTA _{EC}	$\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$	pas d'effet significatif	Duesbery et Masui, 1996
micro-injection EGTA + 0-Ca ²⁺ _{EC}	$\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ + $\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$	retarde la maturation	Duesbery et Masui, 1996
antisens dirigé contre récepteur à IP3	pas de libération de calcium à partir du RE	retarde la maturation	Kobrinisky et Kirchberger, 2001
injection IP3 avant stimulation de la maturation	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$	accélère la maturation	Stith et Maller, 1987

jusqu'à 0.65 GVBD₅₀ puis d'un influx de calcium avant le début de la GVBD₅₀. Le niveau de calcium intracellulaire avant la GVBD (mesuré à l'aide du $^{45}\text{Ca}^{2+}$) est multiplié par deux comparé à des ovocytes non traités par la progestérone.

L'influence des variations calciques sur la reprise méiotique a largement été étudiée (Tableau 7). L'exposition de l'ovocyte à un ionophore calcique A23187 (Wasserman et Masui, 1975b) ou à une iontophorèse de calcium dans le cortex de l'ovocyte peut induire la reprise méiotique sans stéroïde (Moreau et coll., 1976). Ces expériences suggèrent que l'augmentation du calcium intracellulaire pourrait être une étape précoce nécessaire lors de la reprise méiotique. Cependant, une faible concentration de calcium intracellulaire accélère la reprise méiotique, et inversement, une concentration intracellulaire de calcium élevée retarde la reprise méiotique (Sun et Machaca, 2004).

L'influence du calcium dans le milieu extracellulaire sur la reprise méiotique reste controversée. Certaines études mettent en évidence que la chélation du calcium extracellulaire avec de l'EGTA retarde (Gelerstein et coll., 1988) ou inhibe (Han et coll., 1995) la reprise méiotique. Cependant, l'incubation des ovocytes avant ou dès la stimulation par la progestérone dans un milieu dépourvu de calcium (additionné ou non d'EGTA ou de BAPTA) n'affecte pas la cinétique de GVBD. Toutefois, la micro-injection d'EGTA dans des ovocytes incubés dans un milieu dépourvu de calcium retarde la reprise méiotique induite par la progestérone. Ainsi, le calcium intracellulaire serait suffisant pour la reprise méiotique (Duesbery et Masui, 1996). La micro-injection d'antisens dirigés contre la partie 5' des récepteurs à l'IP3 retarde la GVBD. Si les ovocytes déficients en récepteurs à l'IP3 sont transfectés par des récepteurs à la ryanodine de muscle squelettique de lapin et stimulés par la caféine, le retard de la GVBD est supprimé (Kobriniski et coll., 1995). La déplétion des stocks calciques intracellulaires par la thapsigargine induit une augmentation du taux de GVBD par la progestérone (Kobriniski et Kirchberger, 2001) et la micro-injection d'IP3 avant la stimulation de la reprise méiotique accélèrent la GVBD (Stith et Maller, 1987).

VII.3.4- Les cibles du calcium intracellulaire lors de la reprise méiotique

Duesbery et Masui (1996) observent que la micro-injection d'EGTA en absence de calcium dans le milieu extracellulaire retarde la GVBD stimulée par la progestérone alors que cela n'a pas d'effet sur la GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme. Ces résultats suggèrent que le calcium est requis pour les mécanismes se situant en amont de l'activation du MPF. Cependant, des travaux plus récents montrent qu'une concentration calcique

intracellulaire élevée retarde la reprise méiotique en régulant négativement l'activation du MPF et de la voie MAPK même si la formation correcte du fuseau méiotique, l'expulsion du premier globule polaire et la progression à travers la méiose I nécessite la présence de calcium (Sun et Machaca, 2004).

Le calcium peut également affecter la reprise méiotique à travers son action sur le cytosquelette. Le taxol, agent polymérisant des microtubules, retarde la reprise méiotique proportionnellement à sa concentration. Ce dernier augmente l'effet inhibiteur de la micro-injection de BAPTA sur la reprise méiotique. A l'inverse, le nocodazole, agent dépolymérisant des microtubules, n'affecte pas la GVBD induite par la progestérone s'il est utilisé seul. Incubés en présence de nocodazole et de l'ionophore A23187, la reprise méiotique stimulée par la progestérone est accélérée. Elle peut être induite par la seule présence de l'ionophore A23187 et du nocodazole sans progestérone alors que la présence seule de l'ionophore A23187 n'induit pas la reprise méiotique (Duesbery et Masui, 1996) sauf si les ovocytes sont placés en présence d'une forte concentration de calcium extracellulaire (10 mM) (Wasserman et Masui, 1975b). Une telle concentration de calcium pourrait suffire à induire la dépolymérisation des microtubules qui joue un rôle clef dans la reprise méiotique. La polymérisation des microtubules pourrait favoriser l'activité de certaines protéines qui se trouvent liées à eux. La PKA, liée aux microtubules *via* Map2 (Leiser et coll., 1986) pourrait voir son activité diminuée lors de la dépolymérisation des microtubules.

VII.4- Variations de pHi associées à la reprise méiotique

De nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer les mécanismes de régulation du pHi de l'ovocyte de Xénope et d'étudier l'effet de différentes substances (bases faibles ou acides faibles) sur le pHi de l'ovocyte et sur la reprise méiotique. Différentes techniques peuvent être utilisées afin de déterminer le pHi de l'ovocyte de Xénope.

VII.4.1- Outils pour mesurer les variations de pHi dans l'ovocyte

II.4.1.1- Le DMO

Dans les années 80, de nombreux travaux ont été réalisés en utilisant le DMO (diméthylloxazolidine dione) radiomarké pour mesurer les variations de pHi. Le DMO est un acide faible qui entre dans la cellule sous sa forme non chargée. A l'intérieur de la cellule, il s'ionise et devient relativement imperméable à la membrane. L'entrée de DMO dans l'ovocyte varie selon le pH_e , une diminution du pH_e augmente la concentration de la forme non

chargée, provoquant une entrée plus importante de DMO dans l'ovocyte. La quantité de DMO entrant dans la cellule doit être déterminée après que l'équilibration dans le milieu ait eu lieu (Houle et Wasserman, 1983). Les ovocytes sont ensuite rincés puis solubilisés. La radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation et la valeur du pH_i est déterminée par l'équation suivante :

$$pH_i = pK_a + \log \left[\frac{[DMO]_i}{[DMO]_e (10^{pH_e - pK_a} + 1) - 1} \right] \quad (\text{Wandel et Butler, 1959})$$

(pK_a pour le DMO = 6.32 ; Boron et Roos, 1976) ; $[DMO]_i$ = concentration en DMO intracellulaire ; $[DMO]_e$ = concentration en DMO extracellulaire ; pH_e = pH extracellulaire)

L'utilisation du DMO présente quelques inconvénients. D'abord, le temps relativement long d'équilibration dans l'ovocyte ne permet pas de faire des mesures de variations rapides du pH_i . De plus, pour que les mesures soient valides, il faut s'assurer que le DMO ne se lie pas à des sites internes. Si tel est le cas, l'augmentation de la concentration en DMO dans le milieu doit produire une augmentation du ratio DMO_i/DMO_e . Enfin, il faut également s'assurer que le DMO, après être entré dans l'ovocyte, n'est pas métabolisé. Des chromatographies réalisées sur des ovocytes immatures et au stade GVBD après incubation en présence de DMO montrent que ce n'est pas le cas (Houle et Wasserman, 1983). La validité de cette technique a été prouvée en comparant les valeurs de pH_i mesurées à l'aide de DMO ou de microélectrodes sélectives au ions (Cicirelli et coll., 1983).

VII.4.1.2- Les sondes fluorescentes

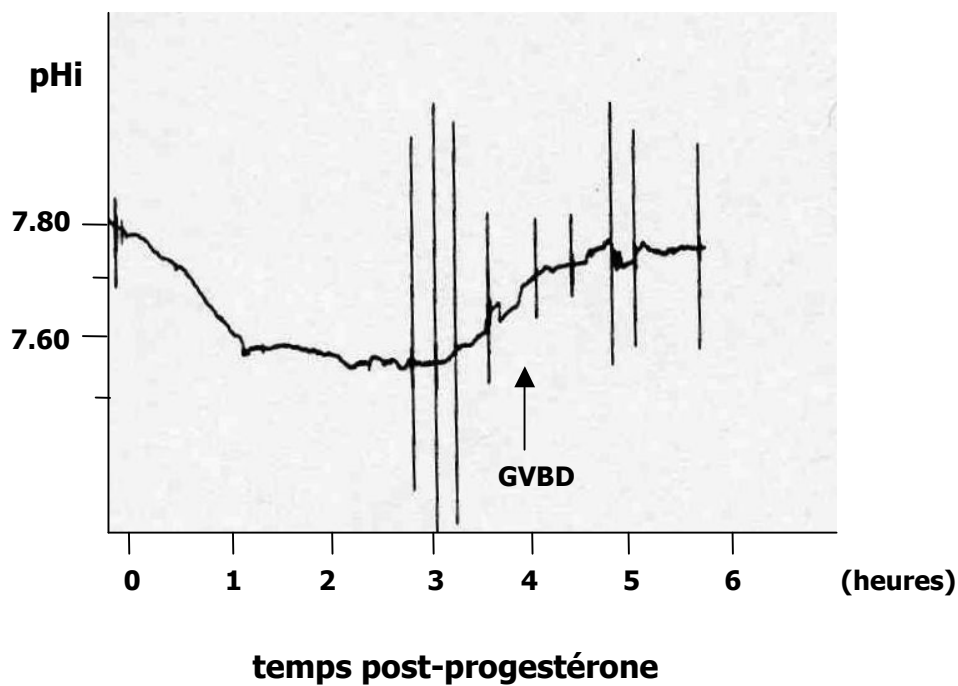
Les sondes fluorescentes sont couramment utilisées pour la détermination du pH_i dans les cellules. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un traceur fluorescent incorporé dans la cellule et dont le spectre de fluorescence varie en fonction du pH. L'un des traceurs fluorescents souvent utilisé pour déterminer le pH_i est la BCECF ((2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceine), un dérivé de la fluorescéine.

Deux images du même champ sont successivement prises à deux longueurs d'onde d'excitation différentes pour une même longueur d'onde d'émission. Le rapport de fluorescence émis aux deux longueurs d'onde sera proportionnel à la concentration en ions hydrogènes. Cette technique nécessite une calibration préalable, réalisée en mesurant le ratio de fluorescence dans des solutions de pH différent.

En pratique, les cellules sont chargées avec un dérivé estérifié de la BCECF capable de passer à travers la membrane des cellules et la fluorescence dans les cellules est mesurée avec un spectrofluoromètre. Les travaux de Sasaki et coll. (1992) ont montré que les ovocytes possèdent les estérases nécessaires pour convertir la BCECF-AM en BCECF et que l'utilisation de tels composés fluorescents est possible pour mesurer les variations de pH_i

Figure 39 : Variation du pHi durant la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

Le pHi augmente transitoirement de 0.2 unités pH avant la rupture de l'enveloppe nucléaire puis revient à sa valeur initiale après la GVBD (mesure effectuée avec des microélectrodes sélectives aux ions hydrogènes ; d'après Lee et Steinhardt, 1981).



dans l'ovocyte de Xénope (Sasaki et coll., 1992 ; Rodeau et coll., 1998). La BCECF non estérifiée peut également être micro-injectée dans les ovocytes.

VII.4.1.3- Les microélectrodes sélectives aux ions hydrogènes

Les microélectrodes sont construites avec du verre particulier, qui est conducteur seulement pour les ions hydrogènes. Pour que les mesures de pH soient valables, il faut s'assurer que seules les surfaces sensibles au pH soient en contact avec le cytoplasme de la cellule. La microélectrode est remplie d'une solution tampon conductrice, reliée avec un fil d'argent à un électromètre. Lorsque l'électrode est introduite dans la cellule, un signal est généré à travers l'électrode qui correspond à la somme du potentiel de membrane et du signal de Nernst fondé sur la différence de pH entre la solution de l'électrode et du cytoplasme. Comme le signal enregistré dépend du pH_i , une microélectrode remplie de KCl est également implantée dans la cellule afin de mesurer le potentiel de membrane. La soustraction entre ces deux mesures permet de déterminer le pH_i . Ce type de microélectrodes en verre a le plus souvent été supplanté par de nouvelles microélectrodes micro-injectées d'une résine sensible aux ions hydrogènes. Le principe de la mesure reste le même mais ces microélectrodes présentent l'avantage d'avoir un diamètre encore plus petit. Il existe également des microélectrodes comprenant deux compartiments qui permettent de mesurer le pH_i et le potentiel de membrane simultanément.

VII.4.2- Variations du pH_i au cours de la reprise méiotique

Au cours de la reprise méiotique, le pH_i augmente de manière transitoire. Dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, Lee et Steinhardt (1981) ont mesuré, avec des microélectrodes sélectives au pH, une augmentation transitoire du pH_i de 0,18 unités pH juste avant la GVBD (Figure 39). Une augmentation de pH_i se produit également dans les ovocytes d'*Ambystoma mexicanum* (Baud et Barish, 1984 ; Rodeau et Vilain, 1986). Deux heures après la stimulation par la progestérone, le pH_i augmente de 0,12 unités. Il atteint sa valeur maximale six heures post-progestérone et revient à sa valeur initiale juste avant la GVBD (Rodeau et Vilain, 1986).

Chez *Xenopus laevis*, la valeur du potentiel de membrane ne semble pas avoir de conséquence sur le pH_i . Des ovocytes qui présentent un potentiel de membrane de -80 mV ou de -60 mV ont, en moyenne, le même pH_i (Lee et Steinhardt, 1981). Par contre, la dépolarisation de la membrane et l'augmentation du pH_i durant la reprise méiotique semblent liées par l'équation suivante (Lee et Steinhardt, 1981) :

$$\Delta E_m \text{ (en mV)} = 1.1 + 125.3 \Delta pHi \text{ (} r^2 = 0.96 \text{)}$$

ΔE_m = différence entre E_m pré-GVBD et E_m initial

ΔpHi = différence entre pHi pré-GVBD et pHi initial

Chez certaines femelles dont les ovocytes présentent un potentiel de membrane hyperpolarisé, la relation entre ΔE_m et le pHi n'est pas retrouvée. Une activité importante de la pompe Na^+ / K^+ pourrait masquer la dépolarisation.

Chez les annélides *Urechis* (Paul, 1975) et *Sabellaria* (Peaucellier, 1978) ainsi que chez les mollusques tels que *Barnea* et *Spisula* (Brassard et coll., 1988 ; Dubé et Guerrier, 1982 ; Ii et Rebhun, 1979). la reprise méiotique est également associée à une alcalinisation. Chez de nombreux mollusques comme la Patelle (Moreau, 1990, Vilain et coll., 1993), *Limaria* (Deguchi et Osanai, 1994) ou *Lottia* (Gould et coll., 2001), l'élévation artificielle du pHi est suffisante pour induire la reprise méiotique. Incubés en présence de NH_4Cl , les ovocytes de Patelle subissent les mêmes événements que lorsqu'ils sont stimulés par la GSS (Gonad-Stimulating Substance ; Moreau et coll., 1990). Le NH_4Cl déclenche la GVBD, la condensation des chromosomes, ainsi que la rétraction des cellules folliculaires. L'augmentation de la synthèse protéique et la phosphorylation des protéines sont également induites lors de l'incubation en présence de NH_4Cl (Néant et Guerrier, 1988).

VII.4.3- Mécanismes impliqués dans l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique

Selon l'équilibre de Nernst, le pH de l'ovocyte immature de Xénope devrait être de 7 alors qu'il est estimé à 7.4, ce qui suggère l'existence d'une régulation du pHi par la cellule. Burckhardt et coll. (1992) ont étudié les mécanismes impliqués dans la régulation de l'homéostasie protonique en analysant le retour à la valeur initiale du pHi après acidification intracellulaire, en présence de différents inhibiteurs de protéines membranaires. Suite à une acidification intracellulaire, la membrane de l'ovocyte se dépolarise. Lorsque la concentration extracellulaire en HCO_3^- est diminuée, la dépolarisation augmente légèrement alors que l'absence de sodium dans le milieu extracellulaire provoque une légère hyperpolarisation. Ces résultats suggèrent que l'ovocyte de Xénope ne présente pas d'échangeur $Na^+(HCO_3)_3$ ou que celui-ci a un rôle négligeable dans l'homéostasie du pHi . L'utilisation d'inhibiteurs de pompe ATPase H^+ , telle que la dicyclohexylcarbodiimide, met en évidence que celle-ci ne joue pas un rôle considérable dans le transport des ions hydrogènes à travers la membrane

Tableau 8 : Valeurs du pHi dans l'ovocyte de Xénope immature et mesure des variations du pHi lors de la reprise méiotique
(N.D. : non déterminé)

valeur moyenne du pHi basal ovocyte immature	valeur extrême du pHi basal ovocyte immature	milieu extracellulaire	Δ pHi mesurée lors de la maturation	outils utilisés	références
7.45 $\pm$ 0.03 5 ovocytes 1 femelle	7.40 - 7.80 femelles différentes	OR2 pH 7.6	0.18	microélectrodes sensible au pH	Lee et Steinhardt, 1981
7.43 $\pm$ 0.03 41 femelles	7.06 - 7.93 41 femelles	N.D.	0.30 $\pm$ 0.03 24 femelles	DMO	Cicirelli et coll., 1983
7.14 $\pm$ 0.17 20 femelles	N.D.	OR2 PH 7.6	0.42 20 femelles	DMO	Houle et Wasserman, 1983
7.34 $\pm$ 0.06 4 ovocytes 1 femelle	N.D.	N.D.	0.11 $\pm$ 0.02 4 ovocytes 1 femelle	DMO	Stith et Maller, 1984
7.35 $\pm$ 0.03 25 ovocytes 6 femelles	7.24 - 7.45 25 ovocytes 6 femelles	OR2 PH 7.6	N.D.	microélectrodes sensibles au pH	Taylor et coll., 1985
7.49 $\pm$ 0.12 15 ovocytes	N.D.	OR2 H 7.9	N.D.	microélectrodes sensibles au pH	Burckhardt et coll., 1991
7.57 $\pm$ 0.05 21 ovocytes	7.13 - 7.97 21 ovocytes	solution Barth pH 7.6	N.D.	BCECF	Sasaki et coll., 1992
7.36 $\pm$ 0.04 16 ovocytes	N.D.	ND pH 7.5	N.D.	BCECF	Rodeau et coll., 1998

de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Le retour au pHi basal, suite à une acidification, est ralenti voir supprimé si les ovocytes sont incubés dans un milieu sans sodium ou contenant de l'amiloride. L'échangeur Na^+/H^+ apparaît ainsi comme le principal mécanisme d'extrusion des ions hydrogènes dans le compartiment extracellulaire (Burckhardt et coll., 1992b).

Chez de nombreuses espèces, l'alcalinisation intracellulaire associée à la reprise méiotique résulte de l'activation du NHE. L'utilisation d'inhibiteurs de cet échangeur, tel que l'amiloride, ou l'incubation dans un milieu dépourvu de sodium permettent de déterminer son implication dans les variations de pHi. Chez de nombreuses espèces, comme *Barnea* et *Spisula* (Ii et Rebhun, 1979 ; Dubé et Guerrier, 1982), *Urechis* (Paul, 1975) et *Sabellaria* (Peaucellier, 1978), l'alcalinisation intracellulaire se produisant durant la reprise méiotique résulte d'un efflux de protons de dans le milieu extracellulaire.

Cependant, des travaux plus récents ont montré que chez les mollusques comme la Patelle aussi bien que chez l'Oursin, le NHE ne semble pas impliqué dans l'alcalinisation intracellulaire lors de la reprise méiotique. Gobet et coll. (1995) évoquent l'implication de vésicules acides trouvées dans le cytoplasme des ovocytes de Patelles ou de Palourdes. Ces dernières pourraient être impliquées dans le pompage des ions hydrogènes cytoplasmiques par des ATPase H^+ de type vacuolaire.

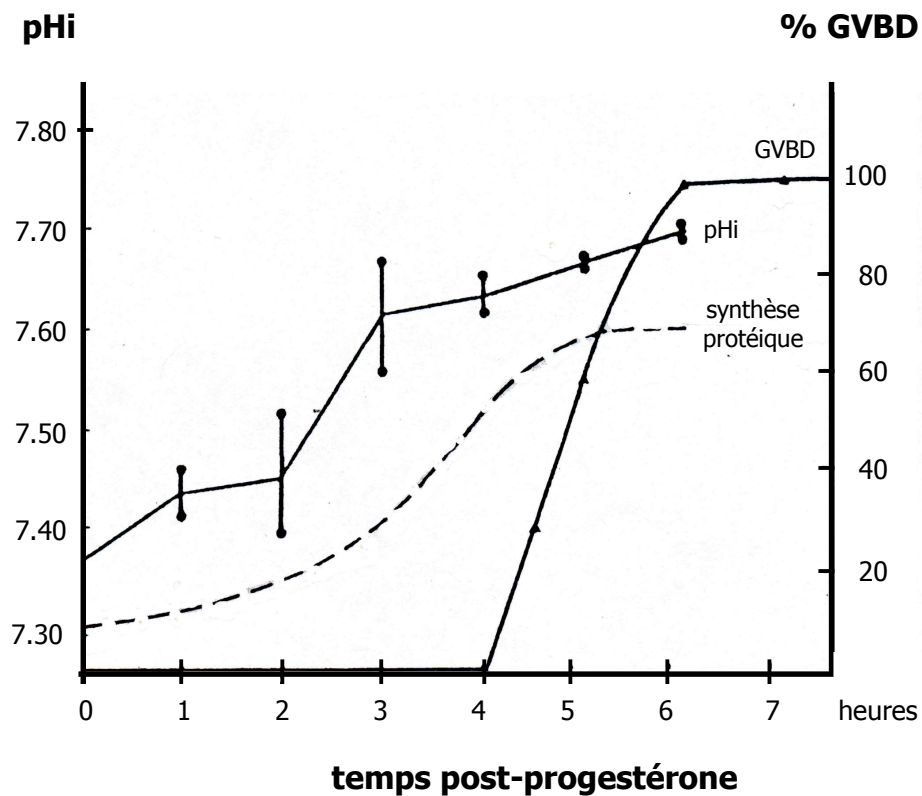
Chez le Xénope, l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique est sous contrôle cytoplasmique. Elle se produit dans les ovocytes énucléés suggérant que l'alcalinisation intracellulaire n'est pas due à une régulation par le noyau ou à la libération d'un facteur nucléaire (Lee et Steinhardt, 1981). Elle a lieu que la reprise méiotique soit stimulée par la progestérone, l'insuline ou la micro-injection de cytoplasme (Lee et Steinhardt, 1981 ; Rezai et coll., 1994). L'augmentation du pHi résulte de l'activation du NHE par phosphorylation (Wasserman et Houle, 1984 ; Stith et Maller, 1985 ; Towle et coll., 1991 ; Rezai et coll., 1994), p39^{Mos} (Rezai et coll., 1994) et Raf 1 (Kang et coll., 1998) seraient impliquées dans la phosphorylation du NHE.

VII.4.4- Rôle de l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique

L'importance de l'augmentation du pHi lors de la reprise méiotique varie selon les espèces. Chez *Spisula*, l'inhibition de l'augmentation du pHi par incubation des ovocytes en présence d'amiloride ou en absence de sodium dans le milieu retarde mais n'inhibe pas la reprise méiotique. Par contre, chez l'Oursin, l'alcalinisation intracellulaire a un rôle pivot lors de la reprise méiotique (Gould et Stephano, 1993 ; Stephano et Goulg, 1997). A l'opposé,

Figure 40 : Variations du pHi et de la synthèse protéique au cours de la reprise méiotique

L'augmentation du pHi (mesurée à l'aide du DMO) se produit avant le début de la synthèse protéique et la GVBD (Houle et Wasserman, 1983). Cependant, contrairement aux enregistrements de pHi réalisés par Lee et Steinhardt (à l'aide de microélectrodes, 1981), Houle et Wasserman ne rapportent pas de diminution du pHi avant la GVBD.



chez l'huître *Crassostrea*, le pHi n'est pas impliqué dans les étapes initiales de la reprise méiotique (Kyojuka et coll., 1997).

Chez *Xenopus laevis*, l'interprétation de l'augmentation du pHi est rendue plus difficile par le fait que le pHi basal et l'amplitude de l'alcalinisation, lors de la reprise méiotique, diffèrent selon les femelles (Tableau 8).

Les ovocytes des femelles injectées de HCG ou de PMSG, dans les jours précédants le prélèvement des ovocytes, présentent un pHi plus élevé : 7.73 contre 7.45 pour les ovocytes des femelles non injectées. Les premiers signes de la GVBD apparaissent plus rapidement dans les ovocytes provenant des femelles injectées (Lee et Steinhardt, 1981). En accord avec ces résultats, Stith et Maller (1984) observent une augmentation de 0.3 unités pH dans les ovocytes des femelles micro-injectées par la PMSG, et une diminution par deux du temps nécessaire pour obtenir la GVBD.

Le pHi semble affecter l'assemblage des microtubules. Chez *Xenopus laevis*, lorsque la reprise méiotique est stimulée par la progestérone, la vésicule germinale migre au pôle animal *via* la mise en place du réseau de microtubules. Si l'augmentation du pHi est inhibée par l'incubation en absence de sodium ou par micro-injection de tampon MOPS pH 6.9, la migration de la vésicule germinative est inhibée de 30% et la formation du fuseau est ectopique. Inversement, la micro-injection de tampon Tris pH 9, qui induit une alcalinisation intracellulaire, provoque la migration de la vésicule germinative dans 25% des cas, en absence de stimulation par la progestérone (Flament et coll., 1996).

Plusieurs études ont porté sur l'influence du pHi sur l'augmentation du taux de synthèse protéique lors de la reprise méiotique. Dans l'ovocyte de Xénope, l'augmentation du pHi précède l'augmentation de la synthèse protéique (Figure 40). 50 % de l'augmentation maximale du pHi a lieu deux heures et demie avant la GVBD₅₀ et une heure avant d'atteindre 50 % de l'augmentation maximale de la synthèse protéique (Houle et Wasserman, 1983).

Dans les ovocytes immatures, la diminution artificielle du pHi affecte peu la synthèse protéique sauf pour des valeurs inférieures à 7, où le taux de synthèse protéique diminue fortement. Des mêmes variations de pHi réalisées sur des ovocytes au stade GVBD ne modifient pas le taux de synthèse protéique (Houle et Wasserman, 1983). L'augmentation de la synthèse protéique au cours de l'ovogenèse ne requiert pas une augmentation de pHi. Les ovocytes de stade III-IV ont un pHi de 7.39 et les ovocytes de stade VI présentent un pHi 7.35. Pourtant, entre les stades III et VI, le taux de synthèse protéique augmente d'au moins huit fois (Taylor et coll., 1985). De même, le pHi n'est pas impliqué dans la phosphorylation de la protéine S6 (Stith et Maller, 1984 ; Taylor et coll., 1985).

OBJECTIFS GENERAUX

Objectifs généraux

Selon des études réalisées dans les années 1980, le traitement des ovocytes de Xénope avec des drogues, comme la triméthylamine, la méthylamine, la procaine et l'imidazole, déclenche la reprise méiotique sans apport hormonal mais dans un laps de temps beaucoup plus long que la maturation induite par la progestérone (Lee et Steinhardt, 1981 ; Houle et Wasserman, 1983 ; Flament et coll., 1997). Selon Lee et Steinhardt (1981) et Houle et Wasserman (1983), ces drogues étaient supposées alcaliniser les ovocytes. A l'inverse, une acidification intracellulaire des ovocytes par le NH_4Cl retarde voire inhibe la reprise méiotique (Lee et Steinhardt, 1981). L'acétate de sodium produit sur les ovocytes les mêmes effets : acidification intracellulaire et inhibition de la maturation (Houle et Wasserman, 1983).

Les conclusions issues de ces travaux doivent être fortement remises en question puisque des travaux récents réalisés par des laboratoires différents ont montré que la triméthylamine (Burckhardt et Thelen, 1995), la procaine (Rodeau et coll., 1998) et d'une manière générale, les bases faibles n'induisent pas une alcalinisation, mais une acidification intracellulaire des ovocytes de Xénope (Burckhardt et Thelen, 1995).

Si la procaine déclenche l'activation transitoire du MPF dans les ovocytes de Xénope, la micro-injection de tampons alcalins n'induit pas la reprise méiotique (Flament et coll., 1996). En présence de procaine seule, la GVBD se produit sans apparition de tache de maturation : la formation du fuseau et la condensation des chromosomes sont observées dans le cytoplasme (Flament et coll., 1997). La position ectopique de ces structures est expliquée par l'absence d'alcalinisation dans les ovocytes. En effet, des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont montré que (1) la procaine induit une acidification intracellulaire (Rodeau et coll., 1998) et (2) l'alcalinisation intracellulaire est requise pour la migration de la vésicule germinative à la membrane plasmique (Flament et coll., 1996).

Dans la continuité de ces travaux, je me suis attachée à déterminer les voies biochimiques sensibles aux variations du pHi lors de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. Je me suis focalisée sur les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'entrée en phase M.

L'acidification intracellulaire a été induite par incubation des ovocytes en présence de NH_4Cl 1 et 10 mM (Lee et Steinhardt 1981; Sasaki et coll., 1992 ; Burckhardt et Thelen, 1995 ; Rodeau et coll., 1998) ou par micro-injection de tampon MOPS pH 6.9 (Flament et

Objectifs généraux

coll., 1996). L'augmentation du pHi a été réalisée par la micro-injection de tampon Tris pH 9 (Flament et coll., 1996) ou par incubation des ovocytes dans un milieu physiologique à pH 9. Les effets des variations de pHi ont été étudiés sur la durée d'obtention de la GVBD, sur les événements cytologiques de la maturation (condensation des chromosomes et formation du fuseau) et sur les activations du MPF et de la voie $p39^{Mos}$ -Xp42^{Mpk1}.

Notre attention s'est portée, dans un premier temps, sur les relations entre la boucle d'auto-amplification du MPF et la voie $p39^{Mos}$ -Xp42^{Mpk1}. Différentes stratégies ont été utilisées : micro-injection d'antisens Morpholino dirigés contre $p39^{Mos}$, incubation des ovocytes en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique (cycloheximide) ou d'un inhibiteur de Mek (U0126) afin d'inhiber la voie $p39^{Mos}$ -Xp42^{Mpk1}.

Nous avons ensuite tenté d'apprécier les différences de sensibilité des voies MPF et $p39^{Mos}$ -Xp42^{Mpk1} face aux variations de pHi. Pour cela, nous avons testé l'effet des variations de pHi dans différentes conditions de stimulation de la maturation : progestérone, micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures ou micro-injection de MAPK active. Nous avons analysé les effets des modifications de pHi sur la synthèse protéique en étudiant l'accumulation de deux protéines dont le mode de synthèse est différent : $p39^{Mos}$ et Aurora A/Eg2. De plus, nous avons analysé les conséquences d'une diminution de pHi sur la dégradation de la protéine CPEB.

Dans les ovocytes de Xénope, un milieu physiologique acide déclenche une augmentation du calcium (Woodward et Miledi, 1992). Des travaux menés sur la reprise méiotique montrent que des concentrations calciques intracellulaires élevées retardent la GVBD ainsi que les activations de la voie Xp42^{Mpk1} et du MPF (Sun et Machaca, 2004). La seconde partie de mon travail a consisté à étudier l'effet des variations de pHi sur le niveau de calcium intracellulaire. Nous avons testé l'hypothèse que les effets observés avec les variations de pHi puissent être dus à une perturbation de l'homéostasie calcique. Ainsi, nous avons exploré le lien entre les événements ioniques et moléculaires lors de l'entrée en phase M.

RESULTATS

PARTIE I :

MODULATION DE LA REPRISE
MEIOTIQUE PAR DES VARIATIONS
ARTIFICIELLES DE pHi

Partie I : Modulation de la reprise méiotique par des variations artificielles de pHi

I.I – Contexte des recherches

A l'instar de la transition G2/M des cellules somatiques, la reprise méiotique des ovocytes de Xénope est accompagnée d'une augmentation transitoire du pHi de 0,2 unités pH. L'alcalinisation transitoire se produit juste avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (Lee et Steinhardt, 1981).

Plusieurs études réalisées dans les années 80 ont mis en évidence que des variations de pHi peuvent affecter la reprise méiotique. La diminution de pHi induite par l'acétate de sodium ou le NH_4Cl retarde ou inhibe la GVBD stimulée par la progestérone (Lee et Steinhardt, 1981) alors que l'augmentation du pHi a un effet facilitateur sur la reprise méiotique (Cicirelli et coll., 1983). Les auteurs se sont essentiellement focalisés sur l'influence du pHi sur la synthèse protéique (Lee et Steinhardt, 1981 ; Houle et Wasserman, 1983 ; Cicirelli et coll., 1983 ; Stith et Maller, 1984 ; Taylor et coll., 1985). Des variations de pHi comprises entre 7.05 et 8.88 (induites par des variations de pHe) n'affectent pas la synthèse protéique globale (Cicirelli et coll., 1983). Cependant, les travaux effectués par Houle et Wasserman (1983) mettent en évidence qu'une diminution du pHi en-dessous de 7 (obtenue par diminution du pHe) diminue de manière importante le taux de synthèse protéique dans des ovocytes immatures (19.5 ng/heure dans les ovocytes contrôles présentant un pHi 7.34 ; 9.3 ng/heure dans les ovocytes présentant un pHi 6.95). Si une même variation de pHi est réalisée sur des ovocytes au stade GVBD, la diminution de pHi n'a pas d'effet sur le taux de synthèse protéique : 38.7 ng/heure pour les ovocytes contrôles (pHi de 7.52) et 37.5 ng/heure pour les ovocytes ayant subi une acidification intracellulaire (pHi de 6.91). Ainsi, les ovocytes qui ont subi la GVBD ne nécessitent plus un pHi élevé pour maintenir un haut taux de synthèse protéique (Houle et Wasserman, 1983).

Dans les cellules somatiques, les variations de pHi jouent également un rôle important dans la régulation de l'entrée en phase M. L'alcalinisation intracellulaire, résultant de l'activation du NHE, est un phénomène précoce et universel lors de la réponse à un stimulus mitotique (Putney et coll., 2002). La prolifération cellulaire induite par des facteurs de croissance est diminuée dans des cellules présentant un NHE déficient dans le transport de l'ion hydrogène (Pouyssegur et coll., 1984 ; Kapus et coll., 1994) et dans des cellules

traitées par un inhibiteur du NHE (Bussolino et coll., 1989 ; Delvaux et coll., 1990 ; Horvat et coll., 1992). L'augmentation du pHi est également corrélée avec l'activation de proto-oncogènes. Le produit de l'oncogène p21^{Ras}, injecté dans des fibroblastes NIH3T3, induit une augmentation rapide et soutenue du pHi (0.17 unités pH). Si celle-ci est supprimée par l'utilisation d'inhibiteur du NHE, les mitoses induites par la micro-injection de p21^{Ras} sont inhibées (Hagag et coll., 1987).

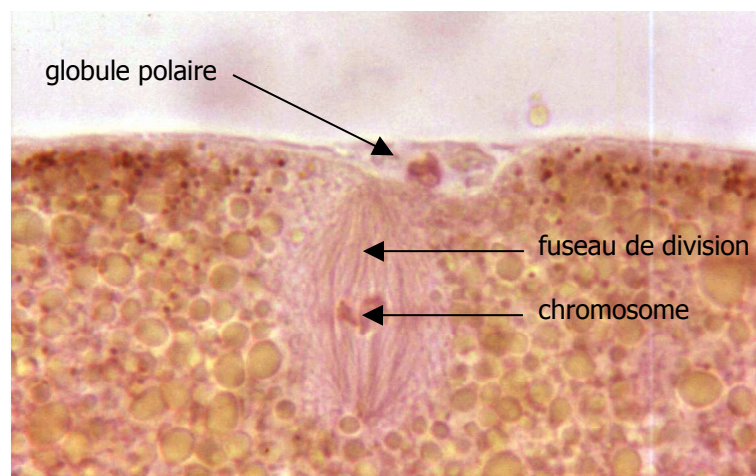
Cependant, le contrôle de l'entrée en phase M par le pHi n'est pas clairement compris et les mécanismes qui retardent ou inhibent l'entrée en phase M, suite à une diminution de pHi, ne sont pas formellement identifiés. Dans ces conditions, nous avons analysé les effets de variations artificielles du pHi sur certains processus essentiels de la régulation de l'entrée en phase M dans l'ovocyte de Xénope.

Différents outils ont été utilisés pour acidifier le cytoplasme de l'ovocyte : la micro-injection de tampon MOPS (à différents pH), l'incubation des ovocytes en présence de NH₄Cl ou dans du ND pH 6. Dans la plupart des cellules, l'exposition en présence de NH₄Cl induit une alcalinisation intracellulaire. Ces variations de pHi, initialement observées dans les axones géants de calmars, sont dues à une perméabilité membranaire plus importante pour les ions NH₃ que les ions NH₄⁺ (Boron et De Weer, 1976). Dans l'ovocyte de Xénope, de nombreuses études ont mis en évidence que la membrane plasmique est principalement perméable aux ions NH₄⁺, ce qui est responsable d'une acidification intracellulaire après l'exposition au NH₄Cl (Burckhardt et Frömter, 1992 ; Burckhardt et coll., 1992a ; Sasaki et coll., 1992 ; Burckhardt et Thelen, 1995 ; Cougnon et coll., 1996, 2002 ; Burckhardt et Burckhardt, 1997 ; Nakhoul et coll., 2001). L'incubation en présence de NH₄Cl 10 mM provoque une acidification intracellulaire d'environ 0.4 unités pH dans l'ovocyte de Xénope (Lee et Steinhardt 1981 ; Sasaki et coll., 1992 ; Burckhardt et Thelen, 1995).

Des travaux réalisés par notre équipe montrent que la micro-injection de tampon MOPS pH 6.9 induit une diminution du pHi de 7.46 ± 0.10 à 7.16 ± 0.08 et inhibe l'acidification intracellulaire induite par l'addition de NH₄Cl 10 mM (Flament et coll., 1996). A l'inverse, la micro-injection de tampon Tris pH 9 induit une augmentation du pHi à une valeur de 8.08 ± 0.14 alors que la micro-injection de tampon Tris pH 8 ne provoque pas de différence significative du pHi (Flament et coll., 1996).

L'utilisation de stimuli différents pour déclencher la maturation (progestérone, micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures, micro-injection de MAPK constitutivement

Figure 41 : Effets du NH_4Cl 10 mM sur les événements cytologiques de la reprise méiotique stimulée par la progestérone



Les ovocytes matures traités par le NH_4Cl 10 mM, avant stimulation de la maturation par la progestérone, présente un fuseau bipolaire ancré à la membrane, des chromosomes condensés ainsi qu'un globule polaire.

Tableau 9 : Analyses cytologiques des ovocytes stimulés par la progestérone et traités par le NH_4Cl

Les ovocytes incubés ou non en présence de NH_4Cl sont prélevés 16 heures post-progestérone. Leur analyse cytologique (coloration rouge picro-indocarmin) ne révèle pas d'anomalie dans la formation du fuseau ou dans la condensation des chromosomes bien que ces événements soient retardés par l'acidification intracellulaire.

traitement	N ovocytes / N femelles	VG	absence de structure	fuseau de métaphase (MI et MII)	reformation de l'enveloppe nucléaire
progestérone	22/3	13.6 %	4.6 %	81.8 %	0 %
NH_4Cl 1 mM + progestérone	21/3	33.3 %	9.5 %	57.2 %	0 %
NH_4Cl 10 mM + progestérone	35/3	77.1 %	2.8 %	14.4 %	5.7 %

active) nous a permis d'appréhender la sensibilité de plusieurs mécanismes impliqués dans le contrôle de l'entrée en phase M face aux variations de pHi.

Les résultats obtenus ont été publiés dans *Journal of Cellular Biochemistry* (Publication 1) et pour partie dans *Developmental Biology* (Publication 2). Ces résultats sont, ici, complétés par des données non publiées.

I.2- Résultats

L'acidification intracellulaire, induite par le NH_4Cl 1 ou 10 mM, provoque un retard significatif de la GVBD stimulée par la progestérone qui est proportionnel à la diminution du pHi (Publication 1 : Table 1 ; Figure 1A). Afin de confirmer que le retard est dû à une diminution de pHi, nous avons induit une acidification intracellulaire par micro-injection de tampon MOPS pH 6.9. Des résultats similaires sont obtenus, la GVBD₅₀ des ovocytes micro-injectés de tampon MOPS pH 6.9 est retardée d'un facteur 3.20 par rapport aux ovocytes contrôles micro-injectés d'eau.

Les activations du MPF et la voie p39^{Mos} - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ ont été étudiées après acidification intracellulaire afin de déterminer si le retard de la GVBD stimulée par la progestérone est associé à une modification des événements biochimiques de la reprise méiotique. Compte tenu du faible taux final de GVBD en présence de NH_4Cl 10 mM, nous avons étudié les conséquences de la diminution de pHi pour une concentration de 1 mM de NH_4Cl . Dans ces conditions, la phosphorylation de la cycline B2 et la déphosphorylation du résidu tyrosine 15 de Cdk 1 sont retardées d'environ 4 - 5 heures. Le même retard est observé pour la synthèse et l'accumulation de p39^{Mos} et la phosphorylation de $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ et de p90^{Rsk} (Publication 1 : Figure 1 B).

Simultanément à ces analyses biochimiques, nous avons étudié l'effet de la diminution du pHi sur les événements cytologiques associés à la reprise méiotique. L'acidification intracellulaire ne provoque pas d'anomalie : les structures classiques de méiose sont observées mais leurs formations sont retardées (Figure 41 ; Tableau 9).

L'effet du NH_4Cl sur la reprise méiotique a été étudié après avoir tamponné le pHi de l'ovocyte par micro-injection de tampon MOPS pH 7.7. L'apparition des taches de maturation des ovocytes micro-injectés de tampon MOPS pH 7.7 n'est pas significativement différente des ovocytes contrôles (Publication 1 : Figure 2A). Lorsque les ovocytes sont incubés en présence de NH_4Cl 1 mM, la GVBD est retardée. Ce retard est prévenu si les ovocytes sont, au préalable, micro-injectés de tampon MOPS pH 7.7. Les états d'activation du MPF et de la

voie Xp42^{Mpk1} ont été analysés en fin d'expérience (Publication 1 : Figure 2B). Ni la micro-injection de MOPS pH 7.7, ni l'incubation en présence de NH₄Cl 1 mM n'empêchent l'activation du MPF ou de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1}.

Parallèlement, nous avons testé l'effet de l'alcalinisation intracellulaire sur la reprise méiotique induite par la progestérone. Alors que la micro-injection de tampon Tris pH 8.5 n'affecte pas la cinétique de GVBD, la micro-injection de tampon Tris pH 9 accélère la GVBD d'environ une heure (Publication 1 : Figure 3 A et B). Des résultats similaires ont été obtenus en incubant les ovocytes dans du ND pH 9 : la GVBD est accélérée d'environ une heure. L'accélération de la reprise méiotique est corrélée avec une activation plus précoce du MPF, de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk}, de même, l'accumulation de p39^{Mos} est accélérée (Publication 1 : Figure 3 C). Ces événements se produisent deux heures plus tôt si les ovocytes sont micro-injectés de tampon Tris pH 9.

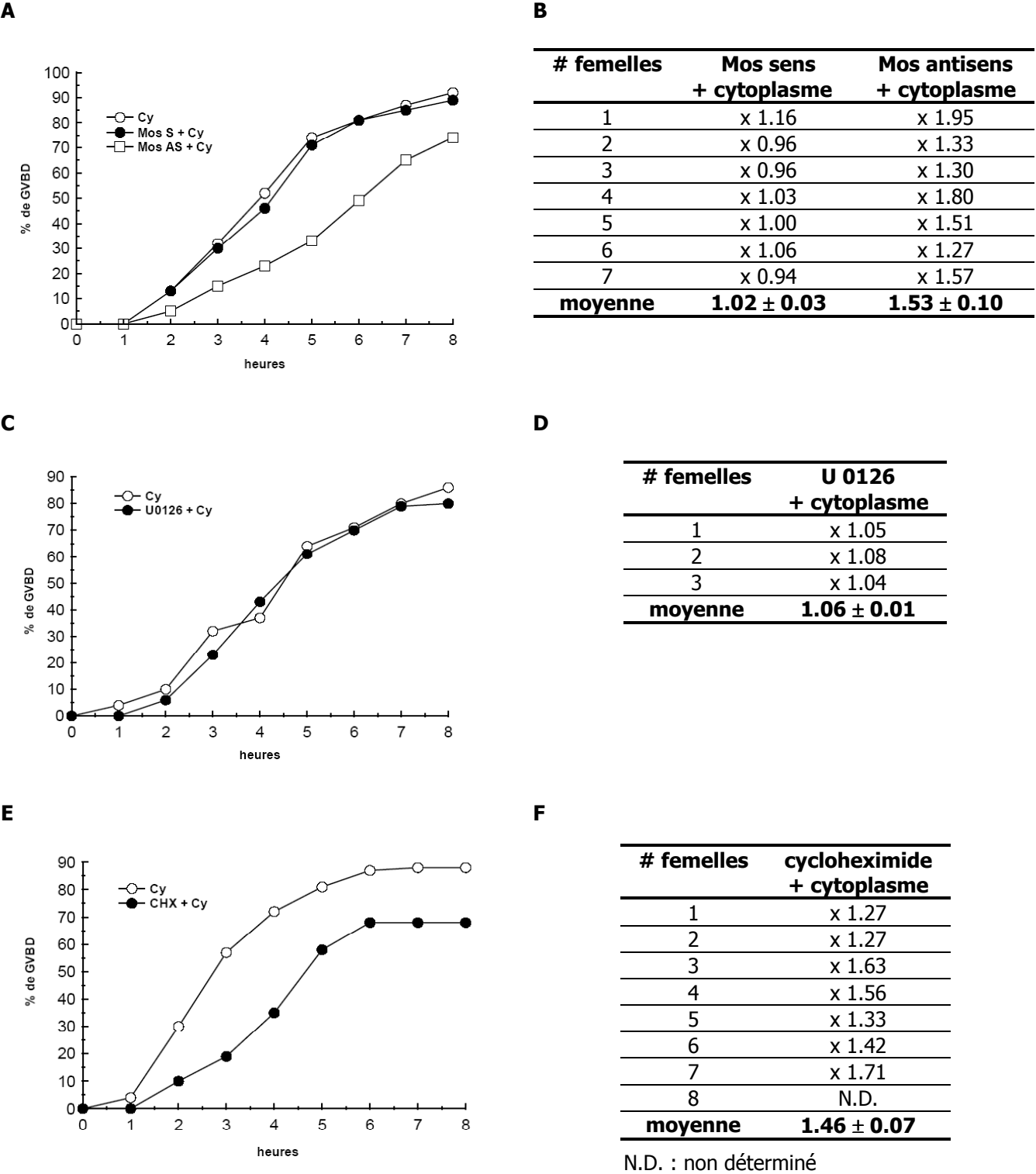
En conclusion, lorsque la maturation est stimulée par la progestérone, les activations du MPF et de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1}, ainsi que la GVBD sont accélérées par une alcalinisation intracellulaire et retardées par une acidification intracellulaire. Cependant, l'activation de ces deux voies par la progestérone est interconnectée : le MPF stimule la polyadénylation de p39^{Mos} et la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} participe à l'activation du MPF en inhibant Myt1. Dans ces conditions, nous avons cherché un contexte cellulaire nous permettant d'étudier l'effet des variations de pH_i séparément sur l'activation de chacune de ces deux voies.

La micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures induit la GVBD dans des ovocytes, même si ces derniers sont incubés en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (Masui et Markert, 1971 ; Wasserman et Masui, 1975a). Ces résultats suggèrent que, dans ces conditions, la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} n'est probablement pas indispensable pour la reprise méiotique et l'activation du MPF. Pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, nous avons analysé les conséquences d'une inhibition de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} sur la reprise méiotique induite par micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Différents outils ont été utilisés : micro-injection d'oligonucléotides antisens du type Morpholino dirigés contre p39^{Mos} (prévient la synthèse de p39^{Mos}), la cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique, qui, par conséquent, prévient la synthèse de p39^{Mos}), et l'U0126 (un inhibiteur de l'activité de Mek).

La GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures est retardée par la micro-injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre p39^{Mos} (10 ng/ovocyte ; GVBD₅₀ = 1.53 ± 0.10 GVBD₅₀ des ovocytes contrôles) alors que la micro-injection

Figure 42 : Effets de l'inhibition de la voie $Xp42^{Mpk1}$ sur la GVBD induite par l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures

(A) La synthèse de $p39^{Mos}$ est inhibée par l'injection de morpholino antisens dirigés contre $p39^{Mos}$, les contrôles sont injectés de morpholino sens Mos avant d'induire la maturation par injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Les ovocytes sont incubés en présence d'U0126 (n= 3 femelles) (C) ou de cycloheximide (n= 8 femelles) (D) avant d'induire la maturation par injection de cytoplasme d'ovocytes matures, (B, D, F) valeurs relatives de GVBD₅₀.



d'oligonucléotides sens n'affecte pas la reprise méiotique ($GVBD_{50} = 1.02 \pm 0.03$ $GVBD_{50}$ des ovocytes contrôles, Figure 42 A et B). Lorsque les ovocytes sont incubés en présence d'U0126 (50 μ M), la cinétique de GVBD est identique à celle des ovocytes contrôles ($GVBD_{50} = 1.06 \pm 0.01$ $GVBD_{50}$ des ovocytes contrôles, Figure 42 C et D). Par contre, l'incubation des ovocytes en présence de cycloheximide (100 μ M) provoque un retard significatif de la reprise méiotique ($GVBD_{50} = 1.46 \pm 0.07$ $GVBD_{50}$ des ovocytes contrôles, Figure 42 E et F).

L'inhibition des différents modules de la voie $Xp42^{Mpk1}$ a été vérifiée par Western blot (Figure 43 A). Les phosphorylations de $Xp42^{Mpk1}$ et $p90^{Rsk}$, et par conséquent leur activation, sont observées dans les ovocytes contrôles micro-injectés de cytoplasme d'ovocytes matures (Cy) ainsi que dans les ovocytes micro-injectés d'oligonucléotides sens de $p39^{Mos}$ (S Mos + Cy). Par contre, les phosphorylations de $Xp42^{Mpk1}$ et $p90^{Rsk}$ sont inhibées dans les ovocytes incubés en présence de cycloheximide (CHX + Cy), d'U0126 (U0126 + Cy) et dans les ovocytes micro-injectés d'oligonucléotides antisens dirigés contre $p39^{Mos}$ (AS Mos + Cy). Ces résultats confirment que les activations de $Xp42^{Mpk1}$ et $p90^{Rsk}$ sont inhibées par ces trois traitements. L'analyse de $p39^{Mos}$ montre que celle-ci est accumulée dans les ovocytes micro-injectés de cytoplasme d'ovocytes matures traités ou non par l'U0126 (U0126 + Cy). Par contre, elle n'est pas détectée dans les ovocytes incubés en présence de cycloheximide (CHX + Cy).

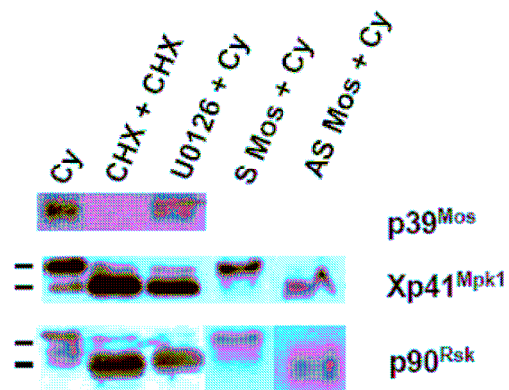
Nous avons également analysé l'activation du MPF en présence de ces trois traitements afin de déterminer si la voie $p39^{Mos}$ - $Xp42^{Mpk1}$ est requise pour son activation (Figure 43 B). La phosphorylation de la cycline B2 se produit une heure après la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures que les ovocytes soient incubés en cycloheximide, en U0126 ou micro-injectés d'oligonucléotides antisens dirigés contre $p39^{Mos}$. Cependant, lorsque les ovocytes sont micro-injectés d'oligonucléotides antisens de $p39^{Mos}$, la forme non phosphorylée des cyclines B2 apparaît de une heure trente à deux heures trente après la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures alors qu'elle n'est pas détectée dans les ovocytes contrôles. Lorsque les ovocytes sont incubés en cycloheximide, la forme non phosphorylée de la cycline B2 réapparaît plus tardivement que dans les ovocytes contrôles. De plus, la cycline B2 est faiblement détectée six heures après la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures, probablement à cause de sa dégradation lors de la transition métaphase-anaphase et de son absence de synthèse due à la cycloheximide. En présence d'U0126, la forme non phosphorylée de la cycline est de nouveau détectée comme dans les conditions contrôles, deux heures après la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes

Figure 43 : Effets de la cycloheximide, de l'U0126 et de la micro-injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre p39^{Mos} sur les activations de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} et du MPF induites par l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures

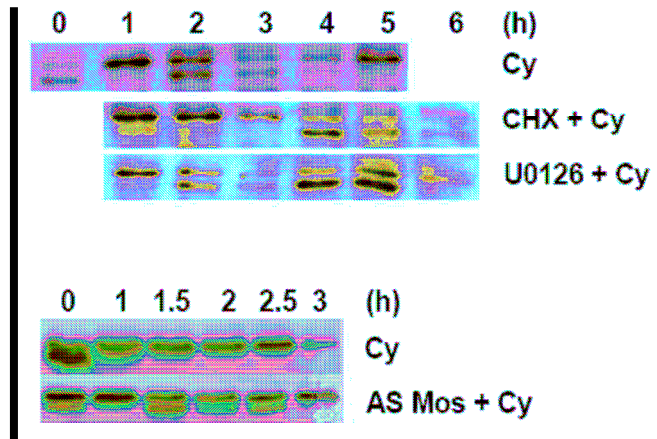
(A) Les ovocytes sont prélevés en fin d'expérience et les états de phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et de p90^{Rsk} ainsi que l'accumulation de p39^{Mos} sont analysées par western blots.

(B) La phosphorylation de la cycline B2 induite par injection de cytoplasme d'ovocytes matures (Cy) est analysée par western blots dans des ovocytes traités en cycloheximide (CHX), en U0126 ou micro-injectés d'oligonucléotides antisens de type Morpholino dirigés contre p39^{Mos} (AS Mos).

A



B



matures mais la forme phosphorylée réapparaît plus tardivement que dans les ovocytes contrôles.

Ces résultats indiquent que l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF stimulée par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures est indépendante de la voie $p39^{\text{Mos}}$ - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$, bien que cette dernière pourrait jouer un rôle la réactivation du MPF lors de la transition métaphase-anaphase. Dans ces conditions, nous avons pu tester l'effet des variations de pHi sur la boucle d'auto-amplification du MPF.

A la différence de la stimulation par la progestérone, la GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures n'est pas retardée par le NH_4Cl 1 mM. Par contre, le NH_4Cl 10 mM retarde la GVBD (Publication 1 : Figure 4 A et B, Table 2) alors que l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF n'est pas affectée par l'acidification intracellulaire (Publication 1 : Figure 4 C). La micro-injection de Tris pH 9, qui induit une alcalinisation intracellulaire, n'accélère pas la GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures (Publication 1 : Figure 5 A) ni l'activation du MPF (Publication 1 : Figure 5 B). Ainsi, la boucle d'auto-amplification du MPF n'est sensible ni à l'acidification ni à l'alcalinisation intracellulaires.

La micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures entraîne la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ et l'activation de la voie $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ (Publication 1 : Figure 6). La présence de NH_4Cl 1 mM n'affecte pas l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ et les phosphorylations de $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ et de $p90^{\text{Rsk}}$ alors qu'en présence de NH_4Cl 10 mM, $p39^{\text{Mos}}$ est détectée une heure plus tard et les phosphorylations de $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ et $p90^{\text{Rsk}}$ sont retardées et restent partielles.

Ainsi, l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ et l'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}$ - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ sont retardées par l'acidification intracellulaire (NH_4Cl 10 mM) alors que la boucle d'auto-amplification du MPF apparait comme un processus insensible aux variations de pHi. Nous avons émis l'hypothèse que l'acidification intracellulaire retarde l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ par un effet pH sur la synthèse des protéines qui nécessite la polyadénylation de leur ARNm. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les effets de la diminution de pHi sur la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ et sur celle de Aurora A/Eg2. Eg2 est une protéine de la famille des Aurora A kinases qui est accumulée pendant la maturation (Paris et coll., 1991). Cependant la polyadénylation de son ARNm n'est pas nécessaire pour sa synthèse et son accumulation (Frank-Vaillant et coll., 2000).

En accord avec les résultats de Frank-Vaillant et coll. (2000), nous avons observé que Aurora A/Eg2 est présente en faible quantité dans les ovocytes arrêtés en prophase I et

Figure 44 : Accumulation de Aurora A/Eg2 au cours de la reprise méiotique induite par la progestérone

L'accumulation de Aurora A /Eg2 est détectée par western blot après stimulation de la maturation par la progestérone dans des ovocytes incubés en présence de progestérone (Pg) ou en présence de progestérone et de NH_4Cl 10 mM (N 10 mM + Pg).

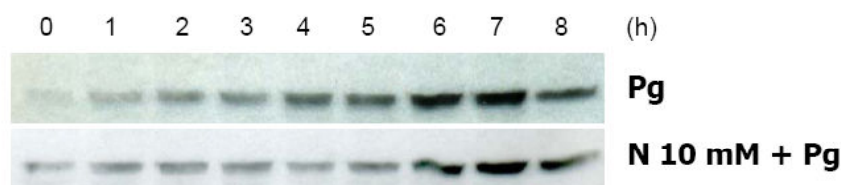


Figure 45 : Effets de l'inhibition de la synthèse protéique et du NH_4Cl sur la GVBD stimulée par injection de cytoplasme d'ovocytes matures

Les ovocytes sont incubés en présence de cycloheximide (CHX) et/ou de NH_4Cl 10 mM (N 10 mM) avant d'être micro-injectés de cytoplasme d'ovocytes matures (Cy) (n = 3 femelles).

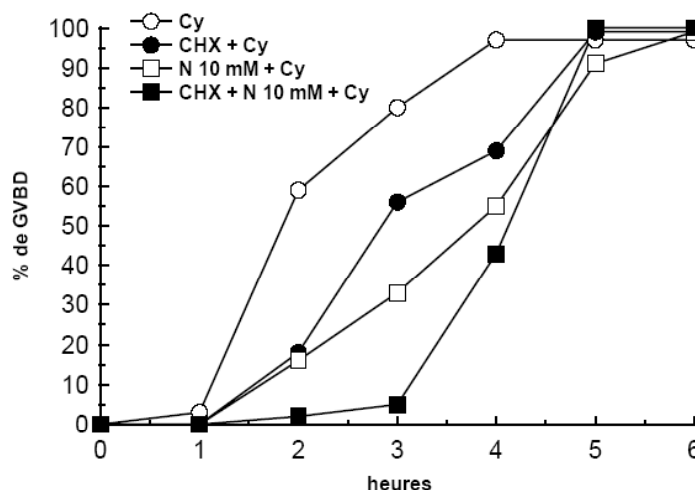


Tableau 10 : Effets de l'inhibition de la synthèse protéique et du NH_4Cl sur la GVBD₅₀ induite par injection de cytoplasme d'ovocytes matures

# femelles	cycloheximide + cytoplasme	NH_4Cl 10 mM + cytoplasme	cycloheximide + NH_4Cl 10 mM + cytoplasme
1	1.33	2.48	2.61
2	1.42	1.36	1.76
3	1.50	1.43	2.29
moyenne	1.42 ± 0.05	1.76 ± 0.36	2.22 ± 0.25

qu'elle est accumulée au cours de la reprise méiotique. Bien que l'acidification induite par le NH_4Cl 10 mM retarde fortement la cinétique de GVBD, l'accumulation de Aurora A/Eg2 ne semble pas affectée par l'acidification (Figure 44). L'intensité du signal s'accroît au cours du temps, que les ovocytes soient traités ou non par le NH_4Cl 10 mM. Ces résultats suggèrent que l'acidification intracellulaire n'affecte pas la synthèse protéique de manière globale mais plutôt la synthèse des protéines dont la traduction repose sur la polyadénylation de leur ARNm.

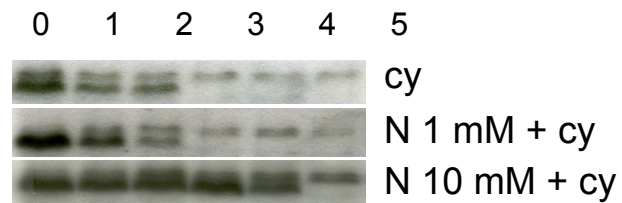
Afin de déterminer si l'acidification intracellulaire pourrait affecter d'autres processus que la synthèse protéique, nous avons testé l'effet de la cycloheximide en présence de NH_4Cl sur la reprise méiotique. En accord avec les résultats précédemment observés, l'incubation des ovocytes en présence de cycloheximide ou de NH_4Cl 10 mM retarde la maturation induite par micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures (Figure 45, Tableau 10). Le retard provoqué par le NH_4Cl ($\text{GVBD}_{50} = 1.76 \pm 0.36 \text{ GVBD}_{50}$ des ovocytes contrôles) est cependant plus important que celui induit par la cycloheximide ($\text{GVBD}_{50} = 1.42 \pm 0.05 \text{ GVBD}_{50}$ des ovocytes contrôles). En présence de NH_4Cl et de cycloheximide, le retard observé est encore plus grand ($\text{GVBD}_{50} = 2.22 \pm 0.25 \text{ GVBD}_{50}$ des ovocytes contrôles), ce qui suggère que les effets de ces deux composés sont additionnels.

Ainsi, la diminution de pHi n'affecte pas seulement la synthèse protéique lors la reprise méiotique. Nous avons également analysé l'effet de l'acidification intracellulaire sur la dégradation de la CPEB, protéine impliquée dans le processus de polyadénylation. La CPEB subit deux vagues de phosphorylation, la première phosphorylation est réalisée par Aurora A/Eg2 et la seconde par Cdk1. Cette dernière se produit sur la sérine 220 et provoque sa destruction par le protéasome après ubiquitinylation (Reverte et coll., 2001). La dégradation de la CPEB, détectée par la disparition du signal lors de l'analyse par Western blot, n'est pas affectée par le NH_4Cl 1 mM alors qu'elle est retardée par le NH_4Cl 10 mM (Figure 46).

Nos résultats soulignent que l'activation de la voie $\text{p39}^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ par le MPF est retardée par l'acidification intracellulaire. Afin de déterminer si les événements en aval de la voie $\text{p39}^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, responsables de l'entrée en phase M, sont sensibles au pHi, nous avons étudié l'effet des variations de pHi sur la reprise méiotique induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active. Dans ces conditions, la micro-injection de tampon Tris pH 9 n'accélère pas la GVBD et le pourcentage final de GVBD n'est pas significativement différent de celui des ovocytes contrôles (Article : Figure 7 A). Par contre, l'incubation en présence de NH_4Cl 1 mM retarde fortement la GVBD et diminue fortement le pourcentage final de GVBD (Article : Figure 7 A). La présence de NH_4Cl 10 mM inhibe totalement la reprise méiotique

Figure 46 : Effets de l'acidification intracellulaire sur la dégradation de la CPEB induite par injection de cytoplasme d'ovocytes matures

La dégradation de la CPEB est analysée par western blot. La bande supérieure est non spécifique, la bande inférieure représente la CPEB. La dégradation de la CPEB est déterminée par la disparition du signal.



dans ces conditions (Article : Figure 7 A). En accord avec les résultats de Haccard et coll. (1995), nous avons observé que la synthèse protéique est requise pour la maturation induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active.

Trente trois heures après la micro-injection de MAPK constitutivement active, le MPF est actif dans les ovocytes micro-injectés de MAPK, micro-injectés ou non de Tris pH 9 (Article : Figure 7 B). Il en est de même pour la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk}. En présence de NH₄Cl 1 mM, la phosphorylation de Xp42^{Mpk1} et p90^{Rsk} est partielle, la phosphorylation de la cycline B2 et la déphosphorylation de Cdk1 ne sont pas détectées. En présence de NH₄Cl 10 mM ou de cycloheximide ainsi que dans les ovocytes contrôles (micro-injectés seulement de Tris pH 9 ou d'eau), Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk} et la cycline B2 ne sont pas phosphorylées et la tyrosine 15 de Cdk1 n'est pas déphosphorylée.

Nos résultats ont montré que les événements précoces aboutissant aux activations du MPF et de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} sont accélérés par l'alcalinisation intracellulaire et retardés par l'acidification intracellulaire. Seuls ces événements sont accélérés par l'alcalinisation intracellulaire. La boucle d'auto-amplification du MPF n'est pas sensible aux variations de pH*i* alors que les mécanismes d'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} dépendant du MPF et la GVBD induite par une forme active constitutivement active de MAPK sont clairement retardés, voire inhibés, par l'acidification du cytoplasme. L'ensemble de ces observations est récapitulé dans la figure 8 (Publication 1).

PUBLICATION 1

Intracellular Acidification Delays Hormonal G2/M Transition and Inhibits G2/M Transition Triggered by Thiophosphorylated MAPK in *Xenopus* Oocytes

C. Sellier,¹ J.-F. Bodart,^{1*} S. Flament,² F. Baert,¹ J. Gannon,³ and J.-P. Vilain¹

¹Laboratoire de Biologie du Développement, EA 1033, IFR 118, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

²Faculté des Sciences, EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Université Henri Poincaré, Entrée 1B, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, F-54506 Vandœuvre lès Nancy cedex, France

³Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Herts EN6 3LD, United Kingdom

Abstract *Xenopus* oocyte maturation is analogous to G2/M transition and characterized by germinal vesicle breakdown (GVBD), spindle formation, activation of MPF and Mos-Xp42^{Mpk1} pathways. It is accompanied prior to GVBD by a transient increase in intracellular pH. We determined that a well known acidifying compound, NH₄Cl, delayed progesterone-induced GVBD in a dose-dependent manner. GVBD₅₀ was delayed up to 2.3-fold by 10 mM NH₄Cl. Cyclin B2 phosphorylation, Cdk1 Tyr15 dephosphorylation as well as p39^{Mos} accumulation, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation induced by progesterone were also delayed by incubation of oocyte in NH₄Cl. The delay induced by NH₄Cl was prevented by injection of MOPS buffer pH 7.7. In contrast to acidifying medium, alkalyzing treatment such as Tris buffer pH 9 injections, accelerated GVBD, MPF and Xp42^{Mpk1} activation, indicating that pH_i changes control early steps of G2/M dynamics. When injected in an immature recipient oocyte, egg cytoplasm triggers GVBD through MPF auto-amplification, independently of protein synthesis. In these conditions, GVBD and Xp42^{Mpk1} activation were delayed by high concentration of NH₄Cl, which never prevented or delayed MPF activation. Strikingly, NH₄Cl strongly inhibited thiophosphorylated active MAPK-induced GVBD and MPF activation. Nevertheless, Tris pH 9 did not have any effects on egg cytoplasm- or active MAPK-induced GVBD. Taken together, our results suggest that dynamic of early events driving Xp42^{Mpk1} and MPF activation induced by progesterone may be negatively or positively regulated by pH_i changes. However Xp42^{Mpk1} pathway was inhibited by acidification alone. Finally, MPF auto-amplification loop was not sensitive to pH_i changes. J. Cell. Biochem. 98: 287–300, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: intracellular pH; MPF; MAPK; cell cycle control; oocyte; meiosis

Intracellular pH (pH_i) plays crucial functions in many aspect of cellular regulation, including cell growth, growth factor activity, proliferation, cell cycle, oncogenesis, oncogene expression, and malignant transformation [Harguindey

et al., 1995; Putney et al., 2002]. A crucial pH_i-regulating mechanism involves the ion exchanger Na⁺/H⁺ antiport (NHE). Many studies, such as those of Hesketh et al. [1985], have shown that a pH_i increase up to 0.2 pH unit follows cell stimulation by appropriate mitogens. Permissive effects of pH_i elevation and NHE activation on cell proliferation have been clearly established [Pouyssegur et al., 1984; Kapus et al., 1994]. When injected, activated p21Ras induces a sustained alkalization that is necessary for oncogene-induced mitosis [Hagag et al., 1987]. Conversely, proto-oncogenic form of Ha-Ras that does not induce intracellular alkalization presents a weak mitogenic effect [Doppler et al., 1987]. Transfection of fibroblasts with a yeast H⁺ pumping membrane ATPase, which induced a

Grant sponsor: French "Ministère de l'Education Nationale"; Grant number: EA 1033.

*Correspondence to: J.-F. Bodart, Laboratoire de Biologie du Développement, EA 1033, IFR 118, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

E-mail: jean-françois.bodart@univ-lille1.fr

Received 4 November 2005; Accepted 8 November 2005

DOI 10.1002/jcb.20764

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

permanent increase of pH_i is associated with the acquisition of a transformed phenotype [Perona and Serrano, 1988]. Similarly, NHE activation and subsequent-induced pH_i elevation has been suggested to be necessary for oncogenic transformation and maintenance of the transformed phenotype [Reshkin et al., 2000]. Nevertheless, mechanisms by which pH_i changes are related to cell cycle control and proliferation remains poorly understood.

Progression through cell cycle M-phase is regulated by the G2/M checkpoint and the metaphase-anaphase transition. M-phase entry is promoted by a cytoplasmic factor, the M-phase promoting factor (MPF). The latter has been demonstrated to be universal regulator of entry into mitosis and meiosis: MPF is made up of a catalytic subunit, Cdk1 and a regulatory subunit, the Cyclin B. The activation of this Cyclin-Cdk (cyclin dependant kinase) complex is controlled by phosphorylation or proteolysis of its subunits [for review see Nurse and Hartwell, 1998; Masui, 2001]. Association between regulatory subunit and Cdk1 requires phosphorylation of Cdk1 on residue Thr161 by Cdk activating kinase [Lorca et al., 1992; Solomon, 1993]. Then, to be catalytically active, Cdk1 is dephosphorylated on Thr 14 and Tyr15 by Cdc25 dual specificity phosphatase [Gautier et al., 1988; Kumagai and Dunphy, 1991]. Simultaneously to Cdk1 dephosphorylation, Cyclin B becomes phosphorylated [Gautier and Maller, 1991]. *Xenopus* immature oocytes, which are synchronized at diplotene stage of first meiosis, contain large amount of inactive MPF, or pre-MPF [Nurse and Hartwell, 1998; Masui, 2001]. Pre-MPF is thought to consist of a complex of Cyclin B and Cdk1. Inhibition of pre-MPF is provided by Myt1 that phosphorylates Cdk1 and then inactivates the complex. Pre-MPF can be directly activated by Cdc25 injection [Rime et al., 1994] or by an auto-amplification loop. The auto-amplification loop is triggered by MPF contained in cytoplasm from eggs or metaphase II arrested oocytes [Masui and Markert, 1971]. This loop does not depend upon protein synthesis [Wasserman and Masui, 1975] and involves MPF ability to phosphorylate and activate Cdc25 [Hoffmann et al., 1993; Strausfeld et al., 1994].

Simultaneously to MPF activation, the Erk-like $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ (extracellular regulated kinase) is phosphorylated and activated [Ferrell et al., 1991]. $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ belongs to the mitogen acti-

vated protein kinase (MAPK) pathway that is turned on by the synthesis of Mos in response to progesterone stimulation [Sagata et al., 1988]. Once activated, $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (p90^{Rsk}), which negatively regulates Myt1 [Palmer et al., 1998]. Activation of Mos- $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ pathway has been shown not to be required for MPF activation but for timely M phase entry to occur when oocytes are stimulated either by progesterone or insulin [Fisher et al., 1999; Dupre et al., 2002; Baert et al., 2003]. Moreover, this pathway has been shown to be responsible for S-phase suppression between MI and MII, and for arrest at metaphase II [Abrieu et al., 2001; Bodart et al., 2002].

Among the early events that precede germinal vesicle break down (GVBD) and spindle morphogenesis [Hausen and Riebesell, 1991], a transient increase in intracellular pH by 0.2–0.4 units has been described in *Xenopus* oocytes [Lee and Steinhardt, 1981; Cicirelli et al., 1983] as well as in urodeles oocytes [Rodeau and Vilain, 1987]. Elevation of pH_i is thought to result from NHE activity, whose up-regulation has been proposed to involve phosphorylation by MAPK family members: Mos [Rezai et al., 1994], Raf [Kang et al., 1998], and c-Jun kinase [Goss et al., 2001]. Observations have carried out controversial data on the function of pH_i changes on the molecular mechanisms regulating cell cycle progression during meiosis. Lowering pH_i by sodium acetate containing medium or by incubation in low extracellular pH (pH_e) media were shown to induce a decrease in the rate of protein synthesis that occurs in response to progesterone [Houle and Wasserman, 1983]. Though there was a good correlation between S6 phosphorylation and alkalization during meiosis resumption, lowering pH_e never prevented S6 phosphorylation [Wasserman and Houle, 1984; Stith and Maller, 1985]. Nevertheless, S6 phosphorylation appeared not to be sufficient to trigger GVBD because S6 phosphorylation levels were not affected in oocytes exhibiting GVBD [Stith and Maller, 1985]. Traditionally, weak bases like trimethylamine (TMA) or procaine, a local anesthetic, have been used in progesterone-free medium to artificially increase pH_i [Houle and Wasserman, 1983]. The interpretations of the results obtained using these compounds to alkalinize cytoplasm have to be shaded. Two independent studies have pointed out that the short initial alkalization induced by TMA is promptly followed by a

subsequent acidification [Bürckhardt and Thelen, 1995] and that a significant acidification occurred following procaine exposure [Rodeau et al., 1998]. Besides, though procaine triggers a transient activation of MPF in *Xenopus* oocytes [Flament et al., 1997], alkalization using pH9-buffered solutions never triggered GVBD [Flament et al., 1996] suggesting that procaine could promote GVBD and activate MPF independently of pH. Similarly, Houle and Wasserman reported that GVBD could occur following TMA addition in absence of hormonal stimulation [Houle and Wasserman, 1983].

Correlations between pHi oscillations and MPF activity have been studied during cell cycle of *Xenopus laevis* early embryos [Grandin et al., 1991]. pHi values were oscillated together with the cycling of MPF activity and suggested that pHi oscillation could be an integral component of the cell cycle oscillator. So far, no exhaustive studies have been carried out to characterize the relationship between pH homeostasis, MPF and MAPK during oocyte maturation. In order to study the effects of pHi changes on cell cycle progression, we analyzed the effects of NH₄Cl, Tris and MOPS buffers on the molecular events driving G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. The results reported in the present study provide a frame work to explain the role of pHi in meiosis and outline that early mechanisms leading to Mos-Xp42^{Mpk1} and MPF activations can either be accelerated by alkalization or delayed by cytoplasm acidification. In contrast to MPF auto-amplification loop, which was not sensitive to pHi changes, thiophosphorylated active MAPK-induced GVBD was inhibited by pHi decrease.

MATERIALS AND METHODS

Handling, Treatment, and Micro-Injection of Oocytes

Adult *Xenopus laevis* females were purchased from University of Rennes (France). After anaesthesia with 1 mg/ml MS222 (Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5/NaOH). Full-grown stage VI oocytes [Dumont, 1972] were obtained by manual defolliculation after 40 min incubation in 1 mg/ml collagenase A (Roche Applied Science). Oocytes were kept at 14°C in ND96 medium until use.

Acidification of the oocyte cytoplasm was obtained by incubation in NH₄Cl (Sigma)-containing medium (from 1 to 10 mM), which induces fast decrease in pHi [Bürckhardt and Fromter, 1992; Flament et al., 1996]. Modified ND was used for incubation in NH₄Cl 10 mM to preserve the osmotic balance. pH of external solutions was adjusted to 7.5. In order to buffer pHi variations, 50 nl of MOPS buffer (morpholino propane sulfonic acid, 400 mM, pH 6.9) were microinjected in immature oocytes using a positive displacement digital micropipette [Nishiryo; Flament et al., 1997]. Distilled water was used as control for microinjection experiments. Injected oocytes were allowed to heal for 1 h in ND96 medium.

Oocyte cytoplasm alkalization was induced by micro-injection of 50 nl of Tris pH 8.5 or 9 into immature oocytes 1 h before hormonal stimulation.

Resumption of meiosis was stimulated by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 μ M progesterone (Sigma). Progesterone-treated oocytes used as cytoplasm donor for microinjection experiments, were rinsed several times before cytoplasm withdrawn. Fifty nanoliters of cytoplasm were transferred into each immature recipient oocyte.

GVBD was also triggered by recombinant thiophosphorylated active MAPK (Calbiochem, 454855). Twenty nanoliters equal to 1.3 μ specific activity were injected per oocyte.

Maturation Analysis

Time course experiments were performed and maturation was assessed by the occurrence of the white spot (WS), due to displacement of the germinal vesicle toward the apex of the cell. GVBD was confirmed by dissection of heat-fixed oocytes (100°C, 5 min). Batches of oocytes, in which the proportion of immature (absence of WS) versus matured oocytes (presence of WS) was in agreement with the total population, were placed at 4°C every hour, unless otherwise specified. All experiments were performed at 20°C and at least in triplicate.

For cytological analysis, oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (7 μ m thickness) were stained with nuclear red for detecting nuclei and chromosomes whereas picro indigo carmine was used to reveal cytoplasmic structures [Flament et al., 1996].

Electrophoresis and Western Blotting

Frozen oocytes were homogenized in a homogenization buffer and centrifuged for 10 min at 13,000g (4°C) to eliminate yolk platelets. After brief centrifugation, one volume of 2× Laemmli sample buffer was added to one volume of supernatant. Proteins were denatured by heating the samples (100°C, 5 min) and then separated by 10% (p39^{Mos}) or 17.5% (proteins except p39^{Mos}) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Half oocyte was loaded per well. Separated proteins were subjected to Western blot analysis as previously reported. Cyclin B2 and Cdk1 tyrosine 15 phosphorylation were detected using respectively a polyclonal antibody JG103 [Goodger et al., 1996] or a phospho-tyr 15 Cdk1 (Cell Signaling). Both were used at 1/1,000 in TBS. Protein kinases Mos and p90^{Rsk} were detected using antiserum raised against the carboxy-terminal part of the enzyme, diluted at 1/1,000 in TBS (C-238 and C-21 respectively, Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Germany). Xp42^{Mpk1} was detected using the anti-Erk2 monoclonal antibody D-2 (Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Germany) (1/2,500 in TBS). Signals were detected using ECL chemoluminescence system (Amersham Biosciences).

Statistical Analysis

Values were compared using the chi-square analysis of contingency tables or the Fisher exact test if one or more values were equal to zero. Each experiment was performed at least in triplicate on oocytes obtained from different females.

RESULTS

Progesterone-Induced G2/M Transition Is Delayed by Cytoplasm Acidification Induced by NH₄Cl

When applied in the external medium at a concentration of 10 mM, NH₄Cl triggers an intracellular acidification of 0.3–0.4 pH units within 4 min [Burckhardt and Fromter, 1992; Flament et al., 1996; Rodeau et al., 1998]. To analyze the effects of intracellular acidification on progesterone-induced maturation, oocytes were treated with increasing concentration. In these conditions, we observed that the G2/M transition was delayed in a dose-dependent manner (Fig. 1A, n = 8). G2/M transition was

TABLE I. Effects of NH₄Cl on Progesterone-Induced GVBD

Number of female	NH ₄ Cl 1 mM + progesterone	NH ₄ Cl 10 mM + progesterone
1	× 1.49	nd
2	× 1.28	× 1.50
3	× 1.79	(++)
4	× 1.59	nd
5	(++)	(++)
6	× 1.93	× 2.24
7	(++)	nd
8	× 2.27	nd

Delays are expressed by comparison of GVBD₅₀ of NH₄Cl-treated oocytes to GVBD₅₀ of control oocytes solely treated with progesterone; (++) , GVBD₅₀ was not reached in these oocytes; nd, not determined.

assessed through the appearance of a white spot at the apex of the oocytes and GVBD was confirmed by heat-fixation followed by hemi-dissection of the oocytes. When the oocytes were treated with 1 mM NH₄Cl, GVBD₅₀ (time required for 50% of treated oocytes to undergo GVBD) was delayed by 1.7 ± 0.1 fold in six females in comparison to GVBD₅₀ of control oocytes treated with progesterone alone. GVBD₅₀ was never reached in batches of oocytes from 2 other females (Table I). Similarly, GVBD₅₀ was not reached in 50% of 10 mM NH₄Cl-treated oocytes stimulated by progesterone (n = 4 females) while GVBD₅₀ was delayed by at least 2.3 fold in the other cases (Fig. 1A). To confirm that delay of GVBD was due to pH_i variation and not to NH₄Cl itself, injections of MOPS buffer at pH 6.9 were also performed. The latter has been previously shown to buffer oocyte cytoplasm and to prevent the pH_i increase that accompanies maturation [Flament et al., 1996]. In such conditions, GVBD₅₀ was dramatically delayed ($3.2 \times$ GVBD₅₀ of H₂O-injected oocytes, data not shown).

Progesterone-Induced MPF and Xp42^{Mpk1} Activations Are Delayed by NH₄Cl

Due to low level of GVBD in 10 mM NH₄Cl-treated *Xenopus* oocytes, we chose to use a 1 mM concentration to study the effects of NH₄Cl on the molecular events that underlie G2/M transition because in most cases, 100% of the oocytes exhibited GVBD 15 h post-progesterone addition. In immature oocytes, Cyclin B2, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} are not phosphorylated. Phosphorylated forms of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were detected 5–9 h post-progesterone addition (Fig. 1B, P). Cyclin B2 phosphorylation was correlated to dephosphorylation of Cdk1 Tyr15. As well,

pHi, MPF and MAPK Activation

291

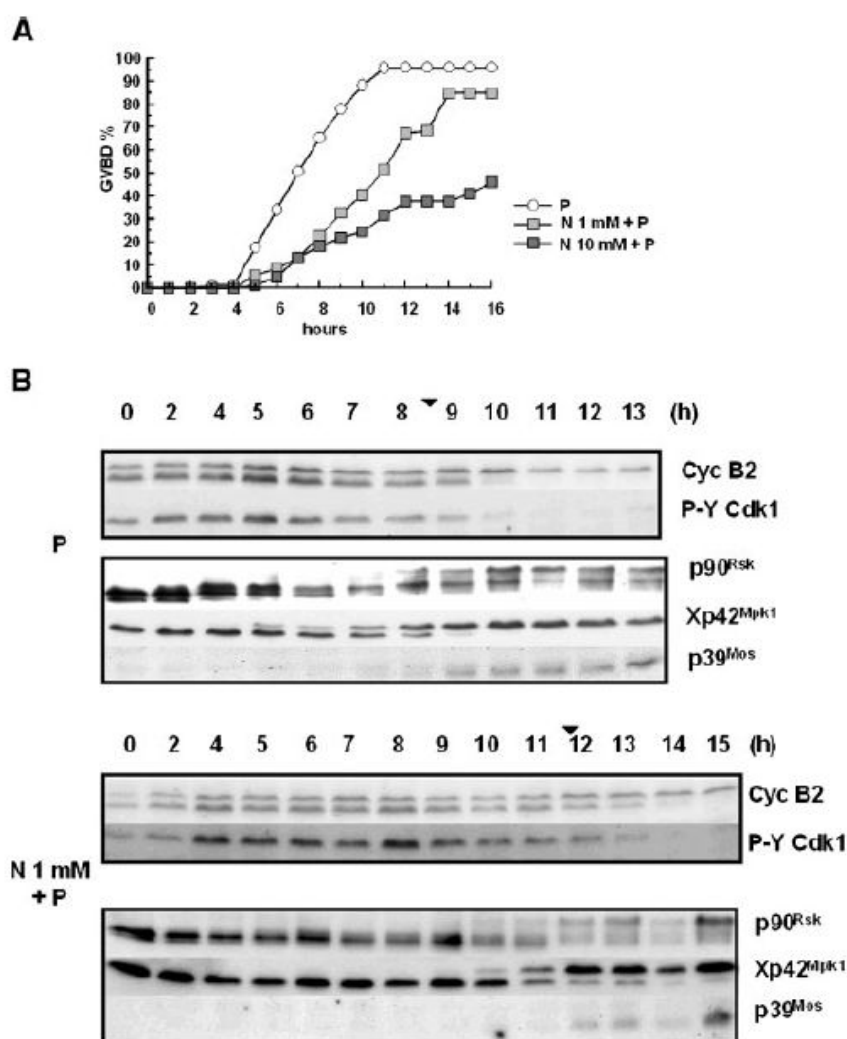


Fig. 1. Dose-dependent effects of NH_4Cl on progesterone-induced G2/M transition. A: Immature oocytes were incubated in progesterone without (open circle) or with NH_4Cl (1 mM, gray square; 10 mM, dark gray square). NH_4Cl was added 1 h prior to hormonal stimulation with progesterone. Results expressed are means of eight experiments on eight different females. B: Effects of NH_4Cl 1 mM on progesterone-induced MPF and Mos-Xp42^{Mpk1} pathway activation. GVBD₅₀ was observed 8 h 20 after progesterone addition in control oocytes whereas it

occurred 11 h 50 post-progesterone in 1 mM NH_4Cl (arrows). At the time points indicated, lysates of the same batch of oocytes treated with progesterone (P) or NH_4Cl 1 mM + Progesterone (P + N 1 mM) were subjected to lysates to Western blot analysis using polyclonal antibody against Cyclin B2 (1/1,000), P-Tyr15 Cdk1 (1/1,000), Mos (1/1,000) and p90^{Rsk} (1/1,000) and monoclonal antibody against Xp42^{Mpk1} (1/2,500). This result is representative of three experiments.

phosphorylations of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were correlated to the accumulation of p39^{Mos}, which appeared to be complete after 10 h in control oocytes. Typical pattern of phosphorylation, which characterizes mature oocytes, was observed after 10–11 h in progesterone-stimulated oocytes. In the presence of NH_4Cl 1 mM (Fig. 1B, N 1 mM + P), such a pattern of phosphorylation was observed only after 14–15 h. Cyclin B2 phosphorylation and Cdk1 Tyr 15

dephosphorylation were delayed by 3–4 h. p39^{Mos} accumulation was also slowed down and was detected only 14–15 h after the beginning of the treatment. Consequently, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylations were delayed and appeared complete only after 14 h. Similarly, injection of MOPS (pH 6.9) or incubation in physiological medium at $\text{pH}_e = 6$ prior to progesterone stimulation induced a delay of both Mos-Xp42^{Mpk1} and MPF activation (data not shown). Then the delay

in G2/M transition induced by acidification was correlated with delay in the activation of both Xp42^{Mpk1} and MPF pathways.

MOPS pH 7.7 Injection Prevents NH₄Cl-Induced Delay of G2/M Transition

In order to prevent NH₄Cl-induced delay of G2/M transition, MOPS buffers at different pH were used. In our hands, MOPS pH 7.7 was the only one that did not affect the GVBD kinetics of progesterone-stimulated oocytes. Indeed, GVBD₅₀ of oocytes injected with 50 nl of MOPS

pH 7.7 was not different from those of control (0.91 ± 0.03 vs. 1, Fig. 2A). If GVBD₅₀ was delayed by 1.17 ± 0.05 fold ($n = 3$) when oocytes were treated with NH₄Cl 1 mM, this delay was abolished in MOPS pH 7.7 injected oocytes (0.92 ± 0.04 vs. 1.17 ± 0.05 , $P > 0.05$, Fig. 2A). In the latter case, GVBD₅₀ was not different from those of MOPS pH 7.7-injected oocytes (0.92 ± 0.04 vs. 0.91 ± 0.03 , $P < 0.01$, Fig. 2). At the end of the treatment (10 h in this set of experiment), we observed that neither MOPS pH 7.7 nor NH₄Cl prevented the activation of

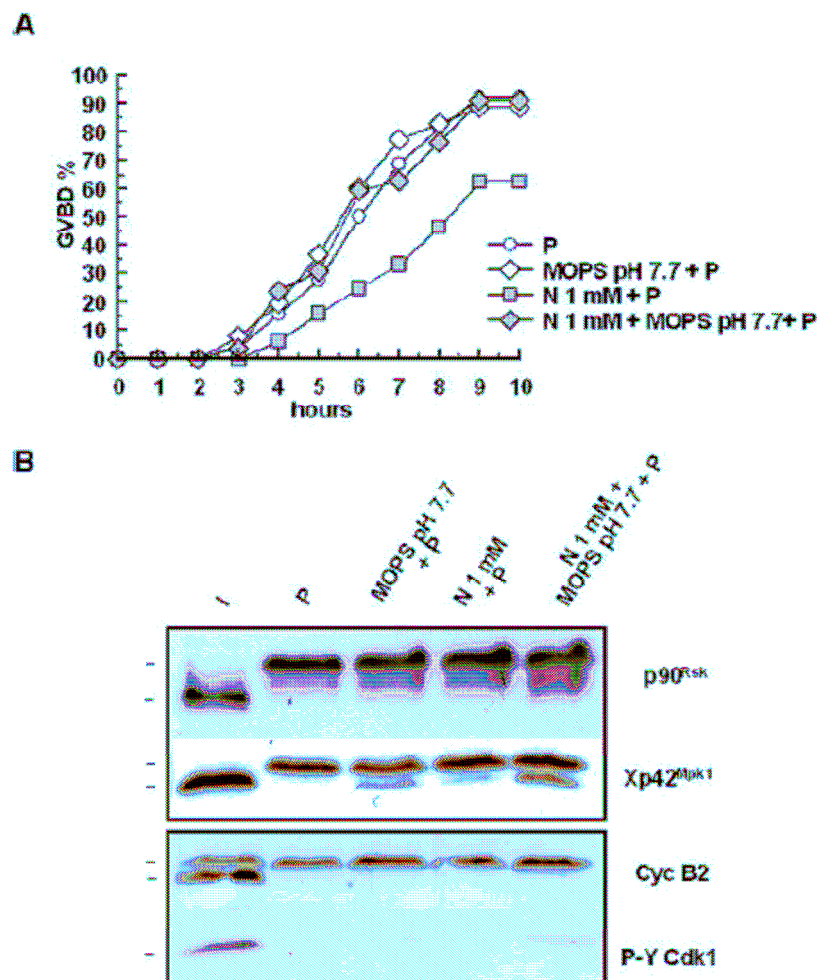


Fig. 2. MOPS pH 7.7 injection prevents NH₄Cl-induced delay of G2/M transition. Oocytes were microinjected with MOPS pH 7.7 prior treatment with NH₄Cl 1 mM (1 h) and then stimulated by progesterone. GVBD kinetics (A) shown that GVBD in MOPS pH 7.7 injected oocytes was not delayed by NH₄Cl 1 mM treatment (P + 1 mM + MOPS 7.7). These batches exhibited a significant difference toward NH₄Cl-treated oocytes (P + N 1 mM + MOPS 7.7 vs. P + N 1 mM, $P < 0.01$). B: Western blot analyses from oocytes after 10 h of progesterone treatment: phosphorylation of

Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk} and Cyclin B2 and Cdk1 Tyr 15 dephosphorylation was observed in progesterone-treated oocytes (P), progesterone-treated oocytes injected by MOPS pH 7.7 (P + MOPS 7.7), progesterone-treated oocytes incubated in NH₄Cl (P + N 1 mM) and progesterone-treated oocytes incubated in NH₄Cl and injected by MOPS pH 7.7 (P + N 1 mM + MOPS 7.7). Immature oocyte (I) exhibited phosphorylated Cdk1 whereas Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, and Cyclin B2 remained under their non-phosphorylated forms.

MPF and phosphorylation of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} (Fig. 2B).

Tris Buffer pH 9 Injection Accelerates Progesterone-Induced G2/M Transition, MPF, and Xp42^{Mpk1} Activation

Previous works performed in our lab have shown that Tris pH 8-microinjection does not induce significant pHi changes while Tris pH 9-microinjection triggers a pHi increase of 0.4 pH unit [Flament et al., 1996]. We have then tested the effects of Tris buffer pH 8.5 and Tris buffer pH 9-microinjection on the progesterone-induced G2/M transition. Tris pH 8.5-microinjected oocytes exhibited the same kinetic of maturation that those that were either not injected or injected with H₂O. No significant differences between the GVBD₅₀ of these batches were observed (Fig. 3A,B, n=3 females). However, GVBD₅₀ was observed 1 h earlier in Tris pH 9-microinjected oocytes than in the other condi-

tions (Fig. 3B). Relative time to GVBD₅₀ for Tris pH 9-microinjected oocytes was 0.78 ± 0.03 those of control oocytes (Fig. 3A).

Acceleration of GVBD induced by Tris pH 9 injection was correlated to earlier activation of MPF and MAPK (Fig. 3C). In absence of progesterone stimulation, Tris pH 9 injection did not trigger MPF nor Xp42^{Mpk1} activation (without P, Fig. 3C). In control oocytes, dephosphorylation of Cdk1 and phosphorylation of Xp42^{Mpk1} were observed 7–8 h post-progesterone addition. Activation of MPF, as attested by Cdk1 Tyr 15 dephosphorylation and Cyclin B2 phosphorylation was complete after 11 h. In contrast to control oocytes, complete activation of MPF was observed after 7 h in Tris pH 9-injected oocytes (Tris pH 9+P). Similarly, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were fully phosphorylated after 7 h in Tris pH 9-injected oocytes (Tris pH 9+P) whereas they were activated after 9–10 h in control (Fig. 3C). p39^{Mos} accumulation was

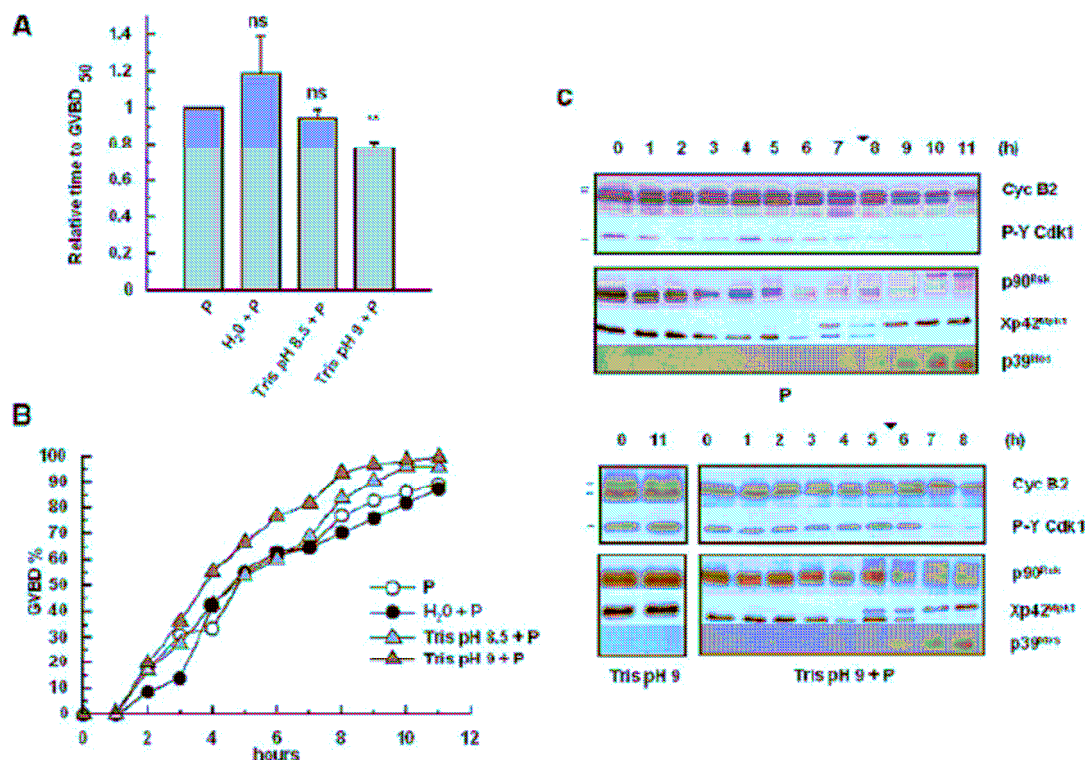


Fig. 3. Effects of Tris pH 9 buffer injection on G2/M transition, MPF and Xp42^{Mpk1} activation. Oocytes were microinjected with Tris pH 9 buffer 1 h before stimulation by progesterone. Distilled water-injected oocytes (H₂O) were used as control. Relative time to GVBD₅₀ (A) and GVBD kinetics (B) revealed no significant differences between the GVBD₅₀ of control oocytes (P), H₂O-injected oocytes (P + H₂O) and Tris pH 8.5 (P + Tris pH 8.5)

stimulated by progesterone (respectively 1, 1.19 ± 0.20 , and 0.94 ± 0.05 , $P < 0.05$); ns, no significant difference between control and treated oocytes; **significant difference between control and treated oocytes ($P < 0.05$). G2/M acceleration in Tris pH 9-injected oocytes was assessed by Western blot analysis using Cyclin B2, Cdk1 P-Tyr 15, Xp42^{Mpk1}, p90^{Rsk}, and p39^{Mos} antibodies (C). Arrows represent GVBD₅₀.

also accelerated in Tris pH 9 injected oocytes (Tris pH 9 + P).

MPF Auto-Amplification Loop Induced by Egg Cytoplasm Injection Is not Sensitive to pH_i Changes

Because GVBD and activation of MPF induced by egg cytoplasm injection are independent of the Xp42^{Mpk1} pathway [Wasserman and Masui, 1975; Sellier and Bodart, personal observations], we used this cellular context to analyze the effects of an intracellular acidification on GVBD and MPF activation induced by egg cytoplasm injection.

First, GVBD was not delayed by incubation in NH₄Cl 1 mM (Fig. 4A and B, n = 7 females), in contrast to hormonal stimulation. However, oocytes treated by NH₄Cl 10 mM underwent maturation but GVBD kinetic was dramatically delayed: GVBD₅₀ was reached more than 1 h later in comparison to control oocytes (GVBD₅₀ = 1.75 ± 0.19 × GVBD₅₀ of control oocytes (three females)). Though GVBD was delayed by high concentration of NH₄Cl (Table II), Western blot analysis revealed that neither the dephosphorylation of Cdk1 Tyr 15 nor the phosphorylation of Cyclin B2 were impaired or delayed by NH₄Cl even at 10 mM (Fig. 4C). In all treatment, activation of MPF was observed 1 h after egg cytoplasm injection, as attested by Cyclin B2 phosphorylation and Cdk1 Tyr 15 dephosphorylation.

Second, Tris injection did not accelerate egg cytoplasm-induced GVBD (Fig. 5A). Tris pH 9-egg cytoplasm co-injected oocytes GVBD₅₀ was comparable to control oocytes: GVBD₅₀ = 1.08 ± 0.02 × GVBD₅₀ of control oocytes (H₂O + Cy). MPF activation was not accelerated (Fig. 5B): Cdk1 Tyr 15 dephosphorylation and Cyclin B2 phosphorylation occurred at the same

TABLE II. Effects of NH₄Cl on GVBD Induced by Egg Cytoplasm Injection

Number of female	NH ₄ Cl 1 mM + Cy	NH ₄ Cl 10 mM + Cy
1	× 1.00	× 2.34
2	× 0.90	× 2.09
3	× 1.13	× 1.38
4	× 1.55	× 2.43
5	× 1.08	× 1.54
6	× 1.03	× 1.15
7	× 1.10	× 1.32

Delays are expressed by comparison of GVBD₅₀ of NH₄Cl-treated oocytes to GVBD₅₀ of control oocytes injected with egg cytoplasm

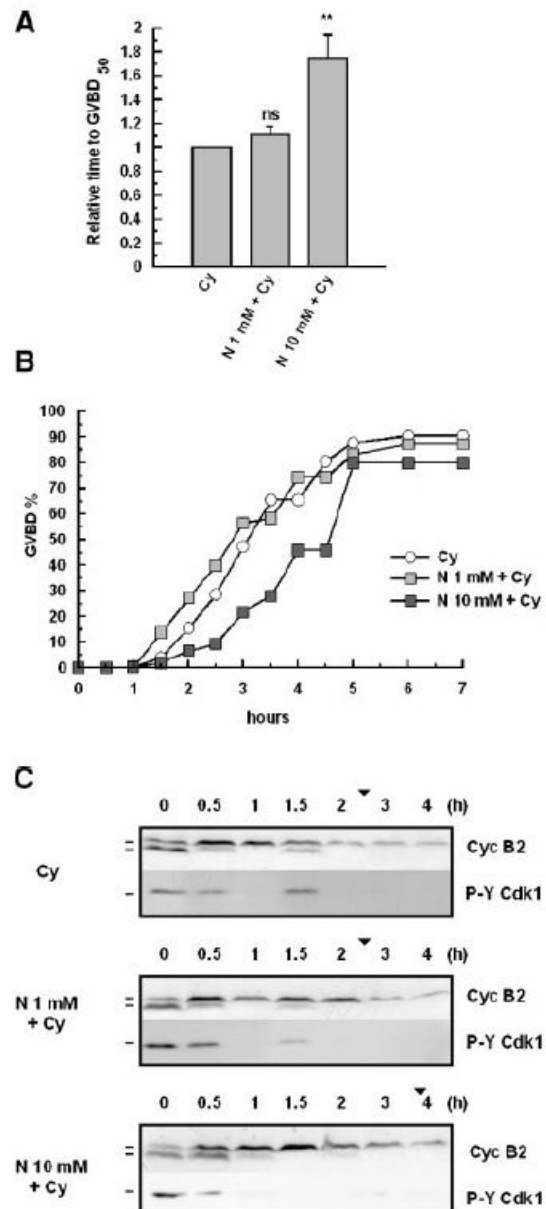


Fig. 4. Effects of NH₄Cl on egg cytoplasm-induced GVBD and MPF activation. Relative time to GVBD₅₀ (A) and GVBD kinetics (B). NH₄Cl was added 1 h prior to injection of metaphase-II arrested eggs (50 nl by oocytes); ns, no significant difference between control and treated oocytes; **significant difference between control and treated oocytes ($P < 0.05$). C: NH₄Cl was added 1 h prior to injection of metaphase-II arrested eggs (50 nl by oocytes). Oocytes were taken every ½ h during 2 h after egg cytoplasm injection. MPF activation was analysed using Cyclin B2 (1/1,000) and Cdk1 P-Tyr 15.

pHi, MPF and MAPK Activation

295

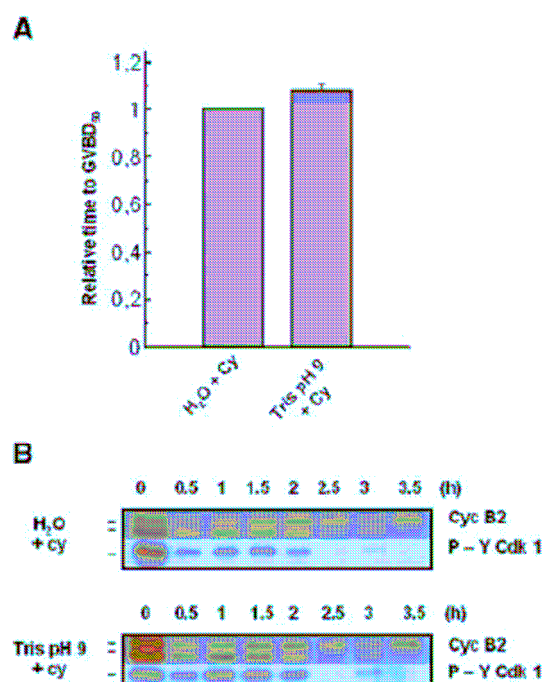


Fig. 5. Effects of Tris pH 9 injection on egg cytoplasm-induced GVBD and MPF activation. A: Relative time to GVBD₅₀. B: MPF activation kinetic was detected using Cyclin B2 and Cdk1 P-Tyr 15 antibodies.

time in control oocyte (H₂O + Cy) and Tris-injected oocytes (Tris pH 9 + Cy).

MPF-Induced Xp42^{Mpk1} Activation Is Delayed by Cytoplasm Acidification

Egg cytoplasm injection also induced p39^{Mos} accumulation and subsequent Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation in absence of hormonal stimulation (Fig. 6). We observed in control oocytes and in NH₄Cl 1 mM-treated oocytes that p39^{Mos} accumulation, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation occurred at the same time, 3 h and 2–3 h post-injection respectively, while p39^{Mos} accumulation was delayed in NH₄Cl 10 mM-treated oocytes. In these oocytes, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were not fully activated: both active and inactive isoforms were detected. Thus, at a concentration of 1 mM, NH₄Cl did not prevent MPF and Xp42^{Mpk1} activation whereas a 10 mM concentration delayed Xp42^{Mpk1} activation without impairing MPF activation (Fig. 6).

Thiophosphorylated MAPK-Induced GVBD Is Inhibited by Cytoplasm Acidification

When injected into immature oocytes, thiophosphorylated active MAPK triggers GVBD

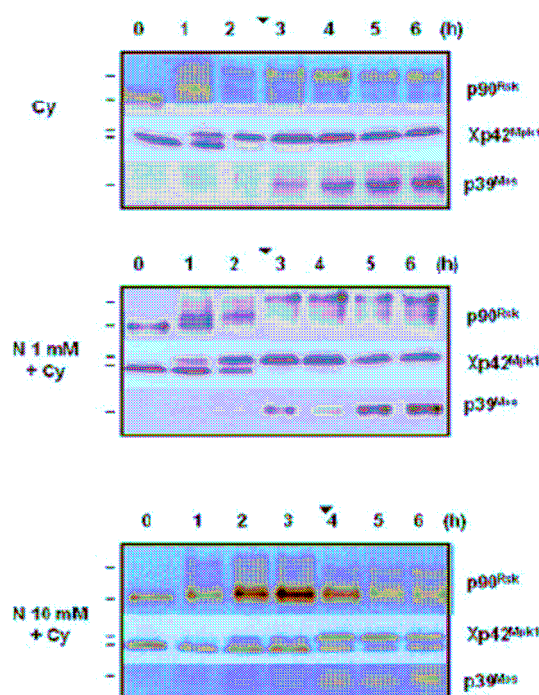


Fig. 6. Effects of NH₄Cl on egg cytoplasm-induced Xp42^{Mpk1} phosphorylation and p39^{Mos} accumulation. Oocytes were treated with NH₄Cl 1 h prior to injection of metaphase-II-arrested eggs (50 nl by oocytes) and they were taken every ½ h for 2 h after egg cytoplasm injection. Activation of the MAPK pathway was analyzed through p39^{Mos} accumulation, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation.

(Fig. 7A, n = 3) whereas control oocytes injected with H₂O or boiled inactivated MAPK (data not shown) did not exhibited any GVBD. As reported earlier by Haccard et al. [1995], we observed that protein synthesis was required for thiophosphorylated active MAPK to induce GVBD (Fig. 7A) and MPF activation: Cdk1 remained phosphorylated on Tyr 15 and Cyclin B2 did not exhibited any phosphorylation when oocytes were incubated in cycloheximide (CHX, 10 µg/ml) prior to MAPK injection. Tris pH 9 injection had no effects on thiophosphorylated active MAPK-induced GVBD. Neither GVBD kinetic nor GVBD rates were enhanced by cytoplasm alkalization (Fig. 7A). Though Tris pH 9 injection did not accelerated thiophosphorylated active MAPK-induced GVBD, incubation in increasing concentration of NH₄Cl had dramatic effects on the GVBD rate; control oocytes exhibited 87.3 ± 6.7% GVBD whereas oocytes incubated in NH₄Cl 1 and 10 mM exhibited respectively 35.0 ± 17.3 and 0 ± 0% GVBD (Fig. 7A). We failed to detect Cyclin B and

296

Sellier et al.

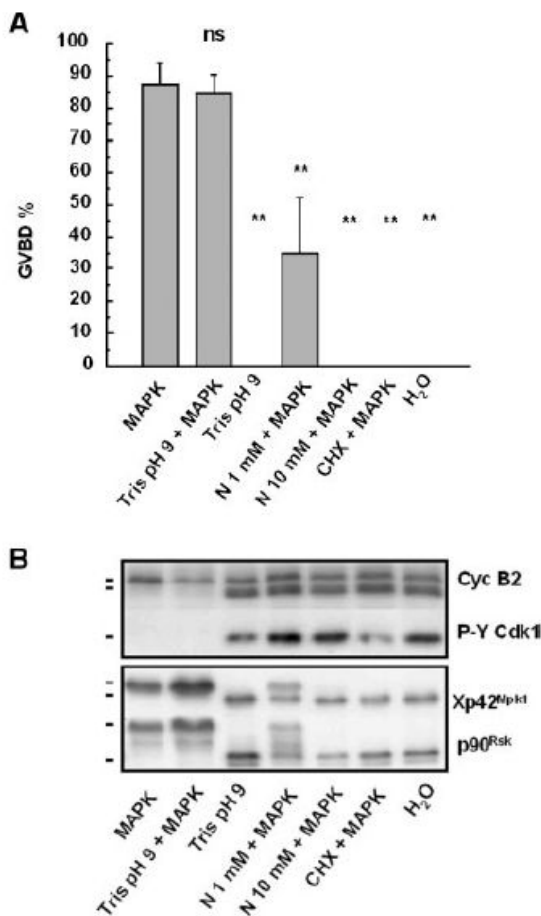


Fig. 7. Acidification inhibits thiophosphorylated MAPK-induced GVBD. Recipient immature oocytes were injected with thiophosphorylated active MAPK (1.3 μ /oocyte) to induce GVBD. A: Percentages of maturation 33 h post MAPK injection. Oocytes were treated with NH_4Cl 1 mM (N 1 mM) or 10 mM (N 10 mM) or microinjected with Tris pH 9 or incubated with CHX (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 h prior to injection with active MAPK. Control oocytes were injected with Tris pH 9 or water. MPF and Xp42^{Mpk1} activations were analyzed by Western blot at the end of the experiment (B).

Cdk1 under their active forms in both 1 mM and 10 mM NH_4Cl incubated oocytes (Fig. 7B). The decrease of GVBD induced by thiophosphorylated active MAPK-injected was also correlated with partial activation of endogenous Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} in 1 mM NH_4Cl and lack of activation of endogenous Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} in 10 mM NH_4Cl (Fig. 7B).

DISCUSSION

Intracellular pH (pH_i) regulates many key functions in cellular life. The transient alkaliza-

tion that occurs during meiosis resumption (G2/M transition) has been well described in *Xenopus laevis* oocytes. However, its role during G2/M transition, as well as the identity of its molecular targets, remains poorly elucidated.

Conclusions drawn from experiments performed with compounds such as trimethylamine and procaine may be questioned and shaded because such compounds do not alkalize but rather acidify cytoplasm [Burckhardt and Thelen, 1995; Rodeau et al., 1998]. Procaine induces MPF activation after longtime exposure in absence of hormonal stimulation [Flament et al., 1997] and trimethylamine has also been reported to induce spontaneous GVBD [Houle and Wasserman, 1983], suggesting that increase of protein synthesis observed with these compounds might be due to the weak bases themselves and not to their pH_i -related effects. In the present study, we focused on another compound, NH_4Cl . Due to the unusual high permeability of *Xenopus* oocyte membrane to NH_4^+ ions [Burckhardt and Fromter, 1992], NH_4^+ dissociation into NH_3 and H^+ in cytosol results in pH_i decrease. We observed that incubation in increasing concentration of NH_4Cl delays in a dose-dependent manner G2/M transition induced by hormonal stimulation in prophase-arrested oocytes. Delays of entry into meiosis induced by NH_4Cl did not appear to be a specific effect of ammonium chloride. Indeed, other compounds that are able to inhibit pH_i changes such as MOPS buffer pH 6.9 injection [Flament et al., 1996] or incubation in pH 6.0 buffered medium, that acidifies, delayed *Xenopus* oocytes G2/M transition (data not shown). Because MOPS pH 7.7 prevented the effects of NH_4Cl , one shall suggest that the GVBD delay observed is due to pH_i acidification and not to unrelated effects of NH_4Cl . These results are in agreement with Houle and Wasserman observation [Houle and Wasserman, 1983]: prior to GVBD, an acidifying medium such as sodium acetate, slows down the kinetic of oocytes maturation induced by progesterone. In contrast to NH_4Cl or MOPS pH 6.9 injections, we notices that injections of Tris pH 9, which alkalizes cytoplasm [Flament et al., 1996], accelerated progesterone-induced GVBD but never triggered GVBD on their own.

Following progesterone stimulation, if GVBD occurs in absence of intracellular alkalization in NH_4Cl -treated or in MOPS-injected oocytes, alkalization facilitates both MPF and p39^{Mos}

to Xp42^{Mpk1} pathway activation induced by progesterone, 1 mM NH₄Cl, as well as 10 mM NH₄Cl [Sellier and Bodart, personal observations], delayed MPF activation (Cdk1 Tyr dephosphorylation and Cyclin B2 phosphorylation), p39^{Mos} accumulation and the subsequent phosphorylation of Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk}. Both activation of p39^{Mos} to Xp42^{Mpk1} pathway and MPF, which are delayed by NH₄Cl and accelerated by Tris pH 9 injections, occurred at the same time relatively to GVBD₅₀, suggesting that both pathways are sensitive to pHi changes. Because these pathways are interconnected, several hypotheses might explain these simultaneous delay or acceleration. There have been considerable discussions about the role of this alkalization in the control of protein synthesis during meiosis [Lee and Steinhardt, 1981; Cicirelli et al., 1983; Stith and Maller, 1985]. By affecting global protein synthesis, pHi variations might modulate timely-progesterone-induced MPF and Xp42^{Mpk1} activations because both factors are dependent upon protein synthesis for their activation. On one hand, p39^{Mos} accumulation has been proposed to be regulated through MPF-dependent mechanisms [Castro et al., 2001; Frank-Vaillant et al., 2001]. Then, delay in MPF activation, by impairing Cdc25 activation or the autoamplification loop of MPF [Gautier and Maller, 1991; Hoffmann et al., 1993; Strausfeld et al., 1994], will result in a delayed p39^{Mos} accumulation. On another hand, p39^{Mos} synthesis and Xp42^{Mpk1} activation have been shown to be required for timely GVBD to occur when oocytes are stimulated by progesterone [Gross et al., 2000; Dupre et al., 2002] or by insuline [Baert et al., 2003]. If absence of p39^{Mos} accumulation or MAPK activation delay M phase entry, injection of members of the p42^{Mpk1} cascade accelerate hormonal-induced GVBD [Baert et al., 2003; Bodart et al., 2005] then acceleration or delay in p39^{Mos} accumulation may respectively accelerate or delay activation of MPF induced by hormonal stimulation.

Egg cytoplasm contains sufficient amount of active MPF to trigger the activation of inactive pre-MPF, which is stored in immature recipient oocytes [Masui and Markert, 1971; Gautier and Maller, 1991]. The activation of this auto-amplification loop is achieved through the activation of Cdc25 and is independent upon protein synthesis [Wasserman and Masui, 1975; Hoffmann et al., 1993; Rime et al., 1994;

Strausfeld et al., 1994]. Though it has been pointed out that egg cytoplasm triggers GVBD in absence of protein synthesis, for example, p39^{Mos}, GVBD is noticeably delayed in these conditions [Wasserman and Masui, 1975; Sellier and Bodart, personal observation]. These conditions offer possibilities to explore directly the effects of pHi variation on MPF activity and on the auto-amplification activation loop induced by egg cytoplasm injection. NH₄Cl (1–10 mM) never delayed Cyclin B2 phosphorylation or Cdk1 Tyr 15 phosphorylation induced by egg-cytoplasm injection leading to the conclusion that MPF auto-amplification loop was not affected by acidification. Similarly, Tris injection had no effect on MPF activation or GVBD kinetic when induced by egg cytoplasm injection. Taken together, these observations lead us to propose that neither Cdc25 nor Plx1 activities, involved in the autocatalytic loop of MPF [Rime et al., 1994; Strausfeld et al., 1994; Karaïskou et al., 2004], are impaired by acidification.

Best candidate for proton-sensitive mechanisms is the p39^{Mos} to Xp42^{Mpk1} pathway. NH₄Cl at 10 mM concentration but not 1 mM delayed p39^{Mos} synthesis and subsequent Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylations induced by MPF in egg cytoplasm injected oocytes. The GVBD delay observed at this concentration is similar to the delay induced by the lack of p39^{Mos} accumulation in p39^{Mos} antisense-egg cytoplasm co-injected oocytes (data not shown). Moreover, delay observed in NH₄Cl-treated oocytes following hormonal stimulation is in a range close to the one observed in absence of p39^{Mos} synthesis, when GVBD and MPF activation are induced by progesterone [Gross et al., 2000; Dupre et al., 2002] or insulin [Baert et al., 2003]. Acidification might impair the positive feed back between Xp42^{Mpk1} and its upstream activator p39^{Mos}, through p39^{Mos} Ser 3 phosphorylation [Matten et al., 1996] or mRNA recruitment by polyadenylation [Howard et al., 1999].

Erk proteins have been shown in other models to be potentially regulated by intracellular pH. Evidence have been accumulated that antagonist of NHE-1 could partially inhibit stretch-induced Erk activation in cardiomyocytes [Takewaki et al., 1995]. Similarly, Erk can be regulated by NHE in RASM cells [Mukhin et al., 2004]. In *Xenopus laevis* oocytes, thiophosphorylated active MAPK triggers M-phase entry in a protein synthesis dependent manner

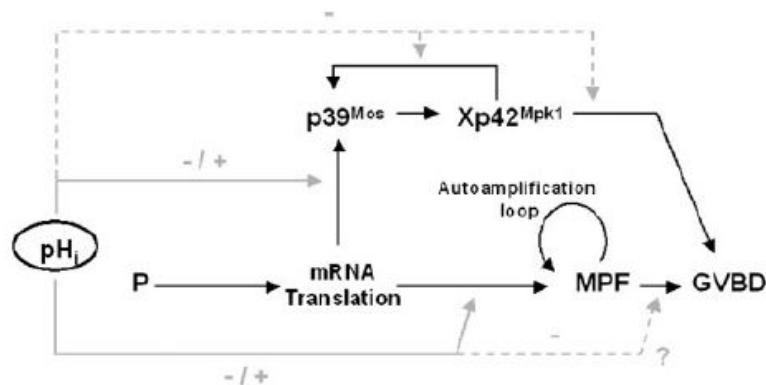


Fig. 8. Working model for the influence of pH_i on signaling pathways of meiosis. Precocious steps leading to MPF and MAPK activation stimulated by progesterone are sensitive to pH_i changes: their activation is delayed by acidification or accelerated by alkalization (gray). GVBD induced by active MAPK is

inhibited by acidification but not affected by alkalization (gray, broken line). MPF auto-amplification loop is not affected by pH_i variation but MPF induced GVBD is delayed by high concentration of NH_4Cl (10 mM). Nevertheless, this delay might account for the delay in p39^{Mos} accumulation.

[Haccard et al., 1995]. In our hands, GVBD and MPF activation, induced by thiosphorylated active MAPK, were not impaired by alkalization (Tris pH 9 injections) but were dramatically inhibited by pH_i decrease induced by NH_4Cl . MAPK-induced GVBD might be inhibited at two different levels: (1) Though no study has been carried out to determine the influence of pH_i on thiosphorylated active MAPK, the latter might be sensitive to proton, like reported for MAPK; indeed, protonation of functional groups of the activation segment of MAPK prevent in vitro the activation of the enzyme by promoting a stable closed conformation at pH 5.5 [Tokmakov et al., 2000]. (2) Protein synthesis is required for thiosphorylated active MAPK to induce the activation of the endogenous pool of Xp42^{Mpk1} and the M-phase entry. In one hand, acidification could prevent the establishment of a positive feed back loop between Xp42^{Mpk1} and its upstream activator p39^{Mos}. In another hand, acidification could inhibit the synthesis of another protein, which remain to be determined and would be necessary for thiosphorylated active MAPK to trigger GVBD.

These observations provide a new framework to decipher the influence of pH_i changes on signaling pathways in amphibian meiosis. Because MPF autocatalytic loop is not delayed and because there is no delay between p39^{Mos} accumulation and Xp42^{Mpk1} phosphorylation, it can be hypothesized that early mechanisms leading to p39^{Mos} synthesis and MPF activation are proton-sensitive: they can be either acceler-

ated by alkalization or delayed by acidification (Fig. 8). Moreover, our results provide in vivo evidence that MAPK pathway activity is severely inhibited by acidification and does not promote M-phase entry in these conditions. Since these signaling pathways are highly conserved in eukaryotic cells, this model might be extended to other species or cell type.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Arlette Lescuyer-Rousseau for technical assistance. We also thank Drs Duesbery, Antoine-Paul, and Standart for helpful suggestions and comments, as well as Mrs Dehennaut.

REFERENCES

- Abrieu A, Doree M, Fisher D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 114(Pt 2):257–267.
- Baert F, Bodart JF, Bocquet-Muchembled B, Lescuyer-Rousseau A, Vilain JP. 2003. Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 278(50):49714–49720.
- Bodart JF, Flament S, Vilain JP. 2002. Metaphase arrest in amphibian oocytes: Interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol Reprod Dev* 61(4):570–574.
- Bodart JF, Baert FY, Sellier C, Duesbery NS, Flament S, Vilain JP. 2005. Differential roles of p39(Mos)-Xp42(Mpk1) cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 283:373–383.
- Burckhardt BC, Fromter E. 1992. Pathways of NH_3/NH_4^+ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Arch* 420(1):83–86.

- Burckhardt BC, Thelen P. 1995. Effect of primary, secondary and tertiary amines on membrane potential and intracellular pH in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch* 429(3):306–312.
- Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T, Labbe JC. 2001. Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 12(9):2660–2671.
- Cicirelli MF, Robinson KR, Smith LD. 1983. Internal pH of *Xenopus* oocytes: A study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev Biol* 100(1):133–146.
- Doppler W, Jaggi R, Groner B. 1987. Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* 54(1):147–153.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136(2):153–79.
- Dupre A, Jessus C, Ozon R, Haccard O. 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 21(15):4026–4036.
- Ferrell JE, Jr., Wu M, Gerhart JC, Martin GS. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol Cell Biol* 11(4):1965–1971.
- Fisher DL, Brassac T, Galas S, Doree M. 1999. Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* 126(20):4537–4546.
- Flament S, Bodart JF, Browaeys E, Bertout M, Rousseau A, Gannon J, Vilain JP. 1996. *Xenopus* oocyte maturation: Cytoplasm alkalinization is involved in germinal vesicle migration. *Int J Dev Biol* 40(2):471–476.
- Flament S, Bodart JF, Browaeys E, Bertout M, Rousseau A, Gannon J, Vilain JP. 1997. Procaine-induced maturation of *Xenopus* oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor. *Zygote* 5(1):11–19.
- Frank-Vaillant M, Haccard O, Ozon R, Jessus C. 2001. Interplay between Cdc2 kinase and the c-Mos/MAPK pathway between metaphase I and metaphase II in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 231(1):279–288.
- Gautier J, Maller JL. 1991. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: Implications for the mechanism of pre-MPF activation. *EMBO J* 10(1):177–182.
- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54(3):433–439.
- Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. 1996. The localization of p34cdc2 in the cells of normal, hyperplastic, and malignant epithelial and lymphoid tissues of the oral cavity. *J Pathol* 178(4):422–428.
- Goss GG, Jiang L, Vanderpe DH, Kieller D, Chernova MN, Robertson M, Alper SL. 2001. Role of JNK in hypertonic activation of Cl(–)-dependent Na(+)/H(+) exchange in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6):1978–1990.
- Grandin N, Charbonneau M. 1989. Intracellular pH and the increase in protein synthesis accompanying activation of *Xenopus* eggs. *Biol Cell* 67(3):321–330.
- Grandin N, Charbonneau M. 1990. Cycling of intracellular pH during cell division of *Xenopus* embryos is a cytoplasmic activity depending on protein synthesis and phosphorylation. *J Cell Biol* 111(2):523–532.
- Grandin N, Rolland JP, Charbonneau M. 1991. Changes in intracellular pH following egg activation and during the early cell cycle of the amphibian *Pleurodeles waltlii*, coincide with changes in MPF activity. *Biol Cell* 72(3):259–267.
- 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(8):430–438.
- Haccard O, Lewellyn A, Hartley RS, Erikson E, Maller JL. 1995. Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol* 168(2):677–682.
- Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV. 1987. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 7(5):1984–1988.
- Harguindeguy S, Pedraz JL, Garcia Canero R, Perez de Diego J, Cragoe EJ, Jr. 1995. Hydrogen ion-dependent oncogenesis and parallel new avenues to cancer prevention and treatment using a H(+)-mediated unifying approach: pH-related and pH-unrelated mechanisms. *Crit Rev Oncog* 6(1):1–33.
- Hausen P, Riebesell M. 1991. The early development of *Xenopus laevis*. Berlin: Springer-Verlag.
- Hesketh TR, Moore JP, Morris JD, Taylor MV, Rogers J, Smith GA, Metcalfe JC. 1985. A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature* 313(6002):481–484.
- Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 12(1):53–63.
- Houle JG, Wasserman WJ. 1983. Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 97(2):302–312.
- Howard EL, Charlesworth A, Welk J, MacNicol AM. 1999. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* 19(3):1990–1999.
- Kang MG, Kulisz A, Wasserman WJ. 1998. Raf-1 kinase, a potential regulator of intracellular pH in *Xenopus* oocytes. *Biol Cell* 90(6–7):477–485.
- Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orłowski J. 1994. Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* 269(38):23544–23552.
- Karaiskou A, Lepretre AC, Pahlavan G, Du Pasquier D, Ozon R, Jessus C. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development* 131(7):1543–1552. Epub 2004 Feb 25.
- Kumagai A, Dunphy WG. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64(5):903–914.
- Lee SC, Steinhardt RA. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 85(2):358–369.
- Lorca T, Labbe JC, Devault A, Fesquet D, Capony JP, Cavadore JC, Le Bouffant F, Doree M. 1992. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2

- kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J* 11(7): 2381–2390.
- 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):1–17.
- Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177(2):129–145.
- Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude GF. 1996. Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* 179(2):485–492.
- Mukhin YV, Garnovskaya MN, Ullian ME, Raymond JR. 2004. ERK is regulated by sodium-proton exchanger in rat aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 279(3):1845–1852.
- Nurse P, Hartwell L. 1998. Understanding the cell cycle. *Nat Med* 4:1103–1106.
- Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J* 17(17): 5037–5047.
- Perona R, Serrano R. 1988. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334(6181):438–440.
- Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. 1984. A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(15): 4833–4837.
- Putney LK, Denker SP, Barber DL. 2002. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:527–552.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M. 2000. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 14(14):2185–2197.
- Rezai K, Kulisz A, Wasserman WJ. 1994. Protooncogene product, c-mos kinase, is involved in upregulating Na⁺/H⁺ antiporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 267(6 Pt 1):C1717–C1722.
- Rime H, Huchon D, De Smedt V, Thibier C, Galaktionov K, Jessus C, Ozon R. 1994. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol Cell* 82(1):11–22.
- Rodeau JL, Vilain JP. 1987. Changes in membrane potential, membrane resistance, and intracellular H⁺, K⁺, Na⁺ and Cl⁻ activities during the progesterone-induced maturation of urodele amphibian oocytes. *Dev Biol* 120:481–493.
- Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J, Vande Woude GF. 1988. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335(6190):519–525.
- Solomon MJ. 1993. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 5(2):180–186.
- Stith BJ, Maller JL. 1985. Increased intracellular pH is not necessary for ribosomal protein S6 phosphorylation, increased protein synthesis, or germinal vesicle breakdown in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 107(2):460–469.
- Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, Lamb NJ. 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.
- Takewaki M, Kuro-o M, Hiroi Y, Yamazaki T, Noguchi T, Miyagishi A, Nakahara K, Aikawa M, Manabe I, Yazaki Y, Nagai R. 1995. Activation of Na(+)-H(+) antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 27(1):729–742.
- Tokmakov AA, Sato KI, Fukami Y. 2000. Deregulation of mitogen-activated protein kinase at low pH due to a structural rearrangement of activation segment. *Biochim Biophys Acta* 1476(1):66–74.
- Wasserman WJ, Houle JG. 1984. The regulation of ribosomal protein S-6 phosphorylation in *Xenopus* oocytes: A potential role for intracellular pH. *Dev Biol* 101(2):436–445.
- Wasserman WJ, Masui Y. 1975. Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* 91(2):381–388.

PUBLICATION II

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Developmental Biology 283 (2005) 373–383

DEVELOPMENTAL
BIOLOGYwww.elsevier.com/locate/ydbio

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

J.-F.L. Bodart^{a,*}, F.Y. Baert^{a,1}, C. Sellier^a, N.S. Duesbery^b, S. Flament^c, J.-P. Vilain^a^aLaboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France^bLaboratory of Cancer and Developmental Cell Biology, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, MI 49503, USA^cFaculté des Sciences, EA 3442, Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré, entrée 1B, 9^{ème} étage, Boulevard des Aiguillettes, BP239, 54506, Vandœuvre les Nancy CEDEX, France

Received for publication 16 December 2004, revised 12 April 2005, accepted 15 April 2005

Available online 23 May 2005

Abstract

Fully-grown G2-arrested *Xenopus* oocytes resume meiosis upon hormonal stimulation. Resumption of meiosis is characterized by germinal vesicle breakdown, chromosome condensation, and organization of a bipolar spindle. These cytological events are 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 phosphorothioate 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 when meiosis was 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, inhibition of either p39^{Mos} accumulation or MEK1 inhibition led to the formation of a cytoplasmic aster-like structure that was associated with condensed chromosomes. Spindle morphogenesis rescue experiments using constitutively active Rsk and purified murine Mos protein suggested that p39^{Mos} or p90^{Rsk} alone failed to promote meiotic spindle organization. Our results indicate that activation of the p39^{Mos}–MEK1–Xp42^{Mpk1}–p90^{Rsk} pathway is required for bipolar organization of the meiotic spindle at the cortex.

D 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Spindle formation; p39^{Mos}; MAP Kinase; Meiosis; *Xenopus*

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. Release from prophase I-arrest is analogous to G2/M transition, and is characterized by the movement of the nucleus or germinal vesicle (GV) towards the animal cortex, breakdown of the nuclear envelope

(germinal vesicle breakdown or GVBD), chromosome condensation, and the formation of a bipolar spindle. Anchoring of the spindle at the cortex is accompanied by 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. The second division resumes in absence of interphase and arrests at metaphase II in preparation 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).

* Corresponding author. Fax: +33 32043 4038.

E-mail address: Jean-Francois.bodart@univ-lille1.fr (J.-F.L. Bodart).

¹ Co-authors.

Cytological events of maturation are triggered by the activation of protein kinase signaling pathways culminating with the activation of M-phase promoting factor (MPF), a cytoplasmic protein complex that controls G2/M transition. MPF 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 et al., 1998). At the same time, Xp42^{Mpk1} is phosphorylated and activated (Ferrell et al., 1991). Xp42^{Mpk1} is a mitogen-activated protein kinase (MAPK) that is turned on following progesterone-induced synthesis of p39^{Mos} (a mitogen-activated protein kinase kinase kinase) and subsequent phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) (Nebreda and Hunt, 1993; Sagata et al., 1988). Xp42^{Mpk1} in turn phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (p90^{Rsk}). Accumulation of p39^{Mos} can either be controlled 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). Activity of the p39^{Mos}–Xp42^{Mpk1} pathway is not required in *Xenopus* oocytes (Bodart et al., 2002; Fisher et al., 1999; Gross et al., 2000). However, this pathway has been shown to be responsible for S-Phase suppression between meiosis I and meiosis II; inhibition of p39^{Mos} synthesis (Dupre et al., 2002; Furuno et al., 1994) or inhibition of MEK1 activity (Gross et al., 2000) prevents meiosis I–meiosis II transition and allows inappropriate DNA replication.

Available evidence indicates that the MAPK pathway is involved in spindle formation and stabilization. In mouse oocytes, MAPK has been found to be associated with MTOC (Verlhac et al., 1994). In mouse and pig oocytes, MAPK distributes to the metaphase spindle and migrates to the middle of the spindle during the transition from anaphase to telophase (Hatch and Capco, 2001; Lee et al., 2000). 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 MAPK pathway is inactive fail to assemble a normal spindle (Araki et al., 1996; Bodart et al., 2002; Choi et al., 1996; Zhao et al., 1991). Phosphorylation of two MAP kinase substrates is required for normal meiotic spindle morphogenesis in mouse oocytes (Lefebvre et al., 2002; Terret et al., 2003). However, mouse oocytes deficient in MAP kinase activity can still divide and release polar body. In this case, the polar body is abnormally large (Verlhac et al., 2000).

This study was undertaken to analyze *in vivo* the effects of p39^{Mos}–Xp42^{Mpk1} pathway on meiotic spindle. 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 analyzed 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 Xp42^{Mpk1}. 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.

Materials and methods

Isolation of oocytes

Adult *Xenopus* females were purchased from University of Rennes I, France. After anesthetizing frogs by immersion in 1 g/l MS222 solution (tricaine methane sulfonate, Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium [96 mM NaCl, 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 defolliculated by partial collagenase treatment for 30 min (1 mg/ml collagenase A, Roche), followed by manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium prior to use. All treatments were started within 24 h of ovariectomies.

Antisense oligonucleotides

Phosphorothioate deoxyribo-oligonucleotides were purchased from Eurogentec. The sequence of the antisense against p39^{Mos} was AAGGCATTGCTGTGACTCGCTGAAAC 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 GGGGAAGGCATTGCTGTGACTCGC. As a control, we used the inverted sequence CGCTCAGTGTGTCGTTACGGAAGGG and also a standard sense control CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA.

For both phosphorothioate and morpholino oligonucleotides, 1 ng was microinjected into each oocyte by the use of a positive displacement digital micropipette (Nichiroyo). Oocytes were then incubated in ND96 medium for progesterone experiments and in OR-2 medium for insulin experiments (see Baert et al., 2003). U0126 (Promega) was prepared in DMSO and used at a final concentration of 10 to 50 µM. Treatments began 1 h before progesterone or insulin addition. Control oocytes were treated with an identical amount of DMSO (0.2% to 1%).

Oocyte treatments

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 (in a volume of 50 nl) just prior to progesterone or insulin treatment.

Resumption of meiosis was stimulated by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 μ M progesterone (Sigma). Incubation in DMSO (1%) or injection with PSS (Phosphorothioate Sense oligonucleotide) was used as controls for U0126 and PSAS (Phosphorothioate Antisense oligonucleotide) experiments, respectively. Batches of injected oocytes (30 to 60) from different females (n = number of animals) were observed every hour and scored for the appearance of white spot. Experiments were ended 2 h after stabilization of white-spot percentage (10 to 14 h after first white-spot appearance). Three to 5 oocytes were frozen at -20°C for later biochemical analysis and the rest of the oocytes were fixed for cytological analysis (see below).

Cytological and immunocytological analysis

For classical cytological analysis, oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (7 μ m thick) were stained with nuclear red to detect nuclei and chromosomes and with picroindigo carmine 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- μ m sections were cut and stained with 1 μ g/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 lysed in homogenization buffer (Azzi et al., 1994) and then centrifuged for 5 min at $10,000\times g$ (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 for Raf, p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, and p90^{Rsk} immunodetection (Bodart et al., 1999). Xp42^{Mpk1} was detected using the D-2 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1/1000). p39^{Mos} was detected using the C238 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1/1000). p90^{Rsk} detection was performed using the C21 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1/1000). Raf was detected using the C20 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1/500) and phospho-MEK detection was performed using a polyclonal antibody (Calbiochem; 1/1000). Signals were detected by using enhanced chemoluminescence (Amersham).

Statistical analysis

Statistical analyses of kinetic experiments were performed by a logrank test (survival test). Observed counts in cytological studies were compared using the chi-square analysis of contingency tables or the Fisher exact test if one or more values were equal to zero.

Results

Dose-dependent effects of MEK inhibition on G2/M transition

To analyze the impact of the inhibition of the p39^{Mos}–MEK1–Xp42^{Mpk1}–p90^{Rsk} pathway on spindle morphogenesis, we determined 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 observations reported by Gross et al. (2000) indicated that 50 μ M U0126 did not block progesterone-induced GVBD but rather delayed it. Using increasing concentration of U0126 (10 to 50 μ M) on progesterone-stimulated oocytes, we similarly observed that U0126 never prevented GVBD though it did delay GVBD (Fig. 1A). Even at 100 μ M, U0126 did not prevent GVBD (data not shown). In oocytes treated by U0126 10 μ M, time of GVBD₅₀ (time to which 50% of the oocytes underwent

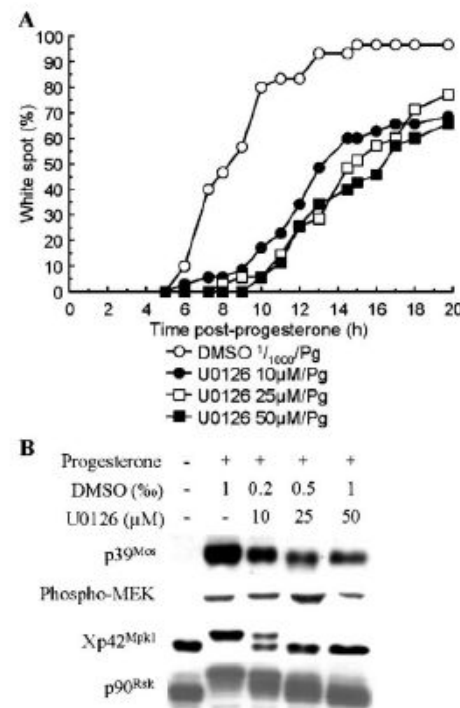


Fig. 1. Dose-dependent effects of MEK inhibitor U0126 on progesterone-induced GVBD. (A) Control oocytes were incubated in ND medium containing 1/1000 DMSO (open circles). U0126-inhibited oocytes were incubated in ND medium containing 10 (black circle), 25 (open square), or 50 μ M U0126 (black square). 1 h 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 h), 5 oocytes were taken off, homogenized and immunoblotted with antibodies against p39^{Mos}, Xp42^{Mpk1}, phospho-MEK, and p90^{Rsk}.

meiotic resumption) was 1.5 ± 0.2 fold of GVBD₅₀ of control oocytes treated with DMSO. By contrast, in oocytes treated with U0126 50 μ M, time of GVBD₅₀ was 1.8 ± 0.1 fold of control oocytes. This difference may suggest that the effects of U0126 may be dose-dependent. In support of this, a logrank test showed heterogeneity between GVBD kinetics in DMSO, U0126 10, 20, and 50 μ M ($P < 0.05$, $n = 4$).

The preceding results suggest that MAPK activity is dispensable for GVBD in *Xenopus* oocytes. To confirm this, we examined the effects of U0126 upon p39^{Mos} accumulation as well as the phosphorylation status of Xp42^{Mpk1} and its downstream target p90^{Rsk} by Western blotting at the end of each experiment (20 h 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 and stimulated with progesterone (second lane), p39^{Mos} was present and Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} were phosphorylated. By contrast, Xp42^{Mpk1} and p90^{Rsk} phosphorylation were only partially inhibited in oocytes treated with 10 μ M U0126 and progesterone, 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). 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 et al. (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 al., 2003), U0126 incubation partially inhibited Raf phosphorylation in progesterone-stimulated oocytes (Fig. 5, lane 7). These results show that MAPK activity is indeed dispensable for GVBD in *Xenopus* oocytes.

Interestingly, though inhibition of MAPK activation did not prevent GVBD, it did significantly inhibit white-spot formation. The percentage of control (DMSO-treated) oocytes with white spots was 93.1 ± 3.6 compared with 66 ± 9.8 , 58.7 ± 9.1 , and 58.1 ± 8.8 of oocytes treated with 10, 25, or 50 μ M U0126, respectively. Decreased white-spot formation was not a reflection of delayed progression through meiosis as the rate of white-spot formation in U0126-treated oocytes did not increase beyond these levels for at least 20 h after progesterone treatment. These results suggest that inhibition of MAPK activation somehow interferes with anchoring of the meiotic spindle at the cortex.

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

The effects of U0126 upon GVBD may be attributed to non-specific effects on different signaling pathways. To control for this, we used alternative strategies to inhibit the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway. Previously, we have reported that injection of antisense phosphorothioate oligonucleo-

tides of p39^{Mos} (p39^{Mos}-PSAS) not only prevented activation of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway but also delayed GVBD (Baert et al., 2003). Here, we report similar effects with antisense Morpholino oligonucleotides (p39^{Mos}-MAS) against p39^{Mos} synthesis on progesterone-stimulated oocytes (Fig. 2A). Injection of 1 ng of sense Morpholinos oligonucleotides (p39^{Mos}-MS) of p39^{Mos} had no effect on maturation time course: time of GVBD₅₀ was 1.0 ± 0.1 fold those of control oocytes injected with water. In contrast, the time of GVBD₅₀ of p39^{Mos}-MAS-injected oocytes was increased by 1.4 ± 0.1 fold.

To confirm that these oligonucleotides prevented p39^{Mos} synthesis, we used Western blotting to examine their effects on the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway (Fig. 2B). p39^{Mos} was detected in neither immature oocytes nor p39^{Mos}-MAS-injected oocytes. As expected, lack of p39^{Mos} synthesis 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 prevents p39^{Mos} synthesis, MEK1 phosphorylation, and Xp42^{Mpk1} activation (Fig. 2B) and causes a delay in GVBD. Thus, both phosphorothioate and Morpholinos strategies can be used as alternative strategies to prevent activation of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway.

Blocking p39^{Mos} synthesis or inhibition of MEK1 alters bipolar spindle morphogenesis and induces aster-like formation following progesterone stimulation

Our observation that white-spot formation was inhibited by U0126 suggested that MAPK inhibition interfered with meiotic spindle anchoring at the cortex. Curiously, p39^{Mos}-MAS injection had little or no effect on white-spot formation (Fig. 2A). In progesterone-stimulated oocytes, p39^{Mos}-MAS injection resulted in 82.0 ± 7.3 of white spot compared to 85.5 ± 3.3 in water-injected oocytes and 75.6 ± 8.6 in p39^{Mos}-MS-injected oocytes. To investigate this further, we performed cytological and immunocytological analyses on progesterone and insulin-stimulated oocytes that had been treated with either U0126 or p39^{Mos}-antisense oligonucleotides. These analyses were performed 2 h after stabilization of white-spot percentage. Control DMSO-treated oocytes stimulated by progesterone exhibited meiotic spindles at the cortex with condensed chromosomes on a metaphase plate in 93.0 ± 5.0 of oocytes examined (Table 1; Figs. 3F–H) and spindle formation was slightly decreased in control oocytes injected with p39^{Mos}-PSS (82.0 ± 1.1 bipolar spindle; Table 1 and Figs. 3L–N). Similarly, although the proportion of oocytes with bipolar spindles were lower in control p39^{Mos}-MS-injected oocytes, there was no significant difference in regard to cytological structures found in p39^{Mos}-MS-injected versus control H₂O-injected oocytes (58.0 ± 7.1 and $73.2 \pm 5.7\%$, respectively; Table 1). Similarly, there was no significant difference between H₂O and p39^{Mos}-PSS-injected oocytes ($n = 5$). By contrast, inhibition of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway using antisense oligonucleotides

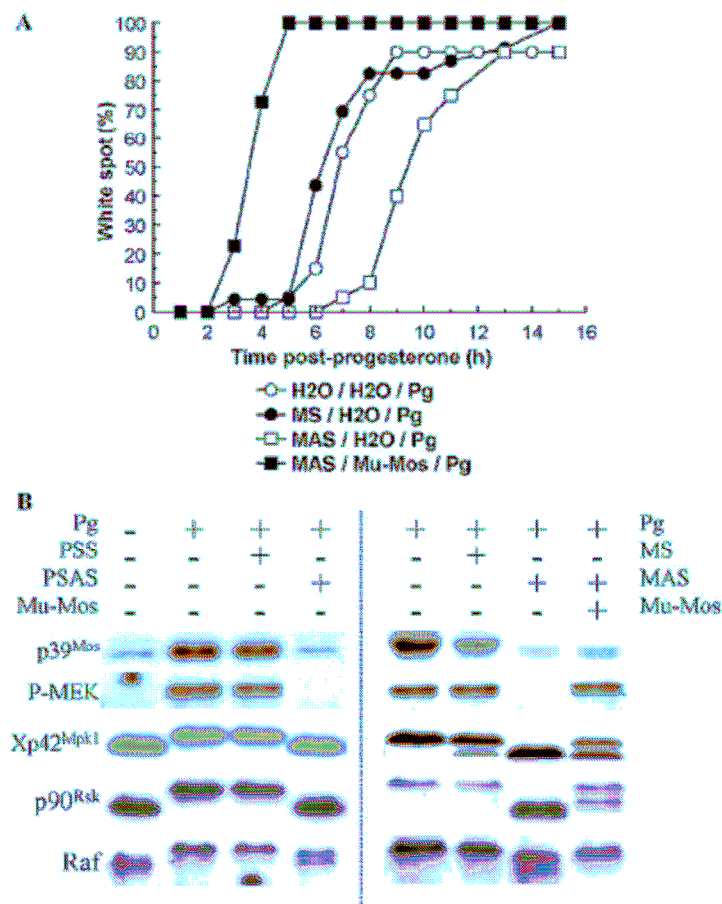


Fig. 2. $p39^{Mos}$ accumulation, MEK1 phosphorylation, $Xp42^{Mpk1}$ and $p90^{Rsk}$ activation, and Raf full phosphorylation are prevented by $p39^{Mos}$ antisense oligonucleotides in progesterone-stimulated oocytes. (A) Control oocytes were micro-injected with water (H_2O/pg ; open circles) or $p39^{Mos}$ -sense Morpholinos oligonucleotides (MS/pg; black circles). A batch of oocytes was 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). After overnight incubation, oocytes were stimulated by progesterone. Appearance of white spot was monitored every 30 min 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 h), 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.

or U0126 resulted in a significant decrease in bipolar spindle formation (Table 1; Figs. 3R, S and 4J, K). Bipolar meiotic metaphase spindles were observed in only $17.0\% \pm 7.2$ of the oocytes treated with $50 \mu M$ U0126, in $10.0\% \pm 10.0$ of oocytes injected with $p39^{Mos}$ -PSAS and in $3.8\% \pm 3.8$ of oocytes injected with $p39^{Mos}$ -MAS (Table 1). Statistical analysis confirmed that there was a significant difference between DMSO and U0126 $50 \mu M$ -treated oocytes, between $p39^{Mos}$ -MS and $p39^{Mos}$ -MAS-injected oocytes and between $p39^{Mos}$ -PSS and $p39^{Mos}$ -PSAS-injected oocytes (each $P < 0.001$, $n = 3$).

The percentage of bipolar spindles observed in U0126-treated oocytes decreased in a dose-dependent manner (Table 1; Fig. 3R): whereas $41.0\% \pm 19.5$ of $10 \mu M$ U0126-treated oocytes exhibited a bipolar spindle, only

$9.2\% \pm 5.8$ of $25 \mu M$ U0126-treated oocytes did (Table 1; Fig. 3R). If we failed to detect bipolar spindles in these oocytes, we observed aster-like structures (Table 1; Fig. 3R). The formation of aster-like structures in U0126-treated oocytes appeared to be dose-dependent (Table 1; Fig. 3R); $10 \mu M$ U0126 induced aster formation in $17.9\% \pm 17.9$ of oocytes whereas $50 \mu M$ U0126 led to the formation of aster-like structures in 61.2 ± 9.3 of oocytes ($P < 0.05$).

Similar to U0126-treated oocytes, aster-like structures were found in $76.0\% \pm 10.8$ of the oocytes injected with $p39^{Mos}$ -PSAS (Table 1; Figs. 3O–Q and 4K) and $78.7\% \pm 2.9$ of the oocytes injected with $p39^{Mos}$ -MAS (Table 1; Figs. 3E and 4B, K). 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

Table 1
Effects of U0126, p39^{Mos}-MAS, and PSAS oligonucleotides on spindle morphogenesis following progesterone-induced maturation

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

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).

p39^{Mos}-PSS and in 10.2% $\pm$ 4.5 of the oocytes injected with p39^{Mos}-MS (Table 1).

Upon further confirmation of these results, we noted that the extrusion of the first polar body was also impaired by inhibition of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway. Detection of the 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 (Figs. 3C and 4A). 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 was. While 10 μ M U0126 did not totally block Xp42^{Mpk1} phosphorylation as shown in Fig. 1B, this partial inhibition was sufficient to prevent polar body extrusion. Similarly, polar bodies were not detected in p39^{Mos}-MAS-injected oocytes.

To confirm the presence of condensed chromosomes in association with these aster-like structures, we performed immunofluorescent staining using Hoechst and antibodies directed against tubulin on sections of cold methanol-fixed oocytes. We observed condensed chromosomes that had undergone diakinesis associated with microtubules both in U0126-treated (Figs. 3I–K) and p39^{Mos}-antisense-injected oocytes (Figs. 3O–Q). Interestingly, where 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, this is unlikely, since, on such a polar view, we would not expect to observe nucleated microtubules radiating around an aggregate of chromosomes. The

aster-like structures observed were always larger than metaphase spindles (i.e., in 50 μ M U0126-treated oocytes, aster-shaped microtubular structures observed are 2.0 ± 0.5 fold larger than control metaphase II spindle; also compare Figs. 3H and N with K and Q) and were never located at the cortex but rather were observed in the subcortical cytoplasm. Indeed, in p39^{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. Similarly, 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.

Collectively, these results establish that inhibition of the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway by either a small-molecule inhibitor or p39^{Mos}-antisense strategies prevents spindle formation, not by preventing microtubule nucleation but by blocking establishment of a bipolar axis.

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

To confirm the requirement for the p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} pathway in bipolar spindle formation, rescue experiments were performed using Mu-Mos or CA-Rsk, a downstream substrate of MAPK (Figs. 4 and 5). 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 ($n=5$; Table 1; Figs. 4C and K) and in 75% of p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes ($n=2$; Table 1 and Fig. 4K), the injection of CA-Rsk failed to properly rescue normal spindle morphogenesis in p39^{Mos}-PSAS-injected oocytes (19 $\pm$ 13.2, $n=3$; Table 1 and Figs. 4D–F and K). We determined that there were no significant differences between control oocytes injected with p39^{Mos}-PSS and oocytes co-injected with Mu-Mos and p39^{Mos}-PSAS, as well as between control oocytes injected with p39^{Mos}-MS and oocytes co-injected with Mu-Mos and p39^{Mos}-MAS.

Consistent with its role as an upstream activator of MEK1, we observed that Mu-Mos was not able to restore a metaphase spindle at the cortex in U0126-treated oocytes (12.5% metaphase spindle vs. 57.5% aster; Table 1 and Fig. 4J). However, CA-Rsk injection at the same concentration as was used in antisense-injected oocytes rescued normal bipolar spindle in 74.9% $\pm$ 12.6 of U0126-treated oocytes (Table 1; Figs. 4G–I and J). These results indicate that inhibition of bipolar spindle formation is a specific consequence of MAP kinase pathway inhibition.

Discussion

Taken together, our results obtained using p39^{Mos} antisense strategies and chemical inhibitors of MEK as well

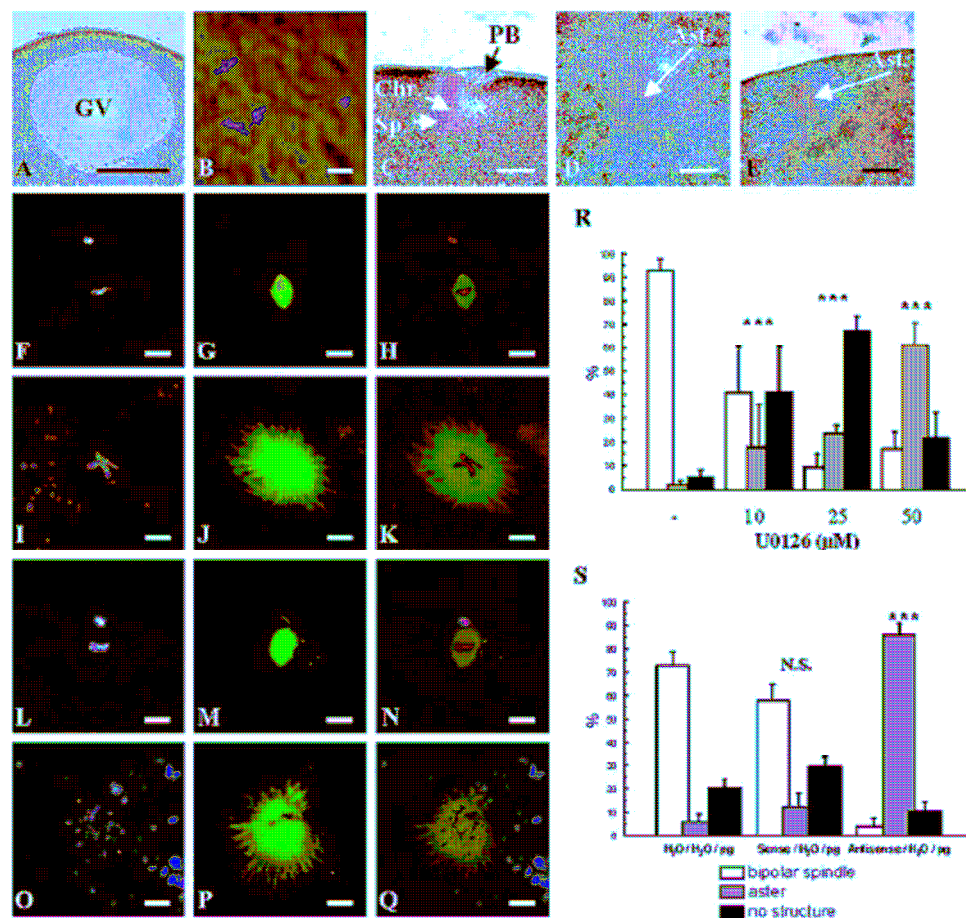


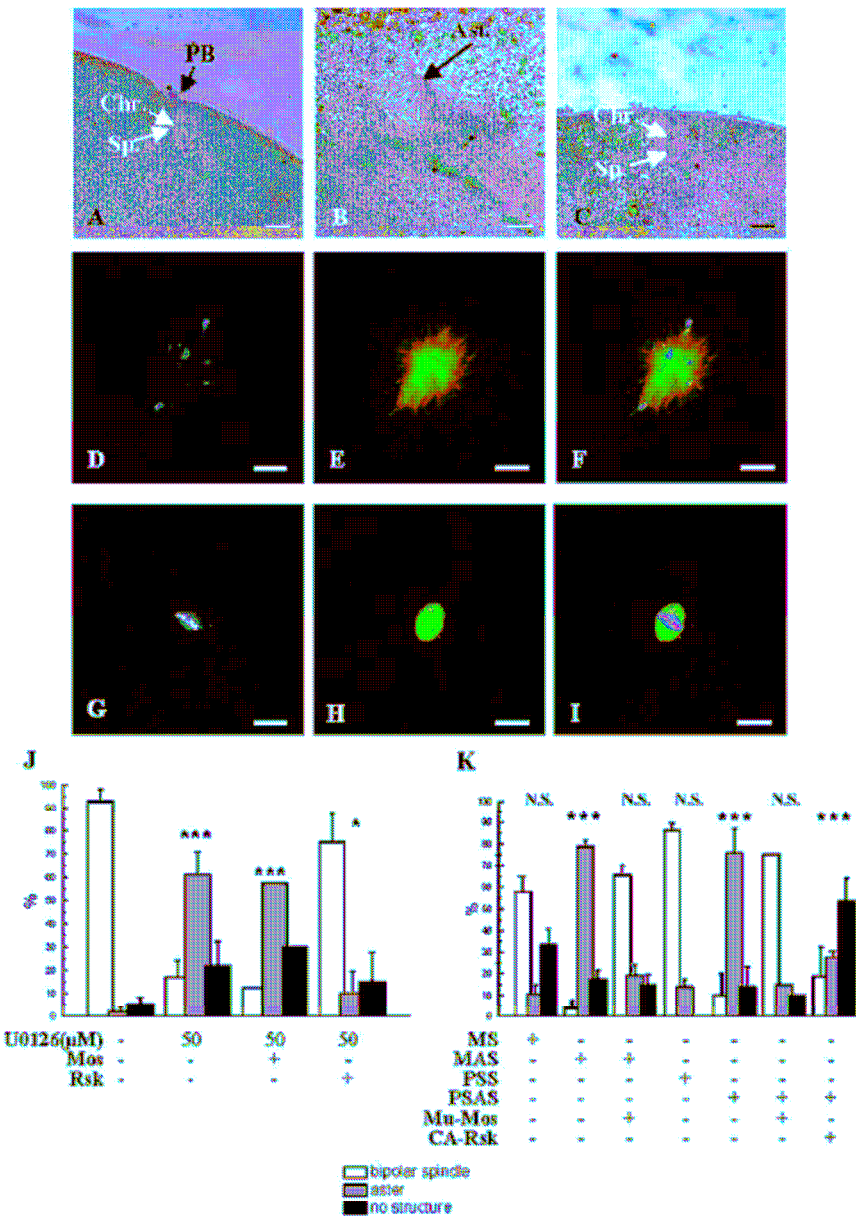
Fig. 3. Effects of U0126 or p39^{Mos}-antisense oligonucleotides on spindle morphogenesis during progesterone-induced maturation. (A–B) Immature non-treated oocytes. (A) Germinal vesicle (nuclear red/picro-indigo carmine staining). (B) Chromosomes decondensed at prophase I (Hoechst staining). (C) Metaphase II-arrested oocyte exhibits typical bipolar spindle with chromosomes and the first polar body (nuclear red/picro-indigo carmine 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 panel F. (H) Merging of panels F and G. (I–K) Typical aster-shaped microtubular structure with chromosomes of an oocyte treated with 50 μM U0126 and then incubated in presence of progesterone. (I) Hoechst staining. (J) Anti-tubulin staining of the same figure as panel I. (K) Merging of panels 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 panel L. (N) Merging of panels 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 panel O. (Q) Merging of panels O and P. Scale bars represent 15 μm except for panel A where scale bar represents 250 μm. 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 μM U0126 and then incubated in presence of progesterone. Error bars represent SEM values. Significance 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, gray bars show percentages of aster-shaped microtubular structures and black bars show percentages of oocytes lacking any microtubular structures. Error bars represent SEM values. Significance toward water/progesterone treatment is indicated. N.S.: nonsignificant ($P > 0.05$); *significant ($P < 0.05$); **very significant ($P < 0.01$); ***highly significant ($P < 0.001$).

as those of others have established that GVBD can occur in absence of p39^{Mos} accumulation or Xp42^{Mpk1} activity (Baert et al., 2003; Bodart et al., 2002; 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, personal

observations). This effect could be mediated by the p39^{Mos} capacity to directly phosphorylate Myt1 independently of p90^{Rsk} (Peter et al., 2002) or to promote protein synthesis through mos response element (de Moor and Richter, 1997). 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 shown that in vitro MAPK inhibition leads to half spindle

formation (Home and Guadagno, 2003). In accordance with previous reports, we failed to observe meiotic structures at the cortex of 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). Instead, we observed the formation of an aster-like structure in the cytoplasm in absence of MAPK activity. Kotani and Yamashita (2002) have reported the absence of



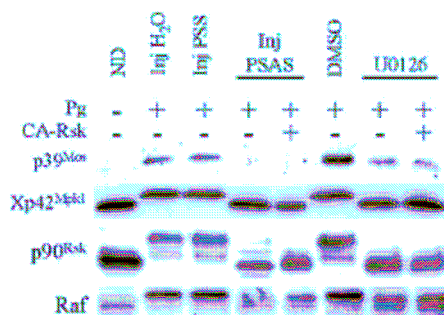


Fig. 5. Effects of $p39^{Mos}$ -antisense oligonucleotides and CA-Rsk injections in progesterone-stimulated oocytes. Western blot analysis. Homogenized oocytes were immunodetected with antibodies against $p39^{Mos}$, phospho-MEK, $Xp42^{Mpk1}$, $p90^{Rsk}$, and Raf. Constitutively active Rsk (CA-Rsk) injections did not restore the activation of any of the $p39^{Mos}$ -MEK1- $Xp42^{Mpk1}$ cascade nor affected Raf level of phosphorylation.

MTOC organization, chromosome condensation, and bipolar formation in U0126-treated *Rana japonica* oocytes. In U0126-treated oocytes, they observed a 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 chromosome 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 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

Table 2

Requirement of members of the $p39^{Mos}$ -MEK1- $Xp42^{Mpk1}$ - $p90^{Rsk}$ pathway in meiotic spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes

Treatment	Mos	$Xp42^{Mpk1}$	Rsk	Structure observed
S/DMSO	Y	Y	Y	Spindle
U0126	Y	N	N	Aster
U0126/Mu-Mos	Y	N	N	Aster
U0126/CA-Rsk	Y	N	Y	Spindle
$p39^{Mos}$ -AS	N	N	N	Aster
$p39^{Mos}$ -AS/CA-Rsk	N	N	Y	No structure
$p39^{Mos}$ -AS/Mu-Mos	Y	Y	Y	Spindle

S: $p39^{Mos}$ -sense oligonucleotides injection; $p39^{Mos}$ -AS: $p39^{Mos}$ -antisense oligonucleotides injection; Mu-Mos: murine Mos injection; CA-Rsk: constitutively active Rsk injection; Y stands for active status of protein as assessed by the phosphorylation status of the protein itself or for its downstream target; N stands for the absence of activation or presence of the considered protein.

Maturation is stimulated by progesterone.

abnormally large polar body (Verlhac et al., 2000). However, polar body extrusion was neither observed in $p39^{Mos}$ -AS-injected nor in U0126-treated oocytes in which $Xp42^{Mpk1}$ 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 cytoskeletal 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; Minshall 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

Fig. 4. 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 panel E. (G–I) Typical bipolar spindle with chromosomes as observed in oocytes treated with 50 μ M U0126, incubated 1 h and injected with constitutively active Rsk before progesterone stimulation. (H) Hoechst staining. (I) Anti-tubulin staining of the same figure as panel H. (J) Merging of panels H and I. (J) CA-Rsk but not murine Mos restored spindle formation in U0126-treated oocytes; histogram showing percentages of the different structure types observed in oocytes incubated stimulated with progesterone in presence of DMSO, 50 μ M U0126, or 50 μ M U0126 and injected with either constitutively active Mos or Rsk. Error bars represent SEM values. Significance toward DMSO/progesterone treatment is indicated. (K) Murine Mos but not CA-Rsk rescued bipolar axis establishment in AS-injected oocytes: 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 phosphorothioates oligonucleotides (PSS), or $p39^{Mos}$ -antisense phosphorothioates 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, gray bars show percentages of aster-shaped microtubular structures, and black bars show percentages of oocytes lacking any microtubular structures. Error bars represent SEM values. Significance toward water injection/progesterone treatment is indicated: N.S.: nonsignificant ($P > 0.05$); *significant ($P < 0.05$); **very significant ($P < 0.01$); ***highly significant ($P < 0.001$).

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 (Table 2). 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 (Table 2). 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, suggests 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 $p39^{Mos}$ may promote spindle organization through separate pathways.

$p39^{Mos}$ has been demonstrated to associate and phosphorylate tubulin (Zhou et al., 1991). Kinetochore 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-hybrid screening 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 work provides in ovo evidence 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.

Acknowledgments

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. Nebreda for murine Mos and CA-Rsk, and for helpful

discussions. This work was supported by grants from the French "Ministère de l'Éducation Nationale" (UPRES-EA 1033) and from the "Association pour la Recherche sur le Cancer".

References

- Abrieu, A., Lorca, T., Labbe, J.C., Morin, N., Keyse, S., Doree, M., 1996. MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* 109 (Pt. 1), 239–246.
- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D., 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J. Cell Sci.* 114, 257–267.
- Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y., Sato, E., 1996. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol. Reprod.* 55, 1315–1324.
- Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A.C., Lew, J., Wang, J.H., 1994. Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269, 13279–13288.
- Baert, F., Bodart, J.F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A., Vilain, J.P., 2003. Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 49714–49720.
- Becker, B.E., Romney, S.J., 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., Ferrell Jr., J.E., 1999. The protein kinase $p90^{Rsk}$ as an essential mediator of cytosolic factor activity. *Science* 286, 1362–1365.
- Bodart, J.F., Bechard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.P., Flament, S., 1999. Activation of *Xenopus* eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and $p39^{Mos}$ proteolysis. *Exp. Cell Res.* 253, 413–421.
- Bodart, J.F., Gutierrez, D.V., Nebreda, A.R., Buckner, B.D., Resau, J.R., Duesbery, N.S., 2002. Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev. Biol.* 245, 348–361.
- Choi, T., Rulong, S., Resau, J., Fukasawa, K., Matten, W., Kuriyama, R., Mansour, S., Ahn, N., Vande Woude, G.F., 1996. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4730–4735.
- Colledge, W.H., Carlton, M.B., Udy, G.B., Evans, M.J., 1994. Disruption of o-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 65–68.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95–105.
- de Moor, C.H., Richter, J.D., 1997. The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell Biol.* 17, 6419–6426.
- Duesbery, N.S., Choi, T., Brown, K.D., Wood, K.W., Resau, J., Fukasawa, K., Cleveland, D.W., 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, 9165–9170.
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–179.
- Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R., Haccard, O., 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 21, 4026–4036.

- Fan, H.Y., Tong, C., Lian, L., Li, S.W., Gao, W.X., Cheng, Y., Chen, D.Y., Schatten, H., Sun, Q.Y., 2003. Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol. Reprod.* 68, 968–977.
- Ferrell Jr., J.E., Wu, M., Gerhart, J.C., Martin, G.S., 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell Biol.* 11, 1965–1971.
- Fisher, D.L., Brassac, T., Galas, S., Doree, M., 1999 (Oct). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* 126 (20), 4537–4546.
- Frank-Vallant, M., Jessus, C., Ozon, R., Maller, J.L., Haccard, O., 1999. Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in *Xenopus* oocytes in response to progesterone. *Mol. Biol. Cell* 10, 3279–3288.
- Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., Sagata, N., 1994. Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 13, 2399–4410.
- Gard, D.L., Affleck, D., Enor, 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.
- Gross, S.D., Schwab, M.S., Lewellyn, A.L., Maller, J.L., 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* 286, 1365–1367.
- Gross, S.D., Schwab, M.S., Taiib, F.E., Lewellyn, A.L., Qian, Y.W., Maller, J.L., 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr. Biol.* 10, 430–438.
- Haccard, O., Sareevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J.L., 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262, 1262–1265.
- 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., 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., Riebesell, M., 1991. *The Early Development of Xenopus laevis*. Springer Verlag.
- Home, M.M., Guadagno, T.M., 2003. A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 161, 1021–1028.
- Howard, E.L., Charlesworth, A., Welk, J., MacNicol, A.M., 1999. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol. Cell Biol.* 19, 1990–1999.
- Kotani, T., Yamashita, M., 2002. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 252, 271–286.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R.M., 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* 8, 119–125.
- Lefebvre, C., Terret, M.E., Djiane, A., Rassiniere, P., Maro, B., Verhaac, M.H., 2002. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.* 157, 603–613.
- 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.
- Minshall, J., Sun, H., Tonks, N.K., Murray, A.W., 1994. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 79, 475–486.
- Nebreda, A.R., Hunt, T., 1993. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 12, 1979–1986.
- Nurse, P., Masui, Y., Hartwell, L., 1998. Understanding the cell cycle. *Nat. Med.* 4, 1103–1106.
- Pendiguero, E., Pillaire, M.J., Bodart, J.F., Hennesdorf, F., Frodin, M., Duesbery, N.S., Alonso, G., Nebreda, A.R., 2003. Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G2/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C. *EMBO J.* 22, 5746–5756.
- Peter, M., Labbe, J.C., Doree, M., Mandart, E., 2002. A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development* 129, 2129–2139.
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., Vande Woude, G.F., 1988. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335, 519–525.
- Terret, M.E., Lefebvre, C., Djiane, A., Rassiniere, P., Moreau, J., Maro, B., Verhaac, M.H., 2003. DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 130, 5169–5177.
- Verhaac, M.H., Kubiak, J.Z., Clarke, H.J., Maro, B., 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120, 1017–1025.
- Verhaac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassiniere, P., Maro, B., 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr. Biol.* 10, 1303–1306.
- Zhao, X., Singh, B., Batten, B.E., 1991. The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene* 6, 43–49.
- Zhou, R.P., Oskarsson, M., Paules, R.S., Schulz, N., Cleveland, D., Vande Woude, G.F., 1991. Ability of the c-mos product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science* 251, 671–675.

PARTIE II:

INFLUENCE DU pH_i SUR LA
MOBILISATION DU CALCIUM DANS
L'OVOCYTE IMMATURE ET MATURE
DE XENOPE

Partie II : Influence du pHi sur la mobilisation du calcium dans l'ovocyte immature et mature de l'ovocyte de Xénope

II.1. Contexte des recherches

Ces dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoquée par des signaux extracellulaires tels que les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines, est une étape clef dans la régulation de la prolifération cellulaire (Santella, 1998 ; Munaron et coll., 2004 ; Lipskaia et Lompre, 2004). La concentration de calcium intracellulaire peut-être augmentée par une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires, notamment à partir du réticulum endoplasmique et des mitochondries, et/ou un influx de calcium à partir du milieu extracellulaire (Parekh et Penner, 1997). Dans les cellules non excitables, l'augmentation du calcium résulte généralement de la production d'IP3 suite à l'hydrolyse des phospholipides par la PLC. L'IP3, en se liant à ses récepteurs présents au niveau du réticulum endoplasmique, induit une libération de calcium. La déplétion des stocks intracellulaires déclenche une entrée de calcium par les canaux SOC localisés au niveau de la membrane plasmique *via* un processus connu sous le nom de « store-operated Ca^{2+} entry » (SOCE ; Putney, 1992). Cet influx est essentiel à la reconstitution des stocks calciques intracellulaires et joue un rôle important dans la modulation des différents signaux calciques.

Chez la plupart des animaux, les ovocytes sont arrêtés en prophase I durant l'ovogenèse et la reprise méiotique est associée à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Cette augmentation a été observée chez l'Etoile de mer (Dorée et coll., 1978 ; Moreau et coll., 1978), les Bivalves (Guerrier et coll., 1993 ; Deguchi et Osanai, 1994, 1995), les Echinodermes (Johnston et Paul, 1977), les Amphibiens (O'Connor et coll., 1977 ; Moreau et coll., 1980 ; Wasserman et coll., 1980), la Souris et le Hamster (Fujiwara et coll., 1993 ; Carroll et coll., 1994). Les agents qui inhibent l'élévation de la concentration calcique intracellulaire inhibent la maturation chez l'Etoile de mer (Moreau et coll., 1978), les Bivalves (Dubé et Guerrier, 1982 ; Guerrier et coll., 1993), les Echinodermes (Johnston et Paul, 1977), les Amphibiens (Moreau et coll., 1976 ; Masui et coll., 1977), le Hamster (Racowsky, 1986). A l'inverse, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire

déclenche la maturation chez l'Etoile de mer (Moreau et coll., 1978), les Bivalves (Schuetz, 1975 ; Guerrier et coll., 1993), les Amphibiens (Wasserman et Masui, 1975b ; Moreau et coll., 1976 ; Schorderet-Slatkine et coll., 1976 et 1977).

Chez le Xénope, le rôle du calcium dans la levée du blocage en prophase I est beaucoup moins clair et les résultats obtenus apparaissent parfois contradictoires. Certains auteurs suggèrent que la présence de calcium dans le milieu extracellulaire est requise pour la maturation (Gelerstein et coll., 1988 ; Han et coll., 1995) alors que pour d'autres non (Duesbery et Masui, 1996). La libération de calcium à partir des stocks intracellulaires pourrait être impliquée dans la reprise méiotique (Duesbery et Masui, 1996 ; Kobrinski et coll., 1995), la déplétion des stocks intracellulaires avant la stimulation de la maturation accélère la reprise méiotique (Stith et Maller, 1987 ; Kobrinsky et Kirchberger, 2001). Cependant, une étude récente montre que des concentrations calciques intracellulaires élevées retardent la maturation ainsi que l'activation des voies MPF et $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ (Sun et Machaca, 2004).

Nos résultats montrent que l'acidification intracellulaire provoquée par le NH_4Cl retarde la maturation ainsi que l'activation des voies MPF et $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, résultats similaires à ceux observés lors de concentrations calciques intracellulaires élevées (Sun et Machaca, 2004). Dans certains types cellulaires, les voies de signalisation protonique et calcique interfèrent l'une avec l'autre (Austin et Wray, 1995). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse suivante : le NH_4Cl pourrait-il induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui serait responsable du retard de la reprise méiotique ?

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du NH_4Cl 1 et 10 mM sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans l'ovocyte de Xénope immature. Pour cela, nous avons analysé l'activation des canaux chlores dépendant du calcium de l'ovocyte (ICl_{80} , ICl et Iin). Ces canaux chlores dépendant du calcium sont largement utilisés pour étudier les variations du calcium intracellulaire, la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et l'influx de calcium à travers les SOC's (Barish, 1983 ; Miledi et Parker, 1984 ; Lechleiter et Clampham, 1992 ; Callamaras et Parker, 1994 ; Parker et Yao, 1994). Dans un second temps, l'origine du calcium impliquée dans l'augmentation de la concentration calcique provoquée par le NH_4Cl a été déterminée puis nous avons analysé l'effet du NH_4Cl sur les courants ICl_{80} , ICl et Iin au cours de la reprise méiotique. Enfin, nous avons déterminé le rôle du calcium dans le retard de GVBD provoqué par le NH_4Cl .

Tableau 11 : Intensité du I_{-80} induit par le NH_4Cl 10 mM

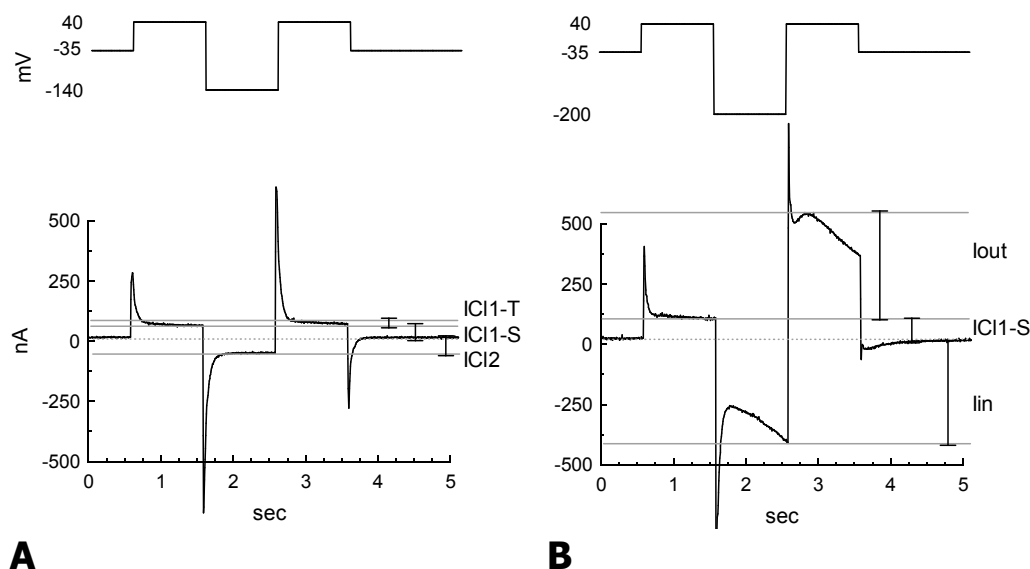
Les moyennes sont effectuées sur des ovocytes (au moins 6) provenant de femelles différentes. Les ovocytes, placés dans du ND pH 7.5, sont clampés à -80 mV avant d'être perfusés avec du NH_4Cl 10 mM.

# femelle	intensité du courant ($\pm$ S.E.M.)	# femelle	intensité du courant ($\pm$ S.E.M.)
1	-160 ± 25	6	-93 ± 11
2	-157 ± 25	7	-90 ± 10
3	-106 ± 6	8	-81 ± 4
4	-104 ± 17	9	-80 ± 11
5	-104 ± 14	moyenne	-108 ± 10

Figure 47 : Mesures de ICl et de I_{in} dans les ovocytes de Xénope

A) Le protocole en trois étapes permet de révéler les trois composantes du courant ICl. Chaque étape permet d'enregistrer respectivement ICl1-S (courant chlore sortant non inactivé), ICl2 (courant chlore entrant lent), et ICl1-T (courant chlore sortant transitoire). ICl1-S est mesuré à la fin de premier pulse à $+40$ mV. ICl1-T correspond à la valeur du courant mesuré la fin du second pulse à $+40$ mV soustraite de la valeur de ICl1-S. ICl2 est mesuré à la fin du pulse à -140 mV.

(B) I_{in} est mesuré par un protocole similaire, I_{in} est mesuré à la fin du second pulse à -200 mV. I_{out} est obtenu de la même manière que ICl1-T et reflète la fermeture lente des canaux ouverts durant l'étape d'hyperpolarisation



II.2- Résultats

L'application de NH_4Cl sur les ovocytes de Xénope immatures clampés à -80 mV provoque un courant entrant réversible dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en NH_4Cl (Publication 3 : Figure 1). L'intensité du courant pour une même concentration de NH_4Cl varie selon les femelles dont sont issus les ovocytes. En présence de NH_4Cl 10 mM, l'intensité du courant entrant peut-être comprise entre -80 nA et -160 nA (Tableau 11). C'est pourquoi toutes les valeurs que nous donnons sont issues de mesures effectuées avec des ovocytes provenant d'une même femelle.

Le courant mesuré dans les ovocytes clampés à -80 mV présente deux composantes : un courant entrant transitoire qui diminue rapidement et un courant entrant indépendant du temps qui persiste aussi longtemps que le NH_4Cl est présent (Publication 3 : Figure 1). Cependant, tous les ovocytes ne présentent pas le courant entrant transitoire (Publication 3: Table 2). Le courant mesuré dans les ovocytes clampés à -80 mV peut présenter des oscillations qui atteignent des proportions très importantes lorsque le NH_4Cl est appliqué durant de longues périodes (Article 2 : Figure 2). Dans tous les cas, ces oscillations cessent dès que le NH_4Cl est rincé.

La réalisation de courbe I/V après application de NH_4Cl , ainsi que l'incubation des ovocytes en présence d'un inhibiteur des courants chlores (DIDS) ou dans un milieu déplété en chlore, suggèrent que le courant entrant (mesuré dans les ovocytes clampés à -80 mV) correspond essentiellement à un courant chlore dépendant du calcium ($\text{ICl}(\text{Ca})$). Cependant, ce courant présente également une autre composante probablement activée par le NH_4Cl (Article 2 : Figure 3), c'est pourquoi nous avons choisi de l'appeler ICl_{-80} .

Nous avons également enregistré le courant chlore dépendant du calcium (ICI). ICI est constitué de trois composantes révélées par un protocole en trois étapes : le courant chlore ICl_{1-5} (soutenu) est activé par la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et les courants chlores ICl_{1-2} et ICl_{1-7} (transitoire) sont activés par un influx du calcium à partir du milieu extracellulaire (Hartzell, 1996 ; Figure 47). Un protocole similaire nous a permis d'enregistrer deux autres courants : le courant entrant (Iin) et le courant sortant (Iout). Iin résulte du mélange d'un courant chlore dépendant du calcium et d'un courant cationique non sélectif (notamment perméable au calcium). Iin est à la fois sensible au pHi et au calcium (Kurama et coll., 2000), ce qui nous permet d'avoir une indication concernant les variations de pHi induites par le NH_4Cl lorsque nous comparons les résultats de ICl_2 et de Iin .

L'amplitude des courants ICI et Iin est augmentée lors de l'addition de NH_4Cl 1 ou 10 mM, suggérant que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par

NH_4Cl implique une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires ainsi qu'un influx de calcium à partir du milieu extracellulaire (Publication 3 : Figure 4, Table 3). Le NH_4Cl provoque une augmentation de ICl1-S de manière dose-indépendante alors que ICl_{-80} , ICl2 , Iin augmentent de manière dose dépendante.

Lorsque les variations de la concentration calcique intracellulaire sont inhibées par la présence de chélateurs calciques (BAPTA-AM ou micro-injecté), les effets de 1 mM de NH_4Cl sur les courants ICl_{-80} , ICl et Iin sont supprimés alors que les effets du NH_4Cl 10 mM ne sont pas totalement inhibés (Publication 3: Table 4). Ainsi, l'activation des courants ICl_{-80} , ICl , et Iin en présence de NH_4Cl 1 mM serait due uniquement à l'augmentation de la concentration calcique alors que l'effet résiduel, observé après chélation du calcium intracellulaire en présence de NH_4Cl 10 mM pourrait résulter d'un facteur indépendant du calcium probablement lié la diminution de pHi.

Nous avons étudié la source de calcium à l'origine de l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire provoquée par le NH_4Cl . L'utilisation d'un milieu 0-calcium diminue l'intensité des courants ICl_{-80} , ICl , et Iin (Publication 3 : Table 5). Cependant, ces conditions expérimentales sont souvent responsables de l'activation du courant chlore inhibé par le calcium (I_{ClCC}), ce qui rend difficile l'interprétation des résultats (Weber et coll., 1995). L'incubation en présence de lanthane, inhibiteur des courants calciques, supprime l'augmentation des courants ICl2 , ICl1-T , Iin (Article 2 : Table 5) alors que l'augmentation de l'intensité du courant ICl1-S , bien que réduite, persiste. La micro-injection d'héparine, inhibiteur de la libération de calcium à partir des récepteurs à l' IP3 , diminue de manière drastique l'augmentation de ICl1-S induite par le NH_4Cl ainsi que l'augmentation de ICl2 et Iin (Article 2 : Table 5). L'incubation en présence de caféine, un autre inhibiteur de la libération de calcium à partir des récepteurs à l' IP3 , à des effets similaires, bien que dans 57% des ovocytes, elle potentialise l'effet du NH_4Cl . Ces résultats confirment qu'une grande partie de l'augmentation de la concentration calcique provoquée par le NH_4Cl serait directement déclenchée par une déplétion des stocks intracellulaires de calcium suivie de l'activation des courants I_{SOCE} .

Parallèlement, nous avons testé l'effet de la diminution et de l'augmentation du pHe sur les courants ICl_{-80} , ICl et Iin . La diminution de pHe de 7.5 à 5.5 et l'augmentation du pHe de 7.5 à 9 déclenchent un large courant entrant ICl_{-80} ainsi qu'une augmentation des courants ICl et Iin (Publication 3 : Figure 5, Table 6). Par conséquent, la diminution et l'augmentation du pHi provoquent une augmentation de la concentration calcique intracellulaire suggérant que pHe, pHi et concentration de calcium intracellulaire sont fortement liés.

Nous avons étudié l'effet de l'application de NH_4Cl à long terme. La GVBD a généralement lieu dix heures après stimulation de la maturation par la progestérone. C'est pourquoi nous avons analysé l'évolution des courants ICl_{-80} , ICl et Iin lors d'incubation en présence de NH_4Cl durant des temps inférieurs ou supérieurs à 10 heures. Les effets du NH_4Cl 1 mM durant les premières d'incubation sont identiques à ceux observés durant les premières heures d'incubation : les intensités des courants ICl_{-80} , ICl et Iin sont augmentées. Par contre, l'effet du NH_4Cl 10 mM évolue au cours du temps : initialement, le NH_4Cl provoque une augmentation importante de l'intensité des courants ICl_{-80} , ICl et Iin , ensuite, l'intensité de ces courants diminue, les valeurs sont même inférieures à celle des courants des ovocytes contrôles mesurés dans du ND (Publication 3 : Table 7). Il semble donc que les modifications ioniques induites par le NH_4Cl 10 mM provoquent un changement de l'état physiologique de la cellule qui se traduirait soit par une baisse de concentration de calcium intracellulaire, soit par une modification de la régulation des canaux chlores.

L'application de NH_4Cl 10 mM sur les ovocytes matures affecte très peu le courant ICl_{-80} alors que l'application d'un ionophore calcique (A23187) déclenche un large courant entrant présentant des oscillations. Ainsi, les ovocytes matures possèdent toujours le courant ICl_{-80} , mais le NH_4Cl n'est plus capable de l'activer (Publication 3: Figure 6). Corrélativement, les mesures de ICl1-S , ICl2 et de Iin dans les ovocytes matures montrent que l'intensité de ces courants diminue après l'application de NH_4Cl 1 ou 10 mM (Publication 3 : Figure 7, Tables 3 et 8).

Nos résultats montrent que le NH_4Cl induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les ovocytes immatures et dans les ovocytes traités par la progestérone avant qu'ils ne subissent la GVBD. Afin de déterminer si l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoquée par le NH_4Cl est impliquée dans le retard de la GVBD, nous avons incubé les ovocytes dans un milieu dépourvu de calcium ou en présence BAPTA-AM avant de les stimuler par la progestérone. La GVBD est accélérée de manière significative lorsque les ovocytes sont incubés en absence de calcium dans le milieu extracellulaire alors que l'incubation en présence de BAPTA-AM n'affecte pas de manière significative la GVBD (Article 3 : Tableau 9). Le retard de GVBD provoqué par le NH_4Cl 1 mM est plus faible lorsque les ovocytes sont incubés en présence de ND 0-calcium ou de BAPTA-AM. Ces derniers, en présence de NH_4Cl 10 mM, inhibent totalement la GVBD (Article 3 : Table 10).

Ainsi, l'acidification intracellulaire entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, qui participe au retard de GVBD induit par le NH_4Cl . Cependant, le calcium n'est pas le seul impliqué dans le retard de GVBD. En effet, la présence de BAPTA ou l'incubation dans un milieu déplété en calcium ne supprime pas le retard de GVBD provoqué par le NH_4Cl 1 mM. Les perturbations ioniques provoquées par une forte concentration de NH_4Cl (10 mM) associées à celles induites par le BAPTA-AM ou l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire pourraient être trop importantes pour que l'ovocyte puisse mettre en œuvre les mécanismes moléculaires permettant la reprise méiotique.

PUBLICATION 3

EN PREPARATION

pH-dependent calcium increase in immature *Xenopus* oocytes and during maturation

Chantal Sellier¹, Anne Frédérique Antoine^{1*}, Edith Browaeys-Poly¹, Jean-François Bodart¹ and Jean-Pierre Vilain¹

¹ EA 4020, Université de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

* Corresponding author, Anne-Frédérique Antoine EA 4020, Université de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France tel (33) 3 20 33 61 16, fax (33) 3 20 43 40 38, E-mail: anne-frederique.antoine@univ-lille1.fr

CS and AFA contributed equally to this work

Keywords: *Xenopus*; oocyte; egg; chloride current; calcium release; store-operated calcium entry; intracellular pH

Figures: 7

Tables: 10

Introduction

These last few years have seen the blossoming of numerous studies highlighting the role of calcium in cell proliferation. An increase of the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) induced by numerous extracellular signals, such as hormones, growth factors and cytokins, is a key step in the regulation of the initiation of cell proliferation in normal or pathological context [1-3]. Calcium homeostasis is due to numerous processes involving calcium buffers and calcium transport system. $[Ca^{2+}]_i$ is maintained constant through a balance between calcium influx from the extracellular medium, calcium release from the intracellular calcium store (mainly the endoplasmic reticulum and the mitochondria) and calcium pumping, either into the extracellular medium or the intracellular stores [4, 5].

In *Xenopus* oocytes, the role of a $[Ca^{2+}]_i$ elevation in meiosis reinitiation (maturation) is still under debate since numerous studies were carried but led to conflicting results. For some authors, extracellular calcium is necessary for maturation [6, 7], while it is not for some others [8]. Calcium release from the intracellular stores could be involved during maturation [8, 9] and experimental calcium store depletion has been shown to accelerate maturation [10, 11]. Accordingly, high $[Ca^{2+}]_i$ delays maturation [12]. These conflicting results may come from the dual role played by calcium during maturation: while being unnecessary for meiosis initiation (and subsequent germinal vesicle breakdown and chromosome condensation), it would be necessary for the completion of meiosis I (meiotic spindle formation and positioning and first polar globule extrusion, [12]).

Similar disruption of *Xenopus* oocyte maturation has been observed while inhibiting the transient increase of the intracellular pH (pH_i), which normally takes place during progesterone-induced maturation (pH_i increase by 0.2-0.4 units, [13, 14]). Artificial pH_i alkalization accelerates maturation [15], while an artificial pH_i acidification delays maturation and disrupts meiotic spindle formation [16, 17]. These similarities between pH_i and $[Ca^{2+}]_i$ effects upon *Xenopus* oocytes maturation suggest that both these events would interact on the same targets or that these two effectors mutually interfere. Indeed, changes of pH_i are known to induce changes in $[Ca^{2+}]_i$ in *Xenopus* motoneurons [18] and numerous other cell types (for instance, in endothelial muscle cells, [19] or in smooth muscle cells, [20]).

We have used NH_4Cl as a mean to acidify *Xenopus* oocytes [21] and microinjection of Tris buffer to alkalize them [16]. Progesterone-induced maturation in presence of NH_4Cl is delayed in a dose-dependent fashion. The chromosomes and the mitotic spindle are correctly formed (even though with a delay), they migrate to the plasma membrane but they correspond to metaphase I spindle instead of metaphase II spindle as in control oocytes (personal observations). The events triggered by progesterone, namely MPF and $p39^{Mos-}$

Xp42^{Mpk1} activations, are highly pHi sensitive (even though the MPF auto-amplification loop was not sensitive to pHi [16]) as well as the kind of proteins newly synthesized from stored non-polyadenylated mRNA [22-24]. NH₄Cl is primarily described as an acidifying agent in *Xenopus* oocyte. However, NH₄Cl has similar effects as a [Ca²⁺]_i elevation : delay in the early events of maturation (namely MPF and p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1}) and arrest of the later events (namely protein synthesis and progress in metaphase II). Thus, we wanted to ascertain whether NH₄Cl effects upon maturation were due only to acidification of pHi or whether NH₄Cl effects could also result from induced changes in [Ca²⁺]_i.

We have first analyzed the effects of NH₄Cl upon [Ca²⁺]_i in immature *Xenopus* oocytes using the calcium-dependent activation of endogenous chloride current (I₋₈₀, ICl and Iin). Inward currents measured at -60 to -80 mV are a reliable and often used indicators of [Ca²⁺]_i changes (namely ICl(Ca) [25-27]) and ICl indicates the source of calcium mobilized (calcium release or calcium influx, [28-30]). Iin is both a calcium- and pH-dependent current used as a mean to follow both [Ca²⁺]_i changes and pHi changes when compared with ICl [31]. We have shown that NH₄Cl induces, along with a slow and lingering decrease of pHi, both a rapid and reversible calcium release from the intracellular stores and calcium influx from the extracellular medium. Currents stimulation by NH₄Cl changes during maturation suggesting that the relative NH₄⁺ / NH₃ permeability is reversed at GVBD. Contrasting effects of 1 and 10 mM NH₄Cl upon [Ca²⁺]_i allows us to explain the divergent effects of these two concentrations upon maturation as already observed in [16]. NH₄Cl would slow down maturation through both a pH- and a calcium-dependent pathways, confirming the role of both pHi and [Ca²⁺]_i in the progression of meiotic cell cycle.

Materials and Methods

Xenopus oocytes isolation

Experiments were performed on defolliculated oocytes obtained from adults *Xenopus laevis* anaesthetized with 2 g.l⁻¹ MS 222 (Sandoz). Ovaries were stored in ND96 pH 7.5 (Table 1) and oocytes were isolated by microdissection after 45 minutes incubation in 1 mg.ml⁻¹ collagenase. Oocytes were stored up to 96 hours in ND96 pH 7.5 at 14°C before use.

Electrophysiological measurements

The oocyte was impaled by two glass microelectrodes pulled from thin walled glass capillary tubing (Clark Electromedical) and filled with 3 M KCl (electrode resistance < 5 MΩ). The bath was grounded by an Ag/AgCl electrode through a 3 M KCl/agar bridge. A homemade conventional two-electrode voltage clamp circuit was used. Generation of clamp command voltage, data acquisition and analysis were done using pCLAMP 6 (Axon instruments). All experiments were performed at room temperature in ND pH 7.5 (ND 7.5), unless otherwise specified. ICl and Iin were recorded with a modified protocol from [29]. When ICl or Iin currents were measured over time, to measure the intensity of the peak current as accurately as possible, while reducing current run-down, the triple step protocols was applied at 5 seconds intervals.

Solutions of NH₄Cl were made by replacing an equivalent amount of NaCl by NH₄Cl to have iso-osmotic solution. Low Cl⁻ solution were made by replacing NaCl by Na-isethionate, thus final Cl⁻ concentration was reduced from 103.6 to 7.6 mM (see Table 1).

To inhibit calcium release from the reticulum through InsP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) receptors, oocytes were incubated during 1 hour with 5 mM caffeine or were microinjected with 20 nl of a 5 mg/ml heparin solution 1 hour before NH₄Cl application. To inhibit calcium entry, either, 1 mM LaCl₃ or ND nominal 0-Ca²⁺ medium was used. To inhibit [Ca²⁺]_i variations, the oocytes were either incubated with 50 μM BAPTA-AM for 1 hour or microinjected with 10 nmoles BAPTA (final concentration of ~1 mM) before NH₄Cl application using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). Distilled water was used as control for microinjection experiments. Injected oocytes were allowed to heal for 1 h in ND96 medium.

Values are given as mean ± standard error of the mean (S.E.M.), with n ≥ 4, where n is the number of oocytes. Each experiment was performed with at least 3 batches of oocytes, isolated from different females.

Results

NH₄Cl triggers an inward current in immature *Xenopus* oocytes voltage clamped at -80 mV.

NH₄Cl is a weak base that induces a reversible acidification in immature *Xenopus* oocytes. Applications of NH₄Cl on immature *Xenopus* oocytes voltage clamped at -80 mV showed that NH₄Cl induced a sustained inward current (I_{-80}) in a dose dependent manner (respectively -13 ± 4 , -50 ± 6 and -104 ± 14 nA for 1, 5 and 10 mM NH₄Cl, $n = 6$, see Figure 1). Repeated applications of the same NH₄Cl concentration sometimes failed to raise the same response (the current intensity was smaller), thus, experiments were preferentially performed on different oocytes except when explicitly stated. Furthermore, oocytes isolated from a single female (belonging to the same batch) had similar current intensities, while from one female to another, the current intensities were quite different (I_{-80} currents raised by 10 mM NH₄Cl ranged from -80 ± 11 to -160 ± 25 nA with a mean current intensity of -108 ± 14 nA, females = 9). Thus, mean current intensities are given for values measured on oocytes coming from the same batch.

Current intensities raised by 10 mM NH₄Cl are given for the steady-state current. I_{-80} has in fact two components: a transient inward current and a slow inward current. The slow inward current is sustained as long as NH₄Cl is present and is reversed in seconds following NH₄Cl washout (Figure 1), while NH₄Cl effect upon pH_i last for ~20 minutes [13, 14]. Notice, as in Figure 1B and 2, that for repeated applications of NH₄Cl, a slight inward current persisted.

The transient current was present in 16 out of 36 oocytes belonging to 6 different females. We could distinguish three types of batches: those where the transient current was never observed, those where the transient current was sometimes present and those where all oocytes presented the transient current. In the batches where the sustained current is low, the transient current is rare, inversely, in the batches where the sustained current is high, the transient current is frequent.

Currents induced by NH₄Cl are even more complicated by the superposition of oscillations. Even though this case is not frequent (it was present in 12 out of 58 oocytes belonging to 8 different females), it can take huge proportions when NH₄Cl is applied for a long period (see Figure 2). As for the transient current, oscillations were observed for oocytes whose sustained current was higher than average (for batches of oscillating oocytes, the mean sustained current was -124 ± 8 nA, $n = 7$, when for batches of non-oscillating oocytes, the sustained current was -76 ± 9 nA, $n=7$). Consequently, it appears that there is a positive correlation between high sustained current, transient current and oscillations. Transient current and oscillations are a hallmark of calcium signals, thus the three components of I_{-80}

could be triggered when a certain calcium threshold is attained, this threshold being variable from one batch of oocytes to the other. Data are summarized in Table 2.

At least one component of I_{-80} could result from the activation of a calcium-dependent chloride currents ($ICl(Ca)$), which is a clear indicator of $[Ca^{2+}]_i$ variations [32, 33]. We checked whether I_{-80} induced by NH_4Cl resulted from $ICl(Ca)$ activation. Voltage-ramp experiments (I/V curves) showed, in presence of NH_4Cl , a null current potential of 6 ± 0 mV ($n=6$). This potential is higher than the inversion potential of chloride ions but use of DIDS and chloride-depleted ND (ND low Cl^-) confirmed that $ICl(Ca)$ contributes to the NH_4Cl -dependent I_{-80} current. Steady-state inward current induced by 10 mM NH_4Cl was -81 ± 4 nA, when chloride is replaced by sodium isethionate, this chloride-depleted conditions increased the steady-state inward current to -101 ± 9 nA and when 1 mM DIDS is added, the steady-state inward current was reduced it to -38 ± 3 nA. ($n=6$, see Figure 3). The null current potential and the partial effect of DIDS suggests that another unknown component is also probably activated by NH_4Cl .

Application of extracellular NH_4Cl induces a calcium increase as reported by ICl and I_{in} upregulation in *Xenopus* oocytes

Our results suggest that perfusion of *Xenopus* oocytes with 1 to 10 mM NH_4Cl appeared to induce variations of $[Ca^{2+}]_i$ as indicated by the activation of $ICl(Ca)$. To insure that, we monitored the calcium-activated chloride currents (ICl). ICl is composed of three different components revealed with a triple step protocol [28, 29]. Oocytes were held at -35 mV and stepped to +40 mV for 1s, to -140 mV for 1s, then back to +40 mV before return to the holding potential. Each step allows respectively the recording of a non-inactivating outward current ($ICl1-S$), a slow inward current ($ICl2$) and a transient outward current ($ICl1-T$). All three components of ICl are carried by chloride. Outward $ICl1-S$ was measured at the end of the first pulse at +40 mV. $ICl1-T$ was calculated by measuring the transient current during the second pulse at +40mV and subtracting $ICl1-S$. $ICl2$ was measured at the end of the -140 mV pulse. ICl variations are recognized as reliable indicators of calcium fluxes in *Xenopus* oocytes: $ICl1-S$ is activated by calcium release from internal stores, while $ICl2$ and $ICl1-T$ are activated by capacitative calcium influx.

Since NH_4Cl appears to induce both pH_i decrease and $[Ca^{2+}]_i$ increase, we also monitored the inward hyperpolarization-activated current (I_{in} , which is both calcium- and pH-dependent, [31]. I_{in} was measured with a similar protocol that ICl , except that the second step was made at -200 mV. Thus, $ICl1-S$ was again measured at the end of the first pulse at +40 mV. I_{in} was measured at the end of the -200 mV pulse and I_{out} was calculated by measuring the transient current during the third pulse at +40mV and subtracting $ICl1-S$

(Figure 4A). I_{in} is a mixture of a calcium-dependent chloride current and a cationic non-selective current that is permeable to calcium. Taken together, changes of ICl and I_{in} are indicators of changes in $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i .

During application of 10 mM NH_4Cl , ICl_{1-S} increased strongly and instantaneously before decreasing back to a value higher but close to the initial level. Then ICl_{1-S} increased again, but in a slow and durable fashion before stabilization at a higher value than initially. Correlatively, ICl_2 increased slightly in a transient fashion when NH_4Cl is applied, then increased in a slow and durable fashion, along with ICl_{1-S} (Figure 4). These results suggest that 10 mM NH_4Cl induces an instantaneous calcium release (associated with I_{SOCE} activation) followed by a slow calcium release (also associated with I_{SOCE} activation). Recording of I_{in} during 10 mM NH_4Cl treatment showed similar trends. Both during ICl and I_{in} recordings, oscillations were superposed to ICl and I_{in} variations (Figure 4). These currents variations were qualitatively consistent from one oocyte to the other, but the kinetic was variable (ranging from 20 minutes to more than 2 hours before stabilization to the final elevated value).

Thus, 10 mM NH_4Cl induced an increase of all three components of ICl and of I_{in} , signatures of a $[Ca^{2+}]_i$ increase through both calcium release and calcium influx. In all our experiments, values of ICl_{1-T} and I_{out} are quite variable from one oocyte to the other and, if they more often increased in presence of NH_4Cl , in some batches they decreased. In naïve oocytes, both ICl and I_{in} are quite variable from one batch of oocytes to another, while, current intensities were comparable between oocytes belonging to the same batch (for instance, ICl_{1-S} ranged from 25 ± 1 to 212 ± 1 nA, with a mean intensity of 102 ± 25 nA, ICl_2 ranged from -14 ± 1 to -156 ± 1 nA, with a mean intensity of -72 ± 19 nA and I_{in} ranged from -233 ± 1 to -991 ± 1 , with a mean intensity of -586 ± 109 nA). Furthermore, the intensity of the increase in response to NH_4Cl was quite variable from one batch of oocytes to another. Thus, values are given for oocytes belonging to a single batch. Values are normalized for useful comparison: values are given in %, corresponding to the increase of the current intensities compared to the initial current intensity measured in ND (Table 3). Finally, ICl and I_{in} values were measured ~20 minutes after NH_4Cl application, during the current plateau, between the transient increase and the second slow increase. This timing allowed us to have stable ICl and I_{in} over 5-10 minutes. At this moment, NH_4Cl has affected the cell (the first $[Ca^{2+}]_i$ increase has taken place) but the subsequent long lasting $[Ca^{2+}]_i$ elevation may not have modified the cell physiology yet. This timing also corresponds to the timing when the pH_i decrease has stabilized to a more acidic pH (in ~20 minutes according to [13, 14]).

As for I_{-80} , we have analyzed the effects of increased concentration of NH_4Cl (Table 3). ICl1-S increases are equivalent for 1 and 10 mM NH_4Cl . On the opposite, I_{-80} and ICl2 increases are stronger in 10 mM NH_4Cl than in 1 mM NH_4Cl . Correlatively, ICl1-T and I_{out} (reflecting the slow closure of the channels activated during the second hyperpolarization voltage step) are higher in 10 mM NH_4Cl than in 1 mM NH_4Cl . Notice, that there is no obvious correlation between the intensity of the steady-state component of I_{-80} with either one of the three ICl components or with I_{in} (Table 3). Thus, NH_4Cl induces calcium release in a dose-independent fashion, while it induces a calcium influx in a dose-dependent fashion. The strong I_{in} upregulation in 10 mM NH_4Cl suggests that, in these conditions, both $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ and pH_{i} are strongly affected when compared to the response to 1 mM NH_4Cl .

I_{-80} , ICl and I_{in} are activated by a NH_4Cl -dependent $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ elevation

I_{-80} (at least its $\text{ICl}(\text{Ca})$ contribution), ICl and I_{in} are notoriously activated by a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ elevation. To verify that, NH_4Cl upregulated all three conductances through a calcium-dependent mechanism, we analyzed the effects of NH_4Cl on oocytes where $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ was buffered by either incubation in presence of 50 μM BAPTA-AM or microinjection of 1 mM BAPTA solution. Both conditions reduced the upregulation of I_{-80} , ICl and I_{in} by NH_4Cl but would not abolish 10 mM NH_4Cl effects (Table 4), while BAPTA-AM cancelled current upregulation induced by 1 mM NH_4Cl . Even though the effects of 10 mM NH_4Cl were only reduced, these results show that NH_4Cl induced I_{-80} , ICl and I_{in} upregulation through a calcium-dependent mechanism. With 10 mM NH_4Cl , another factor would induce current upregulation, the most probable culprit being a decrease of pH_{i} since NH_4Cl is known for its effects upon pH. Thus, 1 mM NH_4Cl currents upregulation would be calcium-dependent while 10 mM NH_4Cl currents upregulation would result from a dual mechanism, one being calcium-dependent.

Sources of calcium mobilized by NH_4Cl

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ elevations results either from calcium entry from the intracellular medium (calcium influx, [34] and / or from calcium release from the reticulum [5]). Thus, we have tested both possible sources of calcium during NH_4Cl -dependent $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ elevations.

Calcium influx from the extracellular medium can be reduced by use of Ca^{2+} -depleted medium. These experiments were quite difficult to perform since a calcium-inhibited chloride current (I_{ClCC} , a current of a still uncharacterized nature, which is quite variable from one oocytes to the other [35]) is often activated by these conditions. However, all batches of oocytes did not express I_{ClCC} . In these batches, nominal 0- Ca^{2+} medium reduced NH_4Cl -induced I_{-80} , ICl and I_{in} upregulation (Table 5). Furthermore, we have also used lanthanum as a tool to block calcium influx. Incubation in presence of 1 mM LaCl_3 effectively blocked

the NH_4Cl -induced upregulations of ICl2 and Iin (ICl1-T and Iout upregulation were also logically blocked, Table 5) while ICl1-S upregulation was not inhibited but reduced. Thus NH_4Cl induced a calcium influx inside the oocyte, that, in turn, upregulates ICl2 and Iin. Calcium release from the reticulum can be blocked by inhibitors of IP3R [36-38] since *Xenopus* oocytes reticulum do not possess ryanodine receptors (RyR [39]). Incubation in presence of 5 mM caffeine had surprising effects: it often increased the effects of NH_4Cl (in 57 % of the cells), while it prevented ICl and Iin upregulation in the other cells (this divergent effect could result from a potentiating effect of caffeine upon IP3R as described by [40, 41]). In those cases, ICl1-S upregulation was nearly abolished along with both ICl2 and Iin NH_4Cl -induced upregulation. Microinjection of heparin ($\sim 50 \mu\text{g/ml}$ intracellular concentration) inhibited the NH_4Cl -induced upregulation of I_{-80} , ICl and Iin (Table 5). Again, ICl2 and Iin upregulation were also inhibited. These results show that NH_4Cl induces calcium release from the reticulum through IP3R channels. The resulting depletion of the calcium store would in turn activate a capacitative calcium influx through I_{SOCE} channels. Activation of the influx pathway could thus be a secondary consequence of NH_4Cl -dependent calcium store depletion.

Interdependence of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation and pH changes

Results show that NH_4Cl induces both changes in pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. These two events could be independent events or one could result from the other. We have checked the interdependence of these two events by inducing changes in pH_i with another effector (changes of extracellular pH, pH_e that is mirrored by corresponding changes in pH_e since H^+ permeate the oocyte through the Na^+/K^+ ATPase [42]). Decrease of pH_e from pH 7.4 to pH 5.5 induced a large increase of I_{-80} , ICl and Iin with superposed oscillations. Increase of pH_e from pH 7.5 to 9 leads to correlative pH_i increase. pH_e also induces an increase of I_{-80} , ICl, Iin (Figure 5 and Table 6). However, either pH_e increase or pH_e decrease (and mirrored pH_i increase and decrease) induce a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation suggesting that pH_e , pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are strongly interdependent in *Xenopus* oocytes.

Effects of long term application of NH_4Cl

In our previous paper [16], we have studied the effects of NH_4Cl on *Xenopus* oocytes maturation. To complete these observations, we have analyzed the effects of long-term application of NH_4Cl on the ionic properties of the oocyte. In our hands, GVBD takes place in ~ 10 hours after stimulation by $10 \mu\text{M}$ progesterone. That's why we have followed the evolution of I_{-80} , ICl and Iin during incubation in presence of NH_4Cl for more than 10 hours. Effects of 1 mM NH_4Cl were similar when instantaneously applied or when applied for more than 10 hours. On the contrary, 10 mM NH_4Cl had contrasting effect over time: initially, 10

mM NH_4Cl induced a strong I_{-80} , ICl and I_{in} upregulation which increased up until ~ 10 hours incubation, then these currents are downregulated, finally reaching values inferior to the initial values measured in ND (Tables 7).

Thus, 1 and 10 mM NH_4Cl have opposed effects during long-term application: while 1 mM NH_4Cl has a mild and consistent effect upon oocytes, 10 mM NH_4Cl had a far stronger effect which reversed after ~ 10 hours incubation (corresponding to the time necessary for GVBD to occur). The stronger effects of 10 mM NH_4Cl could lead to a possible modification of the physiological state of the cell leading either to a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decrease or to a non-specific currents downregulated while 1 mM NH_4Cl would sustain a moderate and continuous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase.

Evolution of the response to NH_4Cl during maturation

Maturation transforms the oocytes into an egg, which is blocked in metaphase II. During maturation, the oocyte undergoes profound modification of its electrophysiological properties including repression and / or endocytosis of numerous channels and transporters [43-45]. Thus, the still poorly characterized NH_4Cl permeability could be modified as a consequence of maturation.

When 10 mM NH_4Cl is applied on mature oocytes (eggs), no comparable inward current was measured when the cell is clamped at -80 mV when compared to immature oocytes. In three out of six experiments, application of NH_4Cl reduced the initial current measured in ND, while in three other experiments, the initial current was only slightly increased (respectively, mean current change after 10 mM NH_4Cl application is -5 ± 4 nA, $n = 6$, with values ranging from -16 ± 1 to 4 ± 4 nA). The application of 5 μM A23187 (a calcium ionophore) still triggered a large inward current with oscillations (Figure 6). Thus egg still possesses $\text{ICl}(\text{Ca})$ but NH_4Cl is no more capable of activating it.

Correlatively, measures of ICl and I_{in} on egg showed that ICl1-S , ICl2 and I_{in} were all decreased in presence of either 1 or 10 mM NH_4Cl (see Table 3 and Figure 7). Notice that ICl and I_{in} currents are quite reduced in mature oocytes, showing that maturation, *per se*, also affects these conductances.

These results suggest that the membrane permeability to NH_4Cl is modified during maturation. In our set of experiment, germinal vesicle break down (GVBD) took place at around 10 hours incubation in presence of 10 μM progesterone. We analyzed the effects of NH_4Cl on both ICl and I_{in} before and after GVBD: currents were recorded at ~ 8 hours incubation and at ~ 12 hours incubation. NH_4Cl induced an increase of ICl1-S and I_{in} before GVBD but decrease of these same currents after GVBD (Table 8). Strikingly, ICl2 behaves differently : after GVBD, NH_4Cl slightly increase ICl2 . Inversion of the effects of NH_4Cl around

GVBD was observed for both 1 and 10 mM NH_4Cl , thus, even though 10 mM NH_4Cl alone induced current downregulation, 1 mM NH_4Cl with 10 μM progesterone effects could only be explained by a maturation-dependent downregulation. Consequently, modifications of the membrane permeability to NH_4Cl would take place around GVBD.

Role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in maturation

Our results shown that NH_4Cl induce a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. Since [12] have shown that high $[\text{Ca}^{2+}]_i$ delays maturation, MPF activation and MAPK pathways activation, we wanted to check whether NH_4Cl also delays maturation through a calcium-dependent mechanism (we have already shown that NH_4Cl delays maturation through a pHi -dependent mechanism, [16].

First, we analyzed the effect of inhibiting calcium influx and of buffering $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase during progesterone-induced maturation. In our hands, progesterone-induced maturation is affected by disruption of calcium homeostasis. Maturation was significantly accelerated when cells were incubated in nominal 0-Ca^{2+} medium. On the contrary, progesterone-induced maturation was not significantly affected when cells were incubated in presence of 50 μM BAPTA-AM (Table 9).

Then, we analyzed the effects of inhibiting calcium influx and of buffering $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase during progesterone-induced maturation in presence of NH_4Cl . Maturation was always delayed by 1 and 10 mM NH_4Cl . In presence of 1 mM NH_4Cl , this delay was decreased (but not abolished) by conditions that either inhibited calcium influx or $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations. However, in presence of 10 mM NH_4Cl , maturation was surprisingly abolished (Table 10). Even though, these results suggest that NH_4Cl -induced maturation delay is both pHi - and calcium-dependent and that NH_4Cl -induced pHi acidification and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase would have a synergistic effect resulting in maturation slowdown.

Discussion

NH_4Cl activates calcium-dependent chloride currents : $\text{ICl}(\text{Ca})$, ICl and Iin

In most cells, weak bases are used to induce intracellular alkalization. These weak bases increase pHi after membrane permeation and subsequent cytosolic protonation of their deprotonated form. Such is the case in Sea urchin oocytes [46-48]. Contrarily, in *Xenopus* oocytes, trimethylamine [49] or procaine [50] induce a decrease in pHi and membrane depolarization. More generally, primary, secondary and tertiary amines lead to pKa -proportional acidification in *Xenopus* oocytes [49]. NH_4Cl induces a slow pHi acidification associated with a large depolarization and membrane resistance decrease. These events have different kinetics : the NH_4Cl -induced acidification is slow and reverses in ~ 20 minutes

while the electrophysiological changes are instantaneously reversed after NH_4Cl washout. [49-54].

Xenopus oocytes NH_4Cl -induced pHi acidification results from a greater membrane permeability to NH_4^+ rather than to NH_3 . The permeation pathway of NH_4^+ has been extensively studied, even though it remains quite elusive. The reverse potential of the current induced by NH_4Cl is -3.1 mV (control is -35,5 mV), thus NH_4Cl may induce a current of any ion with a more positive Nernst potential, such as Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} or NH_4^+ itself [52]. It was postulated that a least part of this current is carried by NH_4^+ , since the NH_4Cl -induced current increases linearly with the decrease of pHi [51, 54]. Studies have tested the effects of different inhibitors of both potassium and chloride channels such as barium, derivatives of DPC (diphenylamine-2-carboxylate), flufenamates, gadolinium, ISDN, tetramethylammonium, quinidine or quinine [21, 49, 51, 52, 54, 55]. Except for DPC and flufenamate, none of these inhibitors proved potent against NH_4Cl -induced inward current, membrane depolarization or pHi decrease. Thus, it was supposed that NH_4^+ enters the oocyte through cationic non-selective channels (G_{cat}). Since the inward current is reduced in absence of extracellular Na^+ , G_{cat} could carry both Na^+ and NH_4^+ currents [52] even though a small amount of NH_4^+ could permeate through potassium channels [56]. Microinjection of alkalizing KOH solution and competitive effect of propionic acid induced similar currents as observed in presence of NH_4Cl , suggesting that G_{cat} is triggered by a local intracellular alkalization. In this model, NH_3 , as an uncharged molecule would initially diffuse inside the oocyte, leading to a local alkalization that, in turn, opens G_{cat} (thus the inward current): the resulting NH_4^+ influx leading to the major acidification observed [53]. G_{cat} may not be the sole inward pathway for NH_4^+ : DCDPC (3'-5'-dichloro-diphenylamine-2-carboxylate) and DPC (diphenylamine-2-carboxylate), two inhibitors of chloride channels, reduced the NH_4Cl -induced inward current suggesting that NH_4^+ could also permeate through chloride channels. However, this result should be handled with care since DCPC and DPC have been shown to also inhibit G_{cat} [57, 58]. Lack of effect of ouabain has ruled out the involvement of the Na^+/K^+ ATPase which is notoriously known for its permeability to numerous ions [54]. The $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ co-transporters has also been incriminated, with NH_4^+ substituting for K^+ [52, 54]. Consequently, the NH_4^+ influx would result from numerous pathways: G_{cat} , G_{K} , G_{Cl} and diverse transporters.

The time discrepancy between the slow and persistent effects of NH_4Cl upon pHi and its instantaneous and reversible effects upon the electrophysiological properties of the *Xenopus* oocytes has not been explained. Here we have shown that the electrophysiological changes

could result, not directly from NH_4Cl -induced pH_i decrease, but from NH_4Cl -dependent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase.

Calcium-dependent chloride currents have long been used as reliable indicators of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in *Xenopus* oocytes [32]. $\text{ICl}(\text{Ca})$ is a long-standing indicator of calcium mobilization [25-27]. NH_4Cl induces a dose-dependent increase of I_{-80} . In our hands, the inward current induced by NH_4Cl has a reverse potential of $E_{\text{rev}} = 6 \text{ mV}$, a potential slightly higher than E_{Cl} (ranging between -14 and -28 mV according to different authors, [59]). DIDS, an inhibitor of chloride currents, reduced this current, while low Cl^- conditions increased it. Thus, the major component of the NH_4Cl -induced current measured at -80 mV would be a chloride one, comforting our interpretation that its major contributor corresponds to $\text{ICl}(\text{Ca})$. Contribution of NH_4^+ to this inward current cannot be ruled out since E_{rev} is higher than E_{Cl} and since DIDS had only a partial effect.

The kinetic of the NH_4Cl -induced I_{-80} increase was biphasic : a transient current (present in only a fraction of the oocyte population) and a sustained current (always present). There is a positive correlation between high sustained current, presence of a transient current and of superposed oscillations. It has been proposed that current oscillations are triggered when a certain threshold of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is reached. Taken together, these observations indicate that, *modulo* the inherent variability between oocytes, NH_4Cl induces a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation that, in turn, activates $\text{ICl}(\text{Ca})$, a major contributor of I_{-80} .

In all experiment, both 1 and 10 mM NH_4Cl always triggered I_{-80} but NH_4Cl -induced I_{-80} intensities differed from one oocyte to another. This variability is greater between oocytes coming from different females (thus values are given for one batch of oocytes). This variability has already been mentioned [52, 60] but never explained. Variations in the number of channels and / or the levels of regulatory messengers have been proposed.

NH_4Cl also induce an instantaneous and reversible increase of ICl and I_{in} . Use of the triple step stimulation protocol developed by [5, 28] discriminates the source of calcium. ICl1-S is activated by calcium release from the intracellular store. ICl2 and ICl1-T are activated by calcium influx. Our results show that 1 and 10 mM NH_4Cl induced an increase of ICl1-S and ICl2 , indicating a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation through both calcium release and calcium influx. 1 and 10 mM NH_4Cl also induced an increase of I_{in} . I_{in} is an inward current measured at potential more negative than -150 mV. I_{in} has two components: a chloride current and a cationic non-selective current. I_{in} is triggered by both $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation and pH_i changes [31].

$\text{ICl}(\text{Ca})$, ICl and I_{in} elevations indicate that NH_4Cl induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. This was verified by chelation of intracellular calcium (with both incubation with BAPTA-AM and BAPTA microinjection): these conditions reduced the current upregulation, testifying that NH_4Cl does

indeed activate these currents through $[Ca^{2+}]_i$ increase. For 1 mM NH_4Cl , inhibition was close to complete, thus electrophysiological changes induced by 1 mM NH_4Cl appears to be solely calcium-dependent. On the contrary, for 10 mM NH_4Cl , currents were only reduced, thus electrophysiological changes induced by 10 mM NH_4Cl are dependent upon calcium and another factor (pHi being an obvious candidate).

Other discrepancies between the effects of 1 and 10 mM NH_4Cl were observed: 1 and 10 mM NH_4Cl induced comparable ICl1-S increase, while 10 mM induced a greater increase of ICl2 and Iin than 1 mM. While NH_4Cl would induce calcium release in a dose-independent fashion, calcium influx would be dose-dependent. This comes as a surprise since, if calcium influx is only due to I_{SOCE} activation, similar calcium release (as indicated by ICl1-S) should trigger similar calcium influx (as indicated by ICl2). To reflect this difference of NH_4Cl -induced calcium influx, we propose that either the calcium influx is not only due to I_{SOCE} activation but also results from another calcium influx pathway (a non-capacitative influx such as the pHi-dependent calcium influx pathway described in capacitated sperm [61]) or that SOC channels are pH-dependent (as hinted by [62]).

Furthermore, the divergent effects of 1 and 10 mM NH_4Cl has been revealed by long-term incubation experiments. When oocytes are incubated for more than 12 hours (a time range similar to that used for maturation experiments where progesterone-induced GVBD takes place at ~10 hours), 1 mM NH_4Cl always induced an increase of I_{80} , ICl and Iin, while 10 mM NH_4Cl upregulated these currents for a duration inferior to 10 hours and downregulated them (to levels below the initial one) for a duration superior to 10 hours. This result suggests that 10 mM NH_4Cl not only regulates membrane conductances but also induces major physiological changes in the oocytes, of which we cannot exclude the downregulation or the internalization of membrane channels. Difference between the long-term effects of 1 mM NH_4Cl and of 10 mM NH_4Cl could be either calcium-related or pHi-related.

Sources of calcium mobilized by NH_4Cl

In numerous cell types, changes of pHi are associated with changes of $[Ca^{2+}]_i$. Intracellular acidification induces a $[Ca^{2+}]_i$ increase in neutrophils [63] and in cardiac muscle cells [64], while alkalization induces a $[Ca^{2+}]_i$ increase in smooth muscle cells [65], in vascular endothelial cells [66] and in colon HT₂₉ carcinoma cells [67]. During Sea urchin maturation, the pHi increase is associated to $[Ca^{2+}]_i$ increase [68]. Indeed, activation of PLC triggers two independent signaling pathways: one that leads to $[Ca^{2+}]_i$ increase through InsP3 synthesis, and one that leads to pHi increase through DAG synthesis and PKC activation [69].

Changes of pHi can mobilize calcium from all sources. In Rat aortic smooth muscle cells, NH_4Cl -induced pHi increase triggers calcium influx through non-voltage dependent plasma

membrane calcium channels, similar to SOC channels. Contribution of a calcium influx is negligible [70]. In rat inner medullary collecting duct cells, NH_4Cl -induced pH_i decrease facilitates InsP_3 synthesis, leading to increase calcium release [71]. Furthermore, pH_i changes affect the calcium transduction pathway since IP_3R are notoriously known as being pH -sensitive : affinity for InsP_3 would increase with pH_i [72-75].

In *Xenopus* oocytes, we have shown that the NH_4Cl -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is due to both calcium release (inhibited by caffeine and heparin) and calcium influx (inhibited by nominal 0-Ca^{2+} medium and lanthanum). Inhibition of calcium release by heparin also inhibited calcium influx, which is unsurprising if we consider that calcium influx is a consequence of calcium store emptying. This was not the case with caffeine, which is consistent with our previous observation that the calcium influx could be carried by both SOC channels and another unspecified calcium influx pathway (as suggested by the differences observed between 1 and 10 mM NH_4Cl effects).

NH_4Cl -induces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase can either result from changes in pH_i or from a specific effect of NH_4Cl . We have used changes of pH_e to promote mirroring changes in pH_i due to H^+ permeation through the Na^+/H^+ exchanger [42] and the Na^+/K^+ ATPase [42, 76]. Both acidification (to pH 5.5) and alkalization (to pH 9) of the extracellular medium induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, as testified by I_{-80} , ICl and I_{in} increases (even though response to alkalization was observed only for some batches of oocytes). These results are consistent with those of [60], who showed that pH_e acidification activates an inward calcium-dependent chloride current. For alkalization, these results are more surprising since it was shown by [77] that pH_e increase activates an outward potassium current cAMP-dependent but calcium-independent. In our hands, both pH_e increase and decrease triggered a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase through both calcium release and calcium influx (as shown by $\text{ICl}_1\text{-S}$ and ICl_2 increases). Thus, the calcium pathways triggered by pH_e changes could be similar to those activated by NH_4Cl and could be a constitutive signaling mechanism allowing the cell to adjust to variable environmental conditions.

Modification of membrane permeability during maturation

During maturation, the cell undergoes numerous electrophysiological changes that prepare the cell to its change of medium during egg laying (cells pass from the physiological medium to pond water) and that prepare the cell to fertilization while preventing artifactual activation. For instance, maturation changes the calcium-dependent chloride conductances: following progesterone addition, the outward chloride current (measure at -20 to $+20$ mV) increases transiently then decreased before GVBD, at fertilization this current has

disappeared [78]. Here, we have observed that similarly, ICl and Iin are downregulated close to GVBD.

NH₄Cl has opposite effect on immature oocytes and mature oocytes (eggs): on eggs, NH₄Cl induced a decrease of I₋₈₀, ICl and Iin. Correlatively, washout of NH₄Cl induced a decrease of these current back to the initial level in immature oocyte and an increase back to the initial level in eggs. This results could be interpreted as a NH₄Cl -induced decrease of the resting [Ca²⁺]_i level, which could be attributed to cell alkalization. Indeed, in eggs, NH₄Cl induces pHi alkalization [79-81] while it induces a cell acidification in immature oocytes [49, 50]. In this case, during maturation, the oocytes would undergo an inversion of the relative NH₄⁺ / NH₃ permeability: immature oocytes being more permeable to NH₄⁺, eggs to NH₃. In this case, NH₄Cl would induce pHi alkalization in eggs. This interpretation seems to contradict our other result, showing that pHe alkalization induce a [Ca²⁺]_i increase in immature oocytes. This divergent effects could result from the difference between the effects of an indirect change of pHi (through pHe changes) and the effects of a direct pHi change (through NH₄Cl) as was observed for the response of Iin to acidification by incubation in presence of an acidic medium and by HCl microinjection [31]. This divergent effects could also result from the fact that pHe effects were observed on immature oocytes and not on eggs who underwent changes in membrane properties and calcium homeostasis mechanisms. Changes of pHi could affect differentially the same calcium effectors in oocytes and in eggs. Indeed, the open-time duration of IP3R is shorter in eggs where IP3R are more sensitive to InsP3 and are clustered [82]. Furthermore, I_{SOCE} activation is uncoupled from calcium store depletion in eggs [83]. Resulting calcium signal are radically different in eggs than in oocytes : contrary to oocytes, eggs can sustain a calcium wave.

Effects of calcium upon maturation

Influence of calcium upon maturation in *Xenopus* oocytes has been extensively studied but lead to conflicting interpretations. Some authors observed that [Ca²⁺]_i buffering (by EGTA microinjection) or that calcium release inhibition (by microinjection of anti-IP3R antibodies) delays maturation [8, 11]. Some other authors observed that [Ca²⁺]_i increase delays maturation [12]. Our results show that inhibition of calcium influx (by incubation in nominal 0-Ca²⁺ medium) lead to maturation acceleration. Our results are conflicting with those of [6, 7], who used a calcium depleted medium (nominal 0-Ca²⁺ plus EGTA medium), conditions that accelerated maturation. Use of an extracellular calcium-chelating agent may profoundly affect the cell: use of calcium chelators are notoriously known for their side effects. However, our results are in concordance with the results obtained by [12], who used Ca²⁺ depleted oocytes in a low Ca²⁺ medium, namely 50 μM). In our conditions, the absence of

calcium chelator in the extracellular medium does not prevent a microenvironment around the cell where calcium can be as high as a couple of 10 nM, a concentration sufficient to permit a small calcium influx. In this case, the small $[Ca^{2+}]_i$ increase due to calcium influx could promote maturation while a high $[Ca^{2+}]_i$ would delay it, as was shown by [12].

Results using $[Ca^{2+}]_i$ buffering with 1 mM BAPTA-AM gave rise to surprising results : 1 mM BAPTA-AM alone slowed progesterone-induced maturation. We cannot rule out a toxic effect of BAPTA-AM, which "freezes" the cell, but the same results were obtained by [8]. Inhibition of calcium release has been independently shown to inhibit maturation [6, 11]. Thus, a $[Ca^{2+}]_i$ change could be necessary for maturation, but it may not be the absolute value of $[Ca^{2+}]_i$ that would be crucial for maturation but the development of calcium gradients in the cytosol. These gradients would be abolished by BAPTA treatment [8]. However, [12] observed that microinjection of BAPTA (500 μ M or 1 mM) quickens maturation. To resolve these conflicting results, they propose that low $[Ca^{2+}]_i$ promote maturation while high $[Ca^{2+}]_i$ inhibits it.

Taken together, calcium appears to interfere with maturation: since NH_4Cl induces a $[Ca^{2+}]_i$ elevation, we checked whether this $[Ca^{2+}]_i$ increase participates to the maturation delay induced by NH_4Cl . In presence of 10 mM NH_4Cl , 1 mM BAPTA-AM abolished maturation, while in presence of 1 mM NH_4Cl , $[Ca^{2+}]_i$ buffering proved efficient to restore partially a normal kinetic (maturation was still delayed but was quicker than in presence of 1 mM NH_4Cl alone). Conditions with both 1 mM BAPTA-AM and 10 mM NH_4Cl could prove to be toxic for the cell : especially since we have independently observed that long term application of 10 mM NH_4Cl profoundly modifies the oocyte electrophysiological properties, while 1 mM NH_4Cl did not. However, our result, using both nominal 0- Ca^{2+} medium and BAPTA-AM, showed that both these conditions decreased the maturation-delaying effects of 1 mM NH_4Cl . This result shows that while NH_4Cl delays maturation through pH-dependent pathway [16], it also delays it through a calcium-dependent one. The calcium-dependent pathways would only have a regulatory effect since inhibition of $[Ca^{2+}]_i$ changes only reduce the delay without abolishing it, while microinjection of MOPS buffer pH 7.7 restores a normal maturation kinetic [16]. Thus, while the pH-dependent pathway would be predominant, the calcium-one would have a synergistic action.

Here we have shown that changes of pH_i (either through changes of pH_e or use of NH_4Cl) induce $[Ca^{2+}]_i$ elevation in immature *Xenopus* oocytes. During maturation, the response to NH_4Cl change: it is reversed close to GVBD, along with numerous other electrophysiological

changes underwent by the egg (affecting both membrane transporters and calcium homeostasis mechanisms).

Furthermore, we have shown that NH_4Cl -induced maturation delay is both pH- and calcium-dependent, both signal having a synergistic action upon maturation. Our future work will aim at identifying the targets of both these signals. The synergetic action of pHi and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could take effect at the level of the microtubules: both have been shown to interfere with microtubules polymerization in *Xenopus* oocytes. This effect would have numerous other effects since numerous proteins (PKA, EF-1 and 7, amino-ARNt synthetase and cyclin B1) and ARNm are associated to meiotic spindle and contribute to maturation.

References

1. Lipskaia, L. and A.M. Lompre, *Alteration in temporal kinetics of Ca^{2+} signaling and control of growth and proliferation*. Biol Cell, 2004. **96**(1): p. 55-68.
2. Munaron, L., S. Antoniotti, and D. Lovisolo, *Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms?* J Cell Mol Med, 2004. **8**(2): p. 161-8.
3. Santella, L., *The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(2): p. 317-24.
4. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(3): p. 354-70.
5. Parekh, A.B. and R. Penner, *Store depletion and calcium influx*. Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 901-30.
6. Han, J.K. and S.K. Lee, *Reducing PIP_2 hydrolysis, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ receptor availability, or calcium gradients inhibits progesterone-stimulated *Xenopus* oocyte maturation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(3): p. 931-9.
7. Gelerstein, S., et al., *Is a decrease in cyclic AMP a necessary and sufficient signal for maturation of amphibian oocytes?* Dev Biol, 1988. **127**(1): p. 25-32.
8. Duesbery, N.S. and Y. Masui, *The role of microtubules and inositol triphosphate induced Ca^{2+} release in the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in extracts of *Xenopus laevis* oocytes*. Zygote, 1996. **4**(1): p. 21-30.
9. Kobrinsky, E., K. Ondrias, and A.R. Marks, *Expressed ryanodine receptor can substitute for the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Xenopus laevis* oocytes during progesterone-induced maturation*. Dev Biol, 1995. **172**(2): p. 531-40.
10. Stith, B.J. and J.L. Maller, *Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*. Exp Cell Res, 1987. **169**(2): p. 514-23.
11. Kobrinsky, E.M. and M.A. Kirchberger, *Evidence for a role of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in thapsigargin and Bcl-2 induced changes in *Xenopus laevis* oocyte maturation*. Oncogene, 2001. **20**(8): p. 933-41.
12. Sun, L. and K. Machaca, *Ca^{2+} (cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 63-75.
13. Lee, S.C. and R.A. Steinhardt, *pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis**. Dev Biol, 1981. **85**(2): p. 358-69.
14. Cicirelli, M.F., K.R. Robinson, and L.D. Smith, *Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 133-46.
15. Flament, S., et al., **Xenopus* oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(2): p. 471-6.

16. Sellier, C., et al., *Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in Xenopus oocytes*. J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 287-300.
17. Houle, J.G. and W.J. Wasserman, *Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in Xenopus oocytes*. Dev Biol, 1983. **97**(2): p. 302-12.
18. Chen, Y.H., M.L. Wu, and W.M. Fu, *Regulation of acetylcholine release by intracellular acidification of developing motoneurons in Xenopus cell cultures*. J Physiol, 1998. **507 (Pt 1)**: p. 41-53.
19. Karmazyn, M., M. Sawyer, and L. Fliegel, *The Na(+)/H(+) exchanger: a target for cardiac therapeutic intervention*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005. **5**(4): p. 323-35.
20. Austin, C. and S. Wray, *The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle*. J Physiol, 1995. **488 (Pt 2)**: p. 281-91.
21. Sasaki, S., et al., *Regulation mechanisms of intracellular pH of Xenopus laevis oocyte*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1137**(1): p. 45-51.
22. Mendez, R., D. Barnard, and J.D. Richter, *Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction*. Embo J, 2002. **21**(7): p. 1833-44.
23. Schorderet-Slatkine, S., M. Schorderet, and E.E. Baulieu, *Progesterone-induced meiotic reinitiation in vitro in Xenopus laevis oocytes: a role for the displacement of membrane-bound calcium*. Differentiation, 1977. **9**(1-2): p. 67-76.
24. Taylor, M.A., K.R. Robinson, and L.D. Smith, *Intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation: role in translational control in Xenopus oocytes*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **89 Suppl**: p. 35-51.
25. Dascal, N., B. Gillo, and Y. Lass, *Role of calcium mobilization in mediation of acetylcholine-evoked chloride currents in Xenopus laevis oocytes*. J Physiol, 1985. **366**: p. 299-313.
26. Miledi, R. and I. Parker, *Chloride current induced by injection of calcium into Xenopus oocytes*. J Physiol, 1984. **357**: p. 173-83.
27. Barish, M.E., *A transient calcium-dependent chloride current in the immature Xenopus oocyte*. J Physiol, 1983. **342**: p. 309-25.
28. Kuruma, A. and H.C. Hartzell, *Dynamics of calcium regulation of chloride currents in Xenopus oocytes*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. C161-75.
29. Kuruma, A. and H.C. Hartzell, *Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals*. J Gen Physiol, 2000. **115**(1): p. 59-80.
30. Yao, Y. and R.Y. Tsien, *Calcium current activated by depletion of calcium stores in Xenopus oocytes*. J Gen Physiol, 1997. **109**(6): p. 703-15.
31. Kuruma, A., Y. Hirayama, and H.C. Hartzell, *A hyperpolarization- and acid-activated nonselective cation current in Xenopus oocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(5): p. C1401-13.
32. Dascal, N. and S. Cohen, *Further characterization of the slow muscarinic responses in Xenopus oocytes*. Pflugers Arch, 1987. **409**(4-5): p. 512-20.
33. Sigel, E., *Use of Xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins*. J Membr Biol, 1990. **117**(3): p. 201-21.
34. Putney, J.W., Jr., *Inositol phosphates and calcium entry*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1992. **26**: p. 143-60.
35. Weber, W.M., et al., *The Ca(2+)-induced leak current in Xenopus oocytes is indeed mediated through a Cl- channel*. J Membr Biol, 1995. **148**(3): p. 263-75.
36. Yao, Y. and I. Parker, *Ca2+ influx modulation of temporal and spatial patterns of inositol trisphosphate-mediated Ca2+ liberation in Xenopus oocytes*. J Physiol, 1994. **476**(1): p. 17-28.

37. Callamaras, N. and I. Parker, *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Xenopus laevis oocytes: localization and modulation by Ca²⁺*. Cell Calcium, 1994. **15**(1): p. 66-78.
38. Wakui, M., Y.V. Osipchuk, and O.H. Petersen, *Receptor-activated cytoplasmic Ca²⁺ spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca²⁺(+)-induced Ca²⁺ release*. Cell, 1990. **63**(5): p. 1025-32.
39. Parys, J.B., et al., *Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in Xenopus laevis oocytes*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18776-82.
40. Hague, F., et al., *Caffeine exerts a dual effect on capacitative calcium entry in Xenopus oocytes*. Cell Signal, 2000. **12**(1): p. 31-5.
41. Parker, I. and I. Ivorra, *Caffeine inhibits inositol trisphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in Xenopus oocytes*. J Physiol, 1991. **433**: p. 229-40.
42. Burckhardt, B.C., B. Kroll, and E. Fromter, *Proton transport mechanism in the cell membrane of Xenopus laevis oocytes*. Pflugers Arch, 1992. **420**(1): p. 78-82.
43. Masui, Y., et al., *Roles of divalent cations in maturation and activation of vertebrate oocytes*. Differentiation, 1977. **9**(1-2): p. 49-57.
44. Schmalzing, G., et al., *Downregulation of surface sodium pumps by endocytosis during meiotic maturation of Xenopus laevis oocytes*. Am J Physiol, 1990. **258**(1 Pt 1): p. C179-84.
45. Pralong-Zamofing, D., et al., *Regulation of alpha 1-beta 3-NA(+)-K(+)-ATPase isozyme during meiotic maturation of Xenopus laevis oocytes*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 1): p. C1520-30.
46. Shen, S.S. and R.A. Steinhardt, *Direct measurement of intracellular pH during metabolic derepression of the sea urchin egg*. Nature, 1978. **272**(5650): p. 253-4.
47. Lopo, A. and V.D. Vacquier, *The rise and fall of intracellular pH of sea urchin eggs after fertilisation*. Nature, 1977. **269**(5629): p. 590-2.
48. Jonhson, J.E. and T.F. Smith, *Comparison of Chlamydia subgroup A detection from clinical specimens after 40 and 64 hours of incubation in 5-iodo-2-deoxyuridine-treated McCoy's cells*. J Clin Microbiol, 1976. **3**(3): p. 334-8.
49. Burckhardt, B.C. and P. Thelen, *Effect of primary, secondary and tertiary amines on membrane potential and intracellular pH in Xenopus laevis oocytes*. Pflugers Arch, 1995. **429**(3): p. 306-12.
50. Rodeau, J.L., et al., *Effect of procaine on membrane potential and intracellular pH in Xenopus laevis oocytes*. Mol Membr Biol, 1998. **15**(3): p. 145-51.
51. Burckhardt, B.C. and E. Fromter, *Pathways of NH₃/NH₄⁺ permeation across Xenopus laevis oocyte cell membrane*. Pflugers Arch, 1992. **420**(1): p. 83-6.
52. Burckhardt, B.C. and G. Burckhardt, *NH₄⁺ conductance in Xenopus laevis oocytes. I. Basic observations*. Pflugers Arch, 1997. **434**(3): p. 306-12.
53. Boldt, M., G. Burckhardt, and B.C. Burckhardt, *NH₄⁺ conductance in Xenopus laevis oocytes. III. Effect of NH₃*. Pflugers Arch, 2003. **446**(6): p. 652-7.
54. Cougnon, M., et al., *Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in Xenopus laevis oocyte cell membrane*. Pflugers Arch, 1996. **431**(4): p. 658-67.
55. Nakhoul, N.L., et al., *Ammonium interaction with the epithelial sodium channel*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(3): p. F493-502.
56. Busch, A.E., et al., *Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32599-604.
57. Gogelein, H. and B. Pfannmuller, *The nonselective cation channel in the basolateral membrane of rat exocrine pancreas. Inhibition by 3',5-dichlorodiphenylamine-2-carboxylic acid (DCDPC) and activation by stilbene disulfonates*. Pflugers Arch, 1989. **413**(3): p. 287-98.

58. Cook, D.I., P. Poronnik, and J.A. Young, *Characterization of a 25-pS nonselective cation channel in a cultured secretory epithelial cell line*. J Membr Biol, 1990. **114**(1): p. 37-52.
59. Weber, W., *Ion currents of Xenopus laevis oocytes: state of the art*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1421**(2): p. 213-33.
60. Woodward, R.M. and R. Miledi, *Sensitivity of Xenopus oocytes to changes in extracellular pH: possible relevance to proposed expression of atypical mammalian GABAB receptors*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **16**(3-4): p. 204-10.
61. Santi, C.M., et al., *Properties of a novel pH-dependent Ca²⁺ permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function*. J Gen Physiol, 1998. **112**(1): p. 33-53.
62. Parekh, A.B., *Interaction between capacitative Ca²⁺ influx and Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents in Xenopus oocytes*. Pflugers Arch, 1995. **430**(6): p. 954-63.
63. Naccache, P.H., et al., *Propionic acid-induced calcium mobilization in human neutrophils*. J Cell Physiol, 1988. **136**(1): p. 118-24.
64. Kim, D. and T.W. Smith, *Cellular mechanisms underlying calcium-proton interactions in cultured chick ventricular cells*. J Physiol, 1988. **398**: p. 391-410.
65. Siskind, M.S., et al., *Regulation of intracellular calcium by cell pH in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1989. **256**(2 Pt 1): p. C234-40.
66. Wakabayashi, I. and K. Groschner, *Divergent effects of extracellular and intracellular alkalosis on Ca²⁺ entry pathways in vascular endothelial cells*. Biochem J, 1997. **323** (Pt 2): p. 567-73.
67. Arreola, J., J.E. Melvin, and T. Begenisich, *Inhibition of Ca(2+)-dependent Cl⁻ channels from secretory epithelial cells by low internal pH*. J Membr Biol, 1995. **147**(1): p. 95-104.
68. Dube, F. and D. Epel, *The relation between intracellular pH and rate of protein synthesis in sea urchin eggs and the existence of a pH-independent event triggered by ammonia*. Exp Cell Res, 1986. **162**(1): p. 191-204.
69. Pouyssegur, J., et al., *Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts*. FEBS Lett, 1985. **190**(1): p. 115-9.
70. Eto, W., et al., *Intracellular alkalization induces Ca²⁺ influx via non-voltage-operated Ca²⁺ channels in rat aortic smooth muscle cells*. Cell Calcium, 2003. **34**(6): p. 477-84.
71. Slotki, I., J.H. Schwartz, and E.A. Alexander, *Interrelationship between cell pH and cell calcium in rat inner medullary collecting duct cells*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 1): p. C432-8.
72. Nakamaru, Y. and A. Schwartz, *Possible control of intracellular calcium metabolism by [H⁺]: sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 1970. **41**(4): p. 830-6.
73. Joseph, S.K., H.L. Rice, and J.R. Williamson, *The effect of external calcium and pH on inositol trisphosphate-mediated calcium release from cerebellum microsomal fractions*. Biochem J, 1989. **258**(1): p. 261-5.
74. Guillemette, G. and J.A. Segui, *Effects of pH, reducing and alkylating reagents on the binding and Ca²⁺ release activities of inositol 1,4,5-trisphosphate in the bovine adrenal cortex*. Mol Endocrinol, 1988. **2**(12): p. 1249-55.
75. Worley, P.F., et al., *Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. Regulation by pH and calcium*. J Biol Chem, 1987. **262**(25): p. 12132-6.
76. Vasilyev, A., K. Khater, and R.F. Rakowski, *Effect of extracellular pH on presteady-state and steady-state current mediated by the Na⁺/K⁺ pump*. J Membr Biol, 2004. **198**(2): p. 65-76.

77. Yoshida, S., M. Yoshimura, and K. Taniyama, *Activation of a potassium conductance by extracellular alkaline pH in oocytes of Xenopus laevis*. Jpn J Pharmacol, 2001. **87**(3): p. 202-7.
78. Vilain, J.P., M. Moumene, and M. Moreau, *Chloride current modulation during meiosis in Xenopus oocytes*. J Exp Zool, 1989. **250**(1): p. 100-8.
79. Charbonneau, M. and D.J. Webb, *Weak bases partially activate Xenopus eggs and permit changes in membrane conductance whilst inhibiting cortical granule exocytosis*. J Cell Sci, 1987. **87 (Pt 2)**: p. 205-20.
80. Charbonneau, M. and D.J. Webb, *Multiple activation currents can be evoked in Xenopus laevis eggs when cortical granule exocytosis is inhibited by weak bases*. Pflugers Arch, 1986. **407**(4): p. 370-6.
81. Webb, D.J. and M. Charbonneau, *Weak bases inhibit cleavage and embryogenesis in amphibians and echinoderms*. Cell Differ, 1987. **20**(1): p. 33-44.
82. Machaca, K., *Increased sensitivity and clustering of elementary Ca²⁺ release events during oocyte maturation*. Dev Biol, 2004. **275**(1): p. 170-82.
83. Machaca, K. and S. Haun, *Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of Xenopus meiosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38710-5.

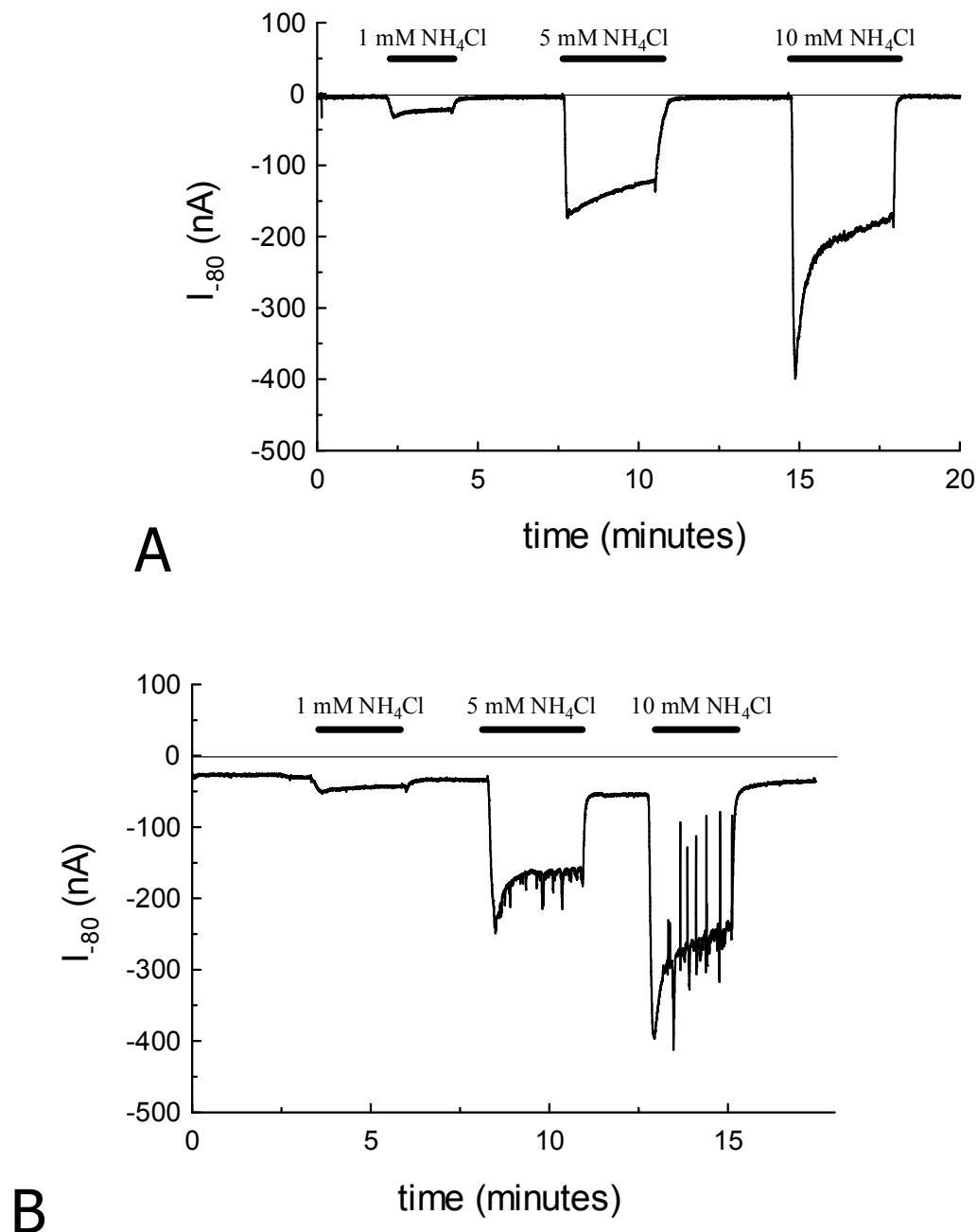


Figure 1 : Inward currents measured on an immature oocyte voltage-clamped at -80 mV when increasing NH_4Cl concentration are applied.

A representative recording is depicted. Successively 1, 5, 10 mM NH_4Cl ND solutions were applied to the cell. Two cells are depicted: **A** an oocyte without oscillations (which was the more frequent case) and **B** an oocyte where oscillations were superposed to the inward current induced by NH_4Cl application.

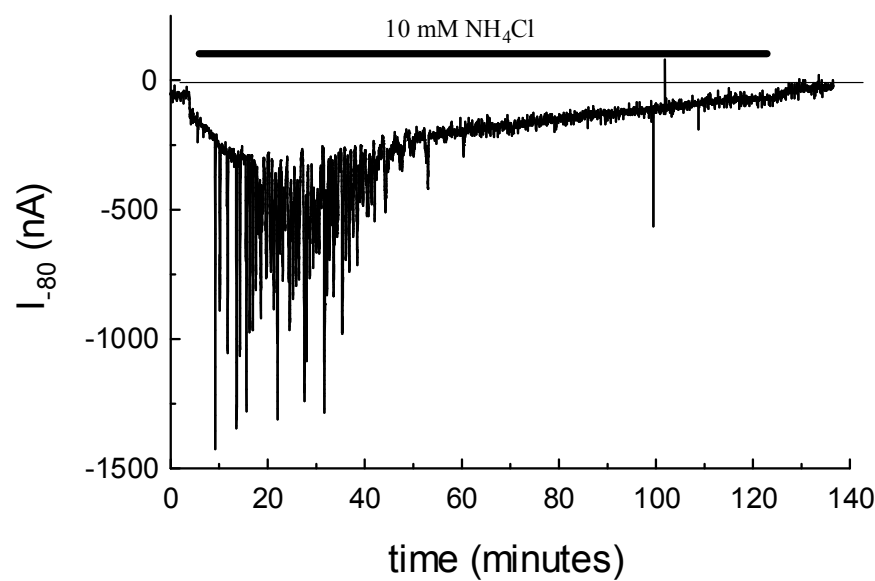


Figure 2 : Inward currents measured on immature oocytes voltage-clamped at -80mV when 10 mM NH₄Cl is applied for ~2 hours.

A representative recording is depicted. After washout of NH₄Cl, the current intensity went back to its initial value. Values are given in nA.

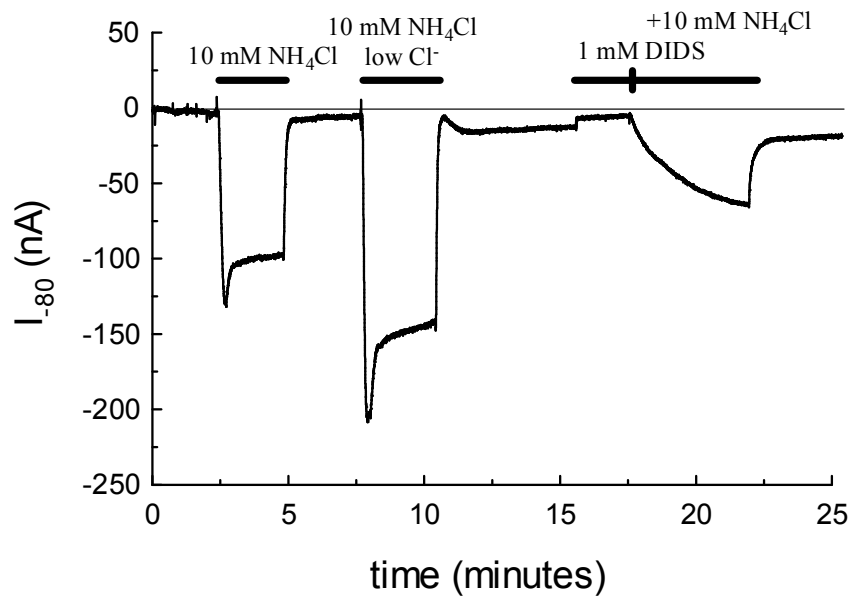


Figure 3 : Inward currents measured on immature oocytes voltage-clamped at -80 mV.

A representative recording is depicted. The oocytes was successively exposed to 10 mM NH_4Cl , then to 10 mM NH_4Cl in a medium depleted in chloride (7.6 mM chloride instead of 103.6 mM in standard ND) then to 1 mM DIDS followed immediately by 1 mM DIDS with 10 mM NH_4Cl .

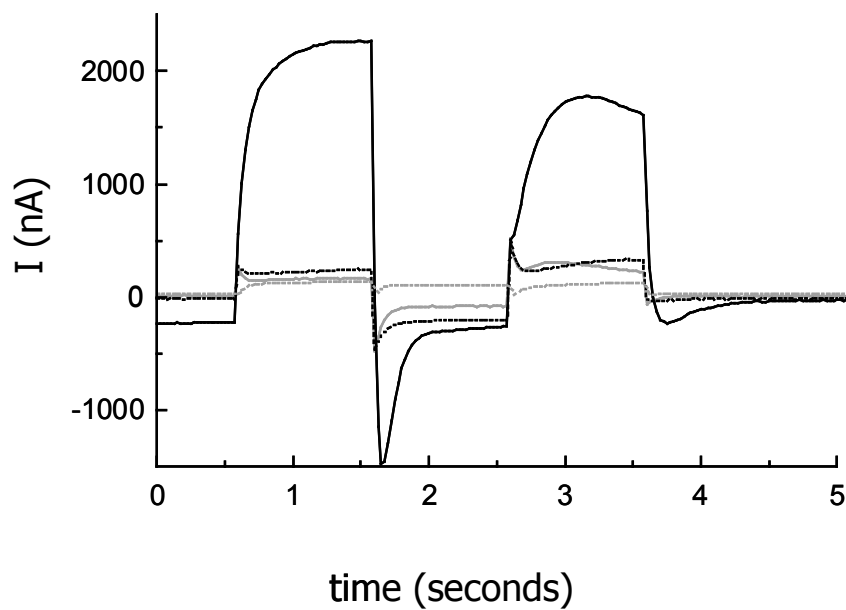
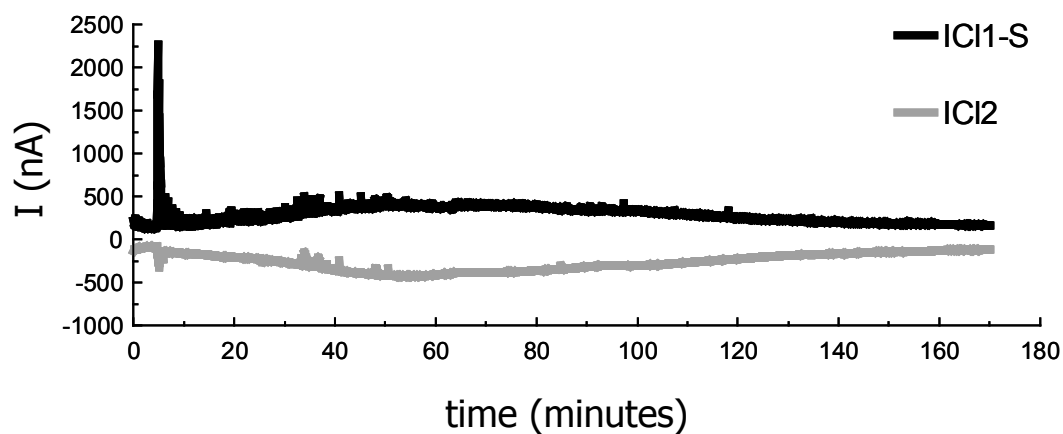
**A****B**

Figure 4 : ICI currents evolution during NH_4Cl treatment.

A Current before (grey line), just after 10 mM NH_4Cl treatment (black line) during the first plateau (dotted black line) and during the second plateau (dotted grey line). **B** Evolution of ICI1-S and ICI2 current intensities over time during a prolonged 10 mM NH_4Cl treatment.

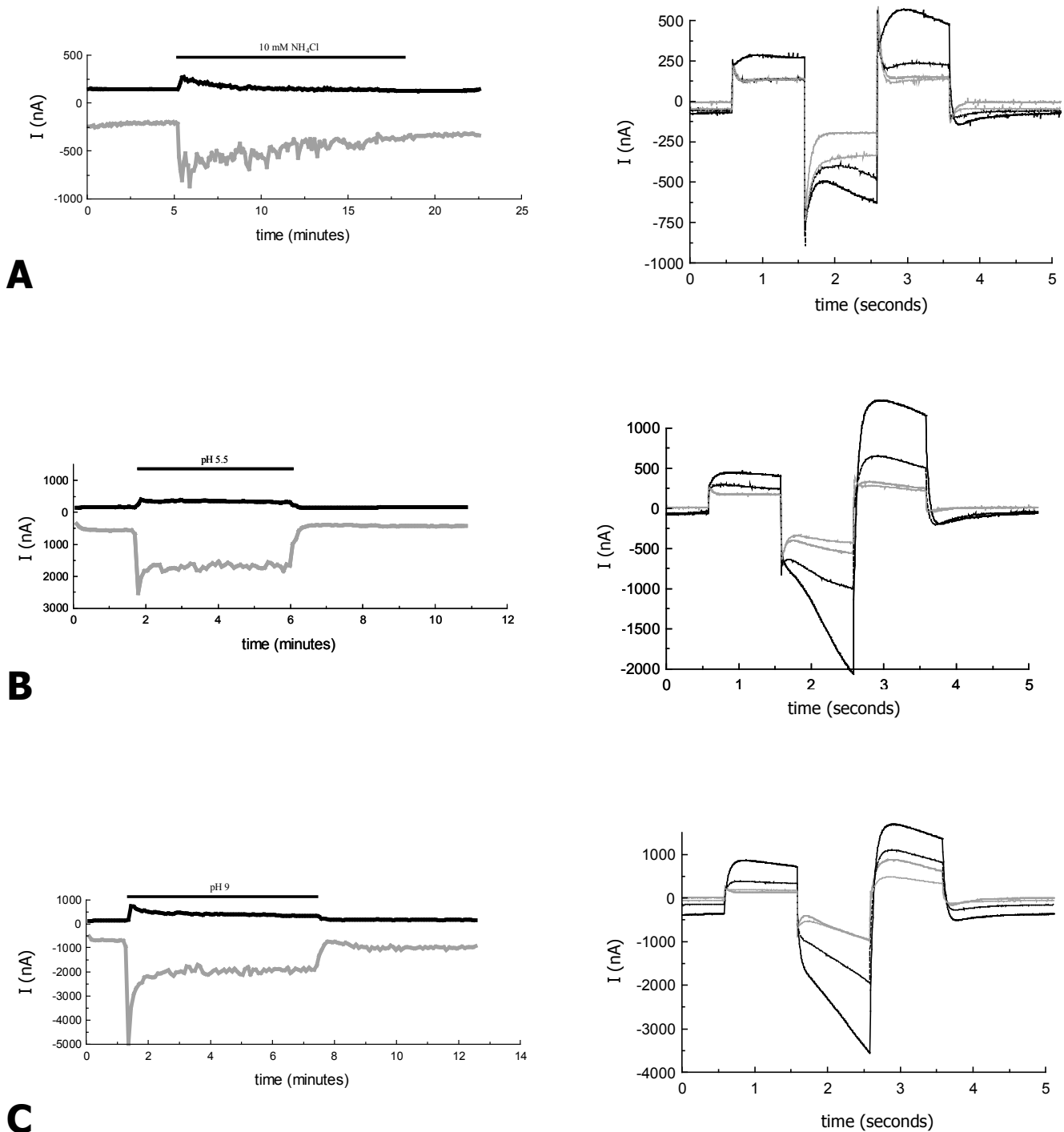


Figure 5 : Respective effects of the application of 10 mM NH_4Cl , change of pH 7.4 to 5.5 and change from pH 7.4 to 9 on oocytes.

Measures are made on oocytes belonging to the same batch. **A** Effects of 10 mM NH_4Cl application. **B** Effects of a change of external pH from 7.4 to 5.5. **C** Effects of a change of external pH from 7.4 to 9 on the left are given the following recordings: (grey line) current in ND, (black line) peak current in presence of NH_4Cl or a different pHe, (dotted black line)

current at the end of the recording in the recording in the new conditions and (dotted grey line) current after washout with ND.

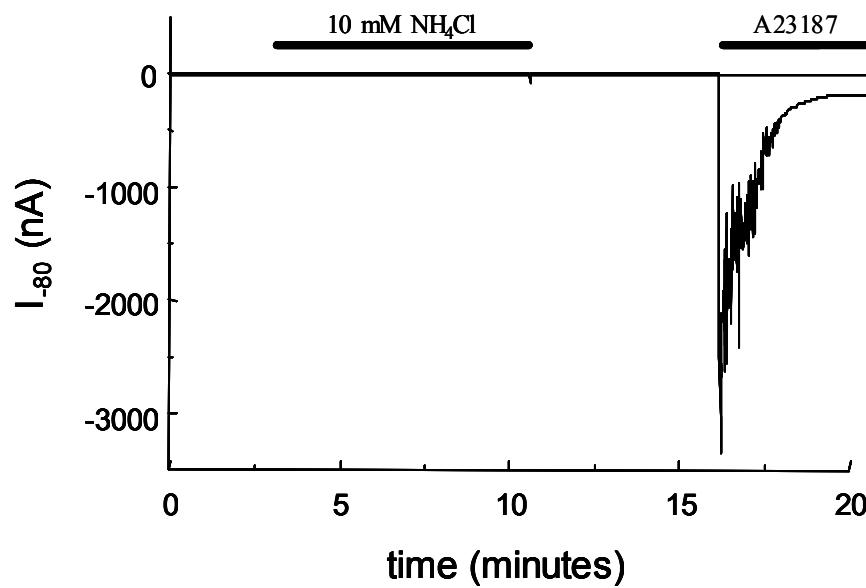


Figure 6 : Effects of the application of 10 mM NH_4Cl on egg.

A representative recording is depicted: NH_4Cl didn't activate $\text{ICl}(\text{Ca})$ but application of 5 μM A23187 could (as shown by the huge inward current superposed with oscillations).

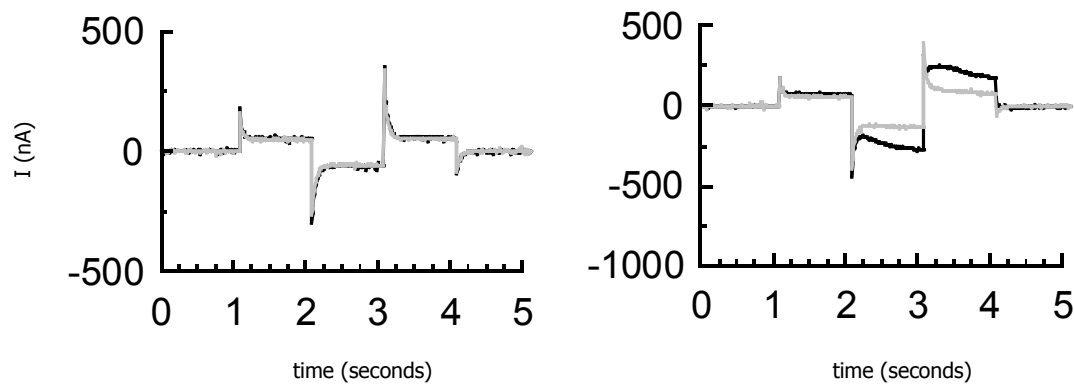


Figure 7 : Effects of the application of 10 mM NH_4Cl on eggs.

Effects of 10 mM NH_4Cl upon I_{Cl} (left) and I_{in} (right). Black line, current before NH_4Cl application, grey line, current after NH_4Cl application. Each trace is the average of at least 6 oocytes belonging to the same batch.

Table 1

	NaCl	Na Isethionate	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	pH	NH ₄ Cl
ND 7.5	96	-	2	1	1.8	7.5	-
ND 7.5 1 NH ₄ Cl	95	-	2	1	1.8	7.5	1
ND 7.5 10 NH ₄ Cl	86	-	2	1	1.8	7.5	10
ND 7.5, low Cl ⁻	-	96	2	1	1.8	7.5	-
ND 7.5, nominal 0-Ca ²⁺	85	-	2	5	-	7.5	-

Solutions used.

Values are given in mM. The solutions were buffered by 5 mM HEPES and the pH was adjusted with NaOH.

Table 2

Female n°	Transient current	I ₋₈₀ current intensity ± S.E.M.		
		Transient current	Sustained current	Difference
1	Absent		-74 ± 19	
2			-76 ± 9	
3	Some oocytes	-112 ± 33	-100 ± 15	41 ± 6
4		-127 ± 4	-108 ± 6	22 ± 7
5		-157 ± 18	-125 ± 14	28 ± 7
6	All oocytes	-162 ± 4	-124 ± 8	38 ± 10

Mean steady-state currents intensities and mean peak currents intensities induced by 10 mM NH₄Cl.

The sustained current is measured when the intensity of the current is stabilized, the transient current is measured at the peak of its intensity. The oocytes were voltage clamped at -80mV. Values are given in nA ± S.E.M. Batches of oocytes are classified according to the occurrence of the transient current.

Table 3

Cells	NH ₄ Cl	ICl1-S	ICl1-T	ICl2	I _{in}	I _{out}	I ₋₈₀
Oocyte	1 mM	231	83	149	139	143	-10 ± 1
	10 mM	242	268	947	223	175	-50 ± 12
Egg	1 mM	74	340	73	45	140	10 ± 1
	10 mM	66	150	67	33	30	40 ± 20

Currents induced by 1 and 10 mM NH₄Cl on oocytes and on eggs.

ICl and I_{in} are given in %, they were normalized against the currents measured in ND. The values given for the steady-state component of I₋₈₀ correspond to the difference between the current intensity in presence of NH₄Cl and the current in ND (nA ± S.E.M.).

Table 4

Incubation conditions	NH ₄ Cl	ICl1-S	ICl1-T	ICl2	I _{in}	I _{out}	I ₋₈₀
ND	1 mM	231	83	149	139	143	-10 ± 5
	10 mM	242	268	947	223	175	-50 ± 12
50 μM BAPTA-AM	1 mM	107	76	116	95	99	-1 ± 10
50 μM BAPTA-AM	10 mM	132	48	217	123	77	-30 ± 10
1 mM BAPTA	10 mM	116	120	97	160	92	-30 ± 10

Effects of 1 and 10 mM NH₄Cl application ICl, I_{in} and ICl(Ca) currents when [Ca²⁺]_i variations are buffered.

Oocytes were preincubated with 50 μM BAPTA-AM for 1 hour before NH₄Cl application or microinjected with BAPTA (1 mM final concentration inside the cell). For effective comparisons with Table 3, ICl and I_{in} are given in %, they were normalized against the currents measured in ND. The values given for the steady-state component of I₋₈₀ correspond to the difference between the current intensity in presence of NH₄Cl and the current in ND (nA ± S.E.M.).

Table 5

Conditions	ICl1-S	ICl1-T	ICl2	Iin	Iout	I ₋₈₀
ND	242	268	947	223	175	-50 ± 12
nominal 0-Ca ²⁺	81	96	157	109	65	-19 ± 10
1 mM LaCl ₃	119	67	69	32	25	-10 ± 10
5 mM caffeine	105	91	203	119	97	-20 ± 10
50 µg/ml heparin	125	41	109	117	107	-10 ± 10

Effects of 10 mM NH₄Cl on oocytes in presence of different inhibitors of calcium fluxes.

For effective comparisons with Table 3, ICl and Iin are given in %, they were normalized against the currents measured in ND. The values given for the steady-state component of I₋₈₀ correspond to the difference between the current intensity in presence of NH₄Cl and the current in ND (nA ± S.E.M.).

Table 6

pH _e	ICl1-S	ICl1-T	ICl2	Iin	Iout	I ₋₈₀
ND 5.5	157	192	229	176	113	-60 ± 20
ND 9	167	440	291	134	74	-20 ± 10

Effects of a change of extracellular pH (pH_e) on oocytes.

For effective comparisons with Table 3, ICl and Iin are given in %, they were normalized against the currents measured in ND. The values given for the steady-state component of I₋₈₀ correspond to the difference between the current intensity for changes pH_e and the current in ND pH 7.4 (nA ± S.E.M.).

Table 7

Incubation conditions	Duration	ICI1-S	ICI1-T	ICI2	Iin	Iout	n
ND	> 10 hours	96 ± 17	120 ± 33	-35 ± 5	-314 ± 18	380 ± 17	4
1 mM NH ₄ Cl	Instantaneous	153 ± 25	97 ± 31	-51 ± 8	-628 ± 51	731 ± 64	4
	< 10 hours	183 ± 25	87 ± 21	-110 ± 29	-429 ± 53	587 ± 56	6
	> 10 hours	129 ± 23	79 ± 28	-100 ± 27	-339 ± 20	468 ± 21	6
10 mM NH ₄ Cl	Instantaneous	234 ± 53	136 ± 130	-360 ± 117	-954 ± 278	569 ± 126	3
	< 10 hours	360 ± 32	211 ± 121	-231 ± 20	-893 ± 79	942 ± 81	11
	> 10 hours	80 ± 16	60 ± 8	-30 ± 6	-183 ± 45	375 ± 86	4

Effects of long term applications of NH₄Cl on oocytes.

Effects of 1 and 10 mM NH₄Cl on oocytes. Values are given in nA ± S.E.M. with the number of cells on which currents were recorded.

Table 8

Incubation conditions	Incubation time	GVBD	ICI1-S	ICI1-T	ICI2	Iin	Iout	n
ND	Instantaneous	no	96 ± 17	120 ± 33	-35 ± 5	-314 ± 18	380 ± 17	4
1 mM NH ₄ Cl	Instantaneous	no	153 ± 25	97 ± 31	-51 ± 8	-628 ± 51	731 ± 64	4
	~8 hours	no	183 ± 12	76 ± 9	-127 ± 7	-423 ± 59	397 ± 18	4
	~12 hours	yes	122 ± 88	9 ± 79	-92 ± 63	-206 ± 71	15 ± 75	2
10 mM NH ₄ Cl	Instantaneous	no	234 ± 53	136 ± 130	-360 ± 117	-954 ± 278	569 ± 126	3
	~8 hours	no	516 ± 107	41 ± 144	-463 ± 50	-962 ± 104	549 ± 114	5
	~12 hours	yes	54 ± 11	11 ± 13	-54 ± 14	-214 ± 56	119 ± 51	6

Effects of 1 and 10 mM NH₄Cl during maturation induced by incubation in presence of 10 µM progesterone.

Values are given in nA ± S.E.M. with the number of cells on which currents were recorded.

Table 9

Incubation conditions	Progesterone	GVBD ₅₀ in ND
-	10 μ M progesterone	x 1
nominal 0-Ca ²⁺	10 μ M progesterone	x 0,81 $\pm$ 0,04
50 μ M BAPTA-AM	10 μ M progesterone	x 1,06 $\pm$ 0,04

Effects of calcium influx and [Ca²⁺]_i variations inhibition 10 μ M progesterone-induced maturation.

Oocytes are incubation in either nominal 0-Ca²⁺ medium or in presence of 50 μ M BAPTA-AM (applied 1 hour before NH₄Cl application). 10 μ M progesterone is added 1 hour after treatment. Relative GVBD₅₀ time represents the time of GVBD₅₀ of the oocytes incubated in nominal 0-Ca²⁺ medium or in presence of 50 μ M BAPTA-AM + progesterone (Pg) when normalized against the GVBD₅₀ time of control oocytes incubated with progesterone alone (n = 3 females).

Table 10

Incubation conditions	Progesterone	GVBD ₅₀ with NH ₄ Cl 1 mM	GVBD ₅₀ with NH ₄ Cl 10 mM
-	10 μ M Pg	x 1.46 $\pm$ 0.22	---
nominal 0-Ca ²⁺	10 μ M Pg	x 1.32 $\pm$ 0.04	xxx
50 μ M BAPTA-AM	10 μ M Pg	x 1.31 $\pm$ 0.18	xxx

Effects of NH₄Cl on 10 μ M progesterone-induced maturation when either calcium influx or [Ca²⁺]_i increase are inhibited.

Oocytes are incubation in either nominal 0-Ca²⁺ medium or in presence of 50 μ M BAPTA-AM (applied 1 hour before NH₄Cl application). 10 μ M progesterone is added 1 hour after NH₄Cl application. Relative GVBD₅₀ time represents the time of GVBD₅₀ of the oocytes incubated in nominal 0-Ca²⁺ medium or in presence of 50 μ M BAPTA-AM + progesterone (Pg) when normalized against the GVBD₅₀ time of control oocytes incubated with progesterone alone (n = 3 females). --- GVBD₅₀ is not attained, xxx no GVBD observed.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie I - Variations de pHi et modulation de la reprise méiotique

I.I- Effets des variations de pHi sur la GVBD

La fonction de l'homéostasie protonique lors de la reprise méiotique a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, les processus moléculaires sensibles aux variations de pHi restent mal connus. Alors que chez certaines espèces comme l'Oursin, l'augmentation du pHi est nécessaire pour la reprise méiotique (Gould et Stephano, 1993 ; Stephano et Goulg, 1997), chez le Xénope, elle n'aurait qu'un rôle facilitateur. Nous avons observé que l'alcalinisation artificielle, par micro-injection de tampon Tris pH 9 ou par incubation en ND pH 9, accélère la reprise méiotique. Inversement, la diminution de pHi, par incubation en présence de NH₄Cl ou de ND pH 6 ou par micro-injection de tampon MOPS pH 6.9, entraîne un retard de la reprise méiotique. Le retard de GVBD induit par le NH₄Cl est dose-dépendant.

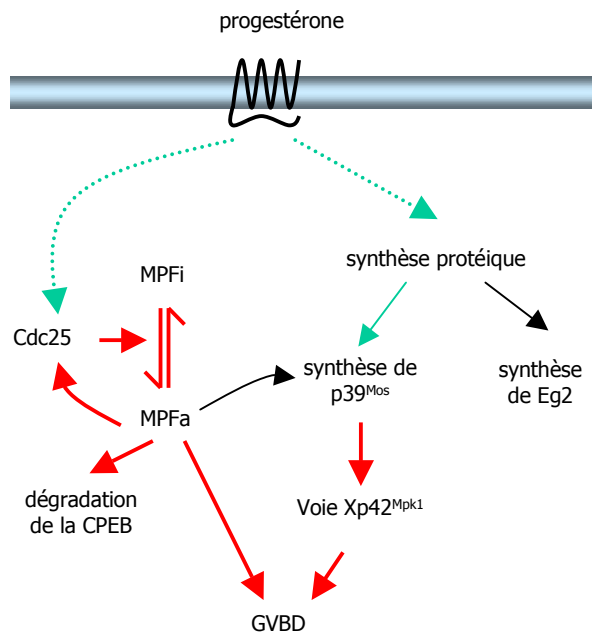
Les travaux de Liu et Patino (1993) ont montré que la fixation de la progestérone à son récepteur, au niveau de la membrane plasmique, est maximale pour un pHe compris entre 7 et 7.6. Au-delà de ces valeurs, la fixation de la progestérone à son récepteur décroît. Dans la plupart de nos conditions expérimentales, les modifications de pH sont intracellulaires et donc, elles n'ont pas pu affecter la liaison de la progestérone à son récepteur. Nous avons également induit des variations de pHi en modifiant le pHe (ND pH 6 ou 9) : les résultats obtenus ont été identiques à ceux obtenus avec le NH₄Cl ou la micro-injection de tampons. Ainsi, les variations de pHe (ND pH 6 ou pH 9) modulent la cinétique de maturation (respectivement ralentissement et accélération), mais cet effet ne serait pas relatif à une modification de la liaison de la progestérone à son récepteur.

Chez le Xénope, lorsque la reprise méiotique est stimulée par la progestérone, la vésicule germinative migre au pôle animal *via* la mise en place du réseau de microtubules. En présence de NH₄Cl, nous n'avons pas observé d'anomalies dans la formation du fuseau ou dans la condensation des chromosomes, bien que ces événements soient retardés par la diminution de pHi. La grande majorité des fuseaux observés à la membrane correspondent à des fuseaux de métaphase I lorsque les ovocytes sont incubés en présence de NH₄Cl 1 mM tandis que les ovocytes contrôles présentent des fuseaux de métaphase II. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que, lors de l'incubation en absence de sodium ou lors de la micro-injection de tampon MOPS pH 6.9, la migration de la vésicule germinative est inhibée dans 30 % des cas et la formation du fuseau est ectopique suite à une stimulation

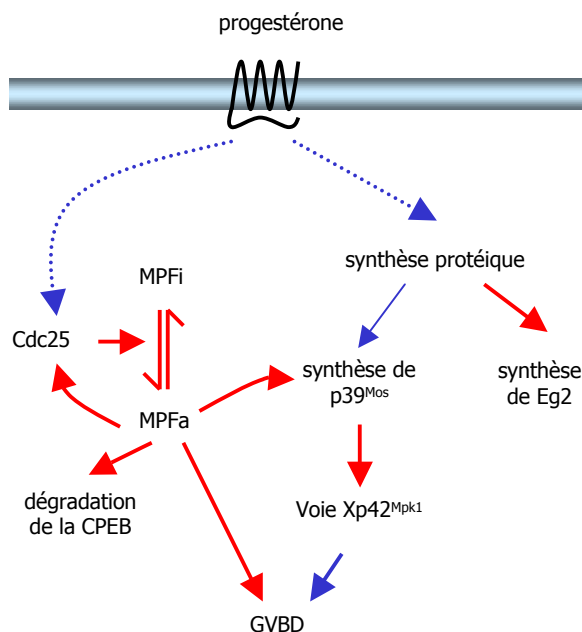
Figure 48 : Sensibilités des voies de signalisation face aux variations de pHi durant la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

La stimulation de la maturation par la progestérone, la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures ou de MAPK constitutivement active a permis de déterminer la sensibilité de différentes voies de signalisation lors de la reprise méiotique. Les flèches rouges représentent les mécanismes qui ne sont pas sensibles aux variations de pHi (augmentation ou diminution), en bleu les mécanismes retardés par l'acidification intracellulaire, en vert les mécanismes accélérés par l'augmentation de pHi et en orange les mécanismes qui sont totalement inhibés par la diminution de pHi.

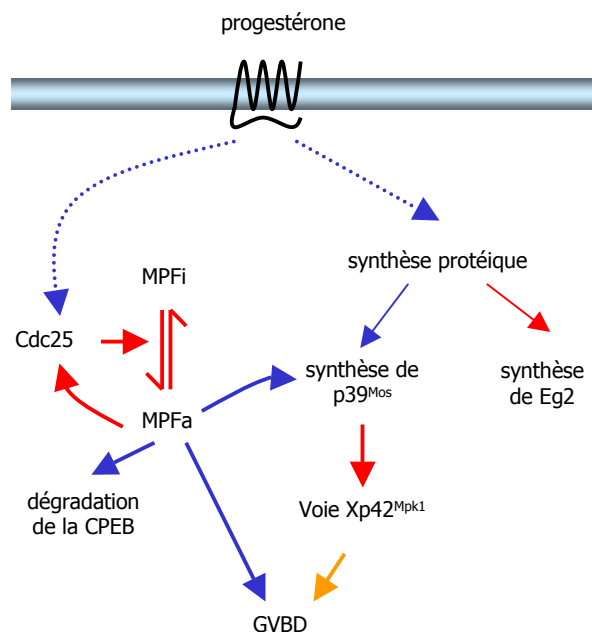
ovocytes micro-injectés de Tris pH 9



ovocytes incubés en NH₄Cl 1 mM



ovocytes incubés en NH₄Cl 10 mM



par la progestérone (Flament et coll., 1996). Ces différences entre nos observations et celles de Flament et coll. (1996) pourraient s'expliquer par le fait que dans ces conditions expérimentales, toute augmentation du pHi, qui normalement a lieu durant la maturation, est bloquée par la micro-injection de tampon MOPS ou l'absence de sodium dans le milieu extracellulaire, tandis qu'en présence de NH_4Cl , bien que le pHi soit globalement inférieur à celui des ovocytes contrôles, l'alcalinisation peut se produire et favoriser la migration du fuseau à la membrane. La micro-injection de tampon Tris pH 9, qui induit directement une alcalinisation intracellulaire, provoque la migration de la vésicule germinative dans 25 % des cas en absence de stimulation par la progestérone (Flament et coll., 1996). En accord avec ces résultats, nous avons observé que la micro-injection de tampon Tris pH 9 peut induire une montée de la vésicule germinative. Ainsi, l'augmentation du pHi pourrait être suffisante, dans certains ovocytes, pour mettre en place le réseau de microtubules permettant à la vésicule germinative de migrer au pôle animal.

I.2- Effets des variations de pHi sur les activations du MPF et de la voie p39^{Mos} - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$

Les variations de pHi affectent différemment les voies impliquées dans la reprise méiotique. La comparaison des résultats obtenus après stimulation de la maturation par différents outils permet de présenter un modèle intégrant la sensibilité des voies de transduction face aux variations de pHi (Figure 48). La transduction des signaux, du récepteur à la progestérone jusqu'aux activations du MPF et de la voie p39^{Mos} - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$, est très sensible au pHi. Les activations du MPF et de la voie p39^{Mos} - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ sont accélérées par une augmentation de pHi et sont retardées par une diminution de pHi induite dès 1 mM de NH_4Cl . Deux interprétations sont possibles : (1) les deux voies sont sensibles au pHi ou (2) elles dépendent toutes les deux d'un même événement en amont, sensible au pHi. Ces deux hypothèses sont plausibles et non mutuellement exclusives. En outre, dans la mesure où les activations de ces deux voies sont interconnectées lors de la stimulation par la progestérone, le retard d'une seule des deux voies entraîne le retard de l'autre voie. En effet, l'accélération ou le retard de la synthèse de p39^{Mos} accélère ou retarde, respectivement, l'activation du MPF induite par stimulation hormonale. En retour, l'accumulation de p39^{Mos} est régulée par un mécanisme dépendant du MPF (Castro et coll., 2001 ; Frank-Vaillant et coll., 2001).

En présence du NH_4Cl 10 mM, de nombreux processus sont retardés à l'exception de la boucle d'auto-amplification du MPF (Tableau 12). Les événements en aval de la voie $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$, responsables de l'entrée en phase M, sont extrêmement sensibles à une diminution

Tableau 12 : Effets des variations de pHi sur les différents mécanismes associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

événement	induit par	effets du NH ₄ Cl 1 mM	effets du NH ₄ Cl 1 mM	effets du Tris pH 9	effets de la cycloheximide
GVBD	Pg	retard	retard	accélération	inhibition
	cyto	pas d'effet	retard	pas d'effet	retard
	MAPK	retard	inhibition	pas d'effet	inhibition
événements précoces entraînant les activations du MPF et de p39^{Mos}-Xp41^{Mpk1}	Pg	retard	retard	accélération	N.D.
boucle d'auto-amplification du MPF	cyto	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	N.D.
synthèse de p39^{Mos}	cyto	pas d'effet	retard	N.D.	N.D.
synthèse de Aurora A/Eg2	Pg	pas d'effet	pas d'effet	N.D.	N.D.
dégradation de la CPEB	cyto	pas d'effet	retard	N.D.	N.D.

Pg : progestérone

cyto : micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures

MAPK : micro-injection de MAPK constitutivement active

N.D. : non déterminé

de pHi. La GVBD induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active est fortement retardée en présence de NH_4Cl 1 mM, et totalement inhibée en présence de NH_4Cl 10 mM.

Il est intéressant de noter que seuls les événements précoces de la maturation sont accélérés par l'alcalinisation intracellulaire. Ces mécanismes entraînant les activations du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, encore mal identifiés, pourraient être facilités par une alcalinisation intracellulaire. *Il serait notamment intéressant d'analyser l'activité enzymatique en fonction du pH de certaines protéines, comme la PKA ou la PKC, situées en amont de l'activation du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, puisque les variations de pHi ont un rôle déterminant dans le déroulement des événements précoces.*

Le cytoplasme d'ovocytes matures contient du MPF actif capable de déclencher l'activation du pré-MPF inactif lorsqu'il est injecté dans un ovocyte receveur immature (Masui et Markert, 1971 ; Gautier et Maller, 1991). L'activation du pré-MPF, *via* la boucle d'auto-amplification, nécessite l'activation de Cdc25 et de la Plk1 mais est indépendante de la synthèse protéique (Wasserman et Masui, 1975a ; Hoffmann et coll., 1993 ; Rime et coll., 1994 ; Strausfeld et coll., 1994 ; Karaïskou et coll., 2004). Cependant, la GVBD déclenchée par micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures est fortement retardée lorsque la synthèse protéique est inhibée (Wasserman et Masui, 1975a, observations personnelles). Comme pour la maturation induite par la progestérone, nous avons observé que l'inhibition de la synthèse de $p39^{\text{Mos}}$ provoque un retard de la GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures bien que l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF ne soit pas affectée. Ce retard de GVBD est proche de celui induit par la cycloheximide, $p39^{\text{Mos}}$ serait la protéine néo-synthétisée nécessaire pour que la GVBD se produise rapidement. L'incubation en présence d'U0126, responsable de l'inhibition de la voie $\text{Mek-Xp42}^{\text{Mpk1}}\text{-p90}^{\text{Rsk}}$, n'affecte pas la GVBD induite par la micro-injection de cytoplasme. Ainsi, la protéine $p39^{\text{Mos}}$ est impliquée directement dans la cinétique de la GVBD indépendamment de son rôle de MAPKK kinase dans la cascade de phosphorylation de $\text{Mek-Xp42}^{\text{Mpk1}}\text{-p90}^{\text{Rsk}}$. Elle n'intervient pas dans la dynamique d'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF.

Ces conditions nous ont permis de tester directement l'effet des variations de pHi sur l'activation de la boucle d'auto-amplification du MPF déclenchée par la micro-injection de cytoplasme, puisque nos résultats montrent qu'elle est dynamiquement indépendante de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$. L'activation de la boucle est un mécanisme insensible aux variations de pHi (alcalinisation et acidification intracellulaires). Karaïskou et coll. (1999) ont suggéré que

l'activation du MPF se fait en deux étapes. Durant la première phase, Cdc25 acquiert un niveau d'activité basale aboutissant à une activation linéaire de Cdk1. La seconde phase est marquée par la mise en place de la boucle d'auto-amplification du MPF et la phosphorylation complète de Cdc25. Ainsi, nos résultats suggèrent que seule la phase initiale d'activation du MPF serait sensible à une variation de pHi. La deuxième phase d'activation, c'est à dire la boucle d'auto-amplification, n'est pas sensible aux variations de pHi.

La GVBD et l'activation du MPF induites par la micro-injection de MAPK constitutivement active ne sont pas accélérées par l'alcalinisation intracellulaire alors qu'elles sont fortement retardées, voire inhibées, par la diminution de pHi. La GVBD induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active pourrait être inhibée à deux niveaux. (1) Cette inhibition pourrait résulter de l'influence du pHi sur l'activité de la MAPK. Effectivement, l'activation des MAPK-Erk2 requiert leur phosphorylation sur les résidus thréonine 183 et tyrosine 185 qui se trouvent au niveau du segment d'activation de la kinase. *In vitro*, à faible pH (5.5-6), la protonation du résidu tyrosine 185 est fortement augmentée, ce qui empêche l'activation de l'enzyme. De plus, sa capacité à phosphoryler un substrat exogène est fortement diminuée à faible pH, ce qui est principalement dû à une diminution de ses capacités d'interactions avec ses substrats (Tokmakov et coll., 2000). (2) Le retard, voire l'inhibition de la GVBD, par la micro-injection de MAPK constitutivement active pourrait également résulter d'un effet inhibiteur de l'acidification sur la synthèse d'une protéine (encore à caractériser) qui pourrait être nécessaire pour la GVBD. Effectivement, en accord avec les résultats de Haccard et coll. (1995), nous avons observé que la synthèse protéique est nécessaire pour la GVBD induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active.

Il serait notamment intéressant de déterminer si $p39^{Mo}$ est la protéine requise pour la GVBD induite par la micro-injection de MAPK constitutivement active est ^s. Ainsi, les MAPK ne seraient capables d'induire la GVBD que via la stimulation en amont de $p39^{Mos}$ et pourraient ainsi mettre en place la boucle de rétrocontrôle $Xp42^{Mpk2}$ - $p39^{Mos}$.

I.3- Effets des variations du pHi sur la synthèse et la dégradation des protéines

Dans les années 1980, de nombreuses études ont relié l'augmentation de pHi à l'augmentation de la synthèse protéique. Cependant, le lien entre ces deux événements diffère selon les espèces. Chez l'Oursin, pHi et synthèse protéique sont clairement liés

(Brandis et Raff, 1979 ; Grainger et coll., 1979 ; Winkler, 1982). Dans des systèmes de traduction *in vitro* d'œuf d'Oursin, la formation du complexe de pré-initiation, contenant la sous unité 40S et l'ARNt méthionyl, est plus importante à pH 7.4 qu'à pH 6.9 (Winkler et coll., 1985). Dans l'ovocyte de Xénope, l'augmentation du pHi débute avant l'augmentation de la synthèse protéique (Houle et Wasserman, 1983) mais elle ne semble pas être impliquée dans l'augmentation de la synthèse protéique (Houle et Wasserman, 1983 ; Stith et Maller, 1984 ; Taylor et coll., 1985). En reconsidérant certains travaux réalisés avec les bases faibles, on constate qu'une acidification augmente même la synthèse protéique globale (Houle et Wasserman, 1983). Toutefois, le patron des protéines synthétisées avant la GVBD est différent (Schorderet-Slatkine et Beaulieu, 1977). Certaines protéines nouvellement synthétisées durant la maturation pourraient être sous un contrôle dépendant du pH alors que les variations du pHi n'affecteraient pas la synthèse protéique globale. En effet, nous avons observé que l'accumulation de p39^{Mos} est retardée par l'acidification alors que celle de Aurora A/Eg2 n'est pas affectée. Comme p39^{Mos}, l'accumulation de Aurora A/Eg2 dépend de sa synthèse et de sa dégradation mais, à la différence de p39^{Mos}, la synthèse de Aurora A/Eg2 ne nécessite pas la polyadénylation de son ARNm (Frank-Vaillant et coll., 2000). L'acidification intracellulaire pourrait affecter la synthèse protéique de manière qualitative et non quantitative *via* un effet sur le processus de polyadénylation cytoplasmique. *L'étude des variations de pHi sur le processus de polyadénylation, in vitro, par retard sur gel, permettrait de déterminer si ce mécanisme est affecté par les changements de pH.*

En présence de NH₄Cl 10 mM, le retard de GVBD₅₀ est beaucoup plus important (GVBD₅₀ = 1.76 GVBD₅₀ des ovocytes contrôles). Nos résultats ont montré, d'une part, que l'absence de synthèse de p39^{Mos} provoque un retard de la GVBD et d'autre part, que l'acidification intracellulaire retarde l'accumulation de p39^{Mos}. Ainsi, une partie du retard provoqué par le NH₄Cl 10 mM pourrait se faire *via* un effet sur l'accumulation de p39^{Mos}. *La micro-injection d'une protéine p39^{Mos} murine permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.* Cependant d'autres facteurs que la synthèse protéique peuvent être touchés par l'acidification intracellulaire puisque le retard est beaucoup plus important en présence de NH₄Cl que de cycloheximide (GVBD₅₀ = 1.42 GVBD₅₀ des ovocytes contrôles). La diminution du pHi peut modifier l'état d'ionisation de certaines protéines et ainsi leurs caractères physiques. Les protéines présentant des régions chargées négativement peuvent être davantage protonées lorsque le pHi diminue, ce qui peut modifier leurs interactions électrostatiques avec d'autres protéines. Les activités de différentes enzymes peuvent également être directement affectées par la diminution du pHi. L'activité de certaines kinases

pourrait être sensible à une acidification intracellulaire qui pourrait se traduire par un retard de la reprise méiotique, ceci d'autant plus que l'augmentation de la synthèse protéique est accompagnée d'une augmentation du taux de phosphorylation qui approximativement triple durant la maturation (Maller et coll., 1977 ; Wu et Gerhart, 1980). En présence simultanée de NH_4Cl et de cycloheximide, le retard est encore plus important ($\text{GVBD}_{50} = 2.22 \text{ GVBD}_{50}$ des ovocytes contrôles). Ces deux substances agissent donc en synergie. En présence de NH_4Cl , la synthèse de certaine(s) protéine(s) serait seulement retardée alors qu'en présence de cycloheximide, elle serait totalement inhibée, ce qui pourrait expliquer l'effet synergique de la cycloheximide et du NH_4Cl sur la reprise méiotique.

Nous avons également analysé la dégradation de la CPEB qui est consécutive à la phosphorylation de la CPEB par le MPF (Mendez et coll., 2002 ; Thom et coll., 2003). La dégradation de la CPEB est toujours concomitante avec l'activation du MPF en présence de 1 mM de NH_4Cl suggérant que la phosphorylation de la CPEB et sa dégradation subséquente ne sont pas retardées ou inhibées par les variations de pHi induites par 1 mM de NH_4Cl . Par contre, la dégradation de la CPEB est retardée par rapport à l'activation du MPF en présence de NH_4Cl 10 mM. La diminution du pHi pourrait affecter l'activité du protéasome. Toutefois, un retard de la dégradation de la CPEB n'aurait pas d'effet sur la reprise méiotique puisque la micro-injection d'une CPEB mutante non phosphorylable par Cdk1 et non dégradable par le protéasome n'affecte pas la formation de la tache de maturation, la GVBD, l'activation initiale du MPF et la synthèse de $\text{p}39^{\text{Mos}}$. Par contre, la progression en deuxième division de méiose, la synthèse de cycline B1 ainsi que la réactivation du MPF sont inhibées si la dégradation de la CPEB est empêchée (Mendez et coll., 2002).

Plusieurs études montrent que l'homéostasie protonique et calcique pourraient être liées. Dans de nombreux systèmes cellulaires, les variations de pHi sont associées à des changements du niveau de calcium. L'acidification du cytosol induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les neutrophiles (Naccache et coll., 1988) et dans les cellules musculaires cardiaques (Kim et Smith, 1988) alors que dans les cellules musculaires lisses en culture (Siskind et coll., 1989), dans les cellules endothéliales des capillaires (Danthuluri et coll., 1990) et les cellules de carcinomes de colon HT₂₉ (Benning et coll., 1996), l'alcalinisation intracellulaire induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Dans les ovocytes d'Oursin, l'augmentation du pHi est associée à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Dubé et Epel, 1986). Les oscillations calciques pourraient être régulées par le réticulum endoplasmique en fonction

des oscillations de pHi. Le passage d'un pHi basique à acide pourrait entraîner la libération de calcium à travers des canaux sensibles au pH présents au niveau des vésicules du réticulum endoplasmique (Grandin et Charbonneau, 1991).

Après avoir étudié les relations entre le pHi et les deux voies de signalisation principales qui mènent à la transition G2/M de l'ovocyte, nous avons entrepris l'étude des relations entre l'homéostasie protonique et calcique.

Partie II- Liens entre les voies de signalisation protonique et calcique

II.1- Effets du NH_4Cl sur les courants ICl_{-80} , ICl et Iin

Dans la plupart des cellules, les bases faibles tels que le chlorure d'ammonium, la triméthylamine, la procaine sont généralement utilisées afin de provoquer une alcalinisation intracellulaire. Les bases faibles induisent une alcalinisation intracellulaire après passage au travers de la membrane de leur forme déprotonée. Dans les œufs d'Oursin (Lopo et Vacquier, 1977 ; Shen et Steinhardt, 1978) ou dans les ovocytes de Patelle (Guerrier et coll., 1986 ; Vilain et coll., 1993), le NH_4Cl et la procaine sont responsables d'une augmentation du pHi . *A contrario*, l'application de NH_4Cl sur les ovocytes de Xénope provoque une acidification intracellulaire lente et réversible associée à une large dépolarisation membranaire. La triméthylamine (Burckhardt et Thelen, 1995) ou la procaine (Rodeau et coll., 1998) déclenche également une acidification intracellulaire et une dépolarisation membranaire. D'une manière générale, les amines primaires, secondaires et tertiaires sont responsables d'une acidification intracellulaire dans l'ovocyte de Xénope proportionnelle à leur pKa (Burckhardt et Thelen, 1995).

Les canaux chlores dépendant du calcium sont utilisés comme des indicateurs de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans l'ovocyte de Xénope (Dascal, 1987). Lorsque la signalisation calcique est activée dans des ovocytes clampés à -80 mV, le courant enregistré correspond à un courant chlore entrant dépendant du calcium ($\text{ICl}(\text{Ca})$, Barish, 1983 ; Boton et coll., 1989 ; Reifarth et coll., 1997). Nos résultats montrent que l'application de NH_4Cl sur des ovocytes clampés à -80 mV déclenche un courant entrant dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de NH_4Cl . Ce courant entrant peut avoir deux composantes : un courant transitoire, qui ne s'observe que dans certains lots d'ovocytes, et un courant soutenu toujours présent. L'intensité du courant soutenu est d'autant plus forte que la fréquence d'observation du courant transitoire est grande. A ces deux courants peuvent se superposer des oscillations caractéristiques d'oscillations calciques qui interviennent le plus souvent lorsque l'intensité du courant entrant soutenu est forte.

La valeur du potentiel de réversion ($E_{\text{rev}} = 6$ mV) du courant soutenu après application de NH_4Cl est plus élevée que la valeur du potentiel de réversion du chlore (compris selon les auteurs entre -14 et -28 mV, Weber, 1999). L'application de NH_4Cl en présence de DIDS, inhibiteur des courants chlores, diminue fortement l'amplitude du courant

entrant suggérant que la composante majeure de ce courant est une sortie de chlore. Corrélativement, le NH_4Cl induit une augmentation du courant entrant en absence de chlore. Ces résultats n'excluent pas que d'autres ions puissent contribuer à ce courant, ainsi nous avons choisi d'appeler ce courant I_{-80} et non ($\text{ICl}(\text{Ca})$).

L'amplitude des courants entrants mesurée à -80 mV, en présence de NH_4Cl , varie fortement d'un ovocyte à l'autre. La variabilité est beaucoup plus faible pour des ovocytes issus d'une même femelle. Cette variabilité a déjà été décrite par Woodward et Miledi (1992), et par Burckhardt et Burckhardt (1997) après l'addition de NH_4Cl . Des variations dans la quantité de canaux et / ou dans la quantité de messagers intracellulaires régulant les propriétés membranaires sont évoquées.

L'utilisation du protocole de voltage clamp développé par Parekh (1995) et Kuruma et Hartzell (2000) permet de distinguer l'activation des courants chlores en fonction de l'origine du calcium. ICl1-S est activé par la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires. ICl2 et ICl1-T sont activés par l'influx de calcium du milieu extracellulaire. Nos résultats ont montré que l'application de NH_4Cl 1 ou 10 mM induit une augmentation de l'amplitude des courants ICl1-S et ICl2 traduisant une augmentation de la concentration calcique. Les résultats obtenus avec ICl1-T sont difficilement interprétables du fait d'une très forte variabilité de ce courant d'une cellule à l'autre. Lors de l'application de NH_4Cl , dans certains ovocytes, la valeur de ce courant augmente alors que dans d'autres ovocytes, elle diminue. Le NH_4Cl 1 et 10 mM induit également une augmentation de I_{in} et I_{out} . L'augmentation de l'amplitude des courants entrant ICl et I_{in} provoquée par l'application de NH_4Cl est supprimée par l'incubation en présence de tampon calcique (BAPTA-AM) ou par la micro-injection de BAPTA, confirmant ainsi que le NH_4Cl déclenche bien une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. *Il serait notamment intéressant d'étudier l'activation des courants I_{-80} , ICl et I_{in} lorsque le pHi de l'ovocyte est tamponné (par micro-injection de tampon MOPS) avant d'appliquer le NH_4Cl . Ceci permettrait de distinguer la contribution éventuelle de l'acidification du pHi dans l'activation de ces courants.*

Lorsque les ovocytes sont incubés pendant de longues périodes (supérieures à 10 heures), le NH_4Cl 1 mM provoque toujours une augmentation de l'amplitude des courants I_{-80} , ICl et I_{in} alors qu'en présence de NH_4Cl 10 mM, l'amplitude de ces courants est plus faible qu'initialement, suggérant que l'ovocyte est capable de mettre en place des mécanismes qui lui permettent de lutter contre l'entrée de NH_4Cl ou que la présence de NH_4Cl à forte concentration entraîne des modifications des systèmes de régulation ionique de la cellule.

II.2- Origine du calcium impliqué dans l'augmentation de la concentration calcique induite par le NH₄Cl

Généralement, la transduction du signal extracellulaire stimule la voie des phosphoinositides qui entraîne l'activation de deux voies différentes : l'une responsable de l'augmentation de la concentration calcique après synthèse d'IP₃, l'autre responsable de l'augmentation du pHi *via* la production de DAG et l'activation de la PKC (Houslay, 1987). Les variations de pHi peuvent résulter de la mobilisation de différentes sources de calcium (libération de calcium à partir des stocks intracellulaires ou influx du milieu extracellulaire). Dans les cellules musculaires lisses aortiques de Rat, l'alcalinisation intracellulaire provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire par un influx de calcium à travers des canaux calciques membranaires non dépendant du voltage, similaires à ceux activés lors de l'entrée capacitive de calcium. L'augmentation de la concentration calcique déclenchée par le NH₄Cl est complètement inhibée par le retrait de calcium dans le milieu extracellulaire ou par l'addition du nickel, suggérant que la libération à partir des stocks intracellulaires est négligeable (Eto et coll., 2003). Différentes études ont montré que les récepteurs à l'IP₃ sont également sensibles aux variations de pHi : la liaison de l'IP₃ à son récepteur augmenterait avec l'augmentation du pHi (Worley et coll., 1987 ; Guillemette et Segui, 1988). Un autre processus a été mis en cause dans des cellules de Rat (cellules du canal collecteur de la zone médullaire rénale) où l'acidification est responsable d'une augmentation de la concentration calcique en favorisant la synthèse d'IP₃ d'où la libération des stocks calciques intracellulaires (Slotki et coll., 1993). Ainsi, les variations de pHi peuvent conduire à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire soit en provoquant un influx de calcium depuis le milieu extracellulaire soit en déclenchant une libération de calcium depuis les stocks intracellulaires. Nous avons étudié par quelle voie le NH₄Cl déclenche une augmentation de la concentration calcique dans les ovocytes de Xénope. Le NH₄Cl provoque une augmentation des courants ICl1-S, ICl2 et ICl1-T suggérant la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et l'activation d'un influx de calcium du milieu extracellulaire. L'incubation des ovocytes en présence de caféine et la micro-injection d'héparine suppriment l'activation des trois courants ICl1-S, ICl2 et ICl1-T par le NH₄Cl. La caféine est un inhibiteur de l'ouverture des récepteurs à l'IP₃ (Wakui et coll., 1990) et l'héparine est connue pour être un antagoniste de ces mêmes récepteurs (Callamaras et Parker, 1994 ; Yao et Parker, 1994). Le NH₄Cl mobiliserait donc les stocks calciques

intracellulaires. L'inhibition de cette mobilisation a un effet en retour : les stocks intracellulaires n'étant pas mobilisés, les canaux SOC_s ne sont pas activés. L'utilisation du lanthane, un inhibiteur des canaux calciques présents au niveau de la membrane plasmique, supprime l'activation de ICL1-T et de ICL2 par le NH₄Cl. L'incubation des ovocytes en absence de calcium extracellulaire réduit les intensités des courants I₋₈₀, ICL, I_{in}. Cependant, l'utilisation d'un milieu extracellulaire sans calcium peut poser problème puisque l'ovocyte présente des canaux chlores inactivés par le calcium (I_{ClCC}) qui sont activés par le retrait de calcium extracellulaire (Weber et coll., 1995). Ces résultats suggèrent que le mécanisme principal par lequel le NH₄Cl induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire implique une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires qui est suivie par l'activation des SOC_s.

Les augmentations de l'amplitude du courant ICL1-S induites par le NH₄Cl 1 et 10 mM sont similaires alors que l'augmentation de l'amplitude des courants ICL1-T, ICL2, I_{in} et I_{out} est beaucoup plus forte en présence de NH₄Cl 10 mM. Cette différence d'effet entre le NH₄Cl 1 et 10 mM sur l'amplitude des courants est très prononcée pour le courant ICL2. Ainsi, les canaux impliqués dans l'entrée capacitive de calcium pourraient être également sensibles aux variations de pHi.

II.3- Effets des variations de pHe sur les courants ICL₋₈₀, ICL et I_{in}

Nous avons également abordé l'interconnexion entre les variations de pHi et de calcium intracellulaire en modifiant le pHe. Les variations de pHe conduisent à des variations de pHi. Les ions hydrogènes sont perméants à la pompe Na⁺/K (Burckhardt et coll., 1992b) et à la pompe Na⁺/K⁺ ATPase (Vasilyev et coll., 2004). Ainsi, le passage du ND pH 7.4 au ND pH 5.5 se traduit par une acidification de pHi. Nos résultats montrent que l'application de ND pH 5.5 induit une augmentation de l'amplitude des courants ICL et I_{in}. Ces résultats sont en accord avec ceux de Woodward et Miledi (1992) qui ont démontré qu'une acidification de pHe induit un courant chlore dépendant du calcium. Nous avons constaté que l'application du ND pH 9 sur les ovocytes provoque également une augmentation des intensités de ICL1-S, ICL1-T, ICL2 et I_{in}. Nos résultats suggèrent qu'une acidification mais aussi une alcalinisation de pHe induit des variations de la concentration calcique intracellulaire.

Il serait intéressant de déterminer par quelle voie les variations de pHe induisent une augmentation de la concentration calcique.

II.4- Modifications de l'homéostasie calcique et de la perméabilité au NH_4Cl pendant la reprise méiotique

Durant la maturation, de nombreuses modifications ioniques se produisent, elles préparent notamment l'ovocyte à son changement de milieu lors de la ponte (passage du liquide physiologique à l'eau douce) et favorisent l'activation de l'ovocyte mature lors de la fécondation. La maturation est accompagnée d'une modification des conductances chlores dépendantes du calcium. Durant les 5 à 8 heures qui suivent la stimulation par la progestérone, l'intensité du courant chlore sortant transitoire mesurée entre -20 et $+20$ mV augmente puis diminue progressivement avant la GVBD et disparaît totalement pour réapparaître au moment de la fécondation (Vilain et coll., 1989). En outre, les conductances membranaires ne sont pas les seules affectées durant la maturation : l'entrée de calcium *via* les canaux SOC est découplée de la vidange des stocks intracellulaires au moment de la GVBD (Machaca et Haun, 2000 ; Machaca et Haun, 2002). L'activation du MPF inhibe le couplage entre la déplétion des stocks calciques intracellulaires et l'activation des SOC (Machaca et Haun, 2002).

Les courants ICl et Iin enregistrés dans les ovocytes contrôles matures sont nettement plus faibles que dans les ovocytes immatures. L'application de NH_4Cl sur des ovocytes matures provoque une diminution des courants ICl et Iin alors que sur des ovocytes immatures, le NH_4Cl induit une augmentation de l'intensité de ces courants. Bien que le courant ICl(Ca) soit toujours présent dans les ovocytes matures puisqu'il est activé par l'ionophore A23187, l'application de NH_4Cl ne déclenche pas son activation. Deux hypothèses sont envisageables. (1) Durant la maturation, la membrane de l'ovocyte subit de nombreuses modifications et la perméabilité au $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pourrait être différente, la membrane pourrait devenir davantage perméable au NH_3 , ce qui serait responsable d'un effet différent sur l'activation des canaux chlores dépendant du calcium. Ainsi, si la membrane est davantage perméable au NH_3 qu'au NH_4^+ dans les ovocytes matures, le NH_4Cl induirait une alcalinisation intracellulaire qui pourrait être responsable de la diminution des courants ICl et Iin dans les ovocytes matures. (2) La régulation et la sensibilité de nombreux canaux sont modifiées durant la reprise méiotique, ce qui pourrait expliquer une réponse différente lors de l'application de NH_4Cl selon que les ovocytes soient matures ou non. Cependant, *il serait nécessaire de confirmer cette hypothèse par une mesure directe du pHi* . Dans notre modèle, il est étonnant d'observer qu'une possible alcalinisation intracellulaire, induite par le NH_4Cl

sur des ovocytes matures, conduit à une diminution de l'intensité des courants ICl et Iin. Ce résultat est différent de celui obtenu sur des ovocytes immatures, où une application de ND pH 9 induit une augmentation des courants ICl et Iin. Ces observations pourraient résulter de différences entre l'effet d'une baisse de pHe (d'où une baisse indirecte de pHi) et l'effet d'une baisse directe de pHi. Une telle différence a déjà été constatée par Kuruma et coll. (2000) qui ont montré que l'activation du courant Iin varie selon que l'acidification soit faite par incubation dans une solution acide ou par micro-injection de HCl.

Partie III : pHi, calcium et transition G2/M

Le calcium est intimement lié au contrôle de la division cellulaire. Dans les embryons d'Oursin, les oscillations de la concentration calcique intracellulaire ont été mesurées en association avec des événements de la mitose, telles que la transition métaphase-anaphase et la rupture de l'enveloppe nucléaire (Poenie et coll., 1985 ; Steinhardt et Alderton, 1988). De plus, une augmentation artificielle de la concentration calcique intracellulaire est responsable d'une condensation prématurée de la chromatine et de la rupture de l'enveloppe nucléaire dans les embryons d'Oursin (Twigg et coll., 1988). Dans les embryons de Xénope, la micro-injection d'EGTA-Ca dans des blastomères ralentit et même inhibe le clivage en tamponnant les variations de la concentration calcique intracellulaire suggérant que les oscillations calciques jouent un rôle régulateur dans la division (Baker et Warner, 1972).

L'influence des variations calciques sur la reprise méiotique chez le Xénope est à l'origine de nombreuses études dont les résultats divergent. En accord avec les résultats de Duesbery et Masui (1996), nous avons observé que l'incubation en présence de BAPTA-AM retarde la reprise méiotique. Plusieurs groupes ont montré que l'inhibition de la libération de calcium des stocks intracellulaires empêche la reprise méiotique des ovocytes de Xénope (Han et Lee, 1995 ; Kobrinsky et Kirchberger, 2001). Ainsi, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire chez le Xénope serait nécessaire pour la GVBD.

D'autres auteurs proposent que la mise en place de gradients calciques soit plus importante que la valeur absolue de la concentration calcique intracellulaire. Lorsque les ovocytes sont stimulés par la progestérone, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire pourrait être locale, notamment à proximité des récepteurs à IP₃, et l'injection de chélateur de calcium pourrait perturber la mise en place de ces gradients (Duesbery et Masui, 1996).

En accord avec les résultats récents de Sun et Machaca (2004), nous avons observé que la GBVD est accélérée lorsque le milieu d'incubation est dépourvu de calcium. Ce résultat est en contradiction avec les résultats de quelques auteurs qui ont observé un retard de la maturation lorsque les ovocytes sont incubés dans un milieu déplété en calcium (milieu 0 mM calcium en présence d'EGTA, Gelerstein et coll., 1988 ; Han et coll., 1995). Nous ne pouvons pas exclure que, dans nos conditions, une faible quantité de calcium soit présente dans le milieu (de l'ordre de la dizaine de nM) puisque nous n'avons utilisé ni EGTA, ni BAPTA. Dans ces conditions, la présence de calcium au niveau de la membrane (bien qu'en quantité beaucoup plus faible que celle se produisant en présence d'un milieu extracellulaire

contenant du calcium) pourrait suffire à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire suite à la stimulation de la maturation.

Lorsque les ovocytes sont incubés dans un milieu déplété en calcium ou en présence de BAPTA-AM, le NH_4Cl 1 mM retarde toujours la GVBD, mais le retard est moins important que celui des ovocytes contrôles traités seulement avec le NH_4Cl 1 mM. Ainsi, l'augmentation de calcium induite par l'application de NH_4Cl serait impliquée dans le retard de la reprise méiotique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Sun et Machaca (2004) qui montrent que de fortes concentrations calciques intracellulaires retardent l'entrée en phase M en agissant entre la PKA et $p39^{\text{Mos}}$ et pourraient notamment inhiber la traduction des ARNm (Sun et Machaca, 2004). Dans le cadre de nos travaux, nous avons seulement étudié les effets de la chélation calcique, en présence de NH_4Cl , sur l'apparition des taches de maturation. *Il serait notamment très intéressant d'analyser l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ ainsi que l'état d'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}$ - $\text{Xp42}^{\text{Mpk1}}$ après chélation du calcium, en présence de NH_4Cl , afin de déterminer si l'effet du NH_4Cl sur l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$ est uniquement dû à l'augmentation du calcium ou s'il est associé à un effet pH.*

En présence de NH_4Cl 10 mM, l'incubation dans un milieu déplété en calcium ou en présence de BAPTA-AM inhibe totalement la reprise méiotique alors pour les ovocytes contrôles traités avec le NH_4Cl 10 mM, la maturation est fortement retardée mais pas inhibée. En présence de NH_4Cl 10 mM, dans un milieu déplété en calcium ou en présence de BAPTA-AM, les modifications ioniques induites sont probablement trop importantes pour que l'ovocyte puisse entrer en phase M. Ainsi, la diminution de l'augmentation de la concentration calcique (par le BAPTA-AM ou un milieu extracellulaire déplété en calcium) ne permet pas de diminuer le retard de GVBD induit par le NH_4Cl 10 mM mais au contraire inhibe totalement la GVBD. Ainsi, les mécanismes impliqués dans la reprise méiotique sensibles aux variabilités de pHi et/ou de calcium pourraient présenter des seuils différents de sensibilité. Nous pouvons également supposer que certains processus sont seulement affectés par l'augmentation de calcium subséquente à l'acidification alors que d'autres événements seront affectés seulement par les variations de pHi.

Le BAPTA-AM potentialise l'effet inhibiteur du taxol (agent qui prévient la dépolymérisation des microtubules) sur la GVBD (Duesbery et Masui, 1996). De la même manière, une diminution du pHi prévient la migration de la vésicule germinative au pôle animal lorsque les ovocytes sont stimulés par la progestérone (Flament et coll., 1996), suggérant un effet du pHi sur les modifications du réseau de microtubules lors de la reprise méiotique. Ainsi, l'absence de calcium associée à une diminution du pHi pourrait perturber, en synergie, la mise en place du réseau de microtubule et avoir des répercussions sur la

progression dans le cycle cellulaire. En effet, la polymérisation des microtubules favorise l'activité de facteurs comme la PKA qui inhibe la reprise méiotique puisque celle-ci peut s'associer aux microtubules *via* la protéine associée aux microtubules 2 (Leiser et coll., 1986) ou des protéines d'ancrage de la kinase A (Hirsch et coll., 1992). Par ailleurs, des extraits méiotiques, des protéines associées à la synthèse protéique comme les facteurs EF-1 et plusieurs amino-ARNt synthétases se trouvent également localisés au niveau des microtubules (Liska et coll., 2004). L'ARNm de la cycline B1 est associée au fuseau méiotique et la traduction de la cycline B1 serait localisée à proximité du fuseau (Groisman et 2000).

Conclusion générale

Nous avons d'abord mis en évidence que des modifications de pHi, alcalinisation ou acidification intracellulaire accélèrent ou retardent les activations précoces du MPF et de la voie Xp42^{Mpk1} responsables de la transition G2/M des ovocytes de Xénope. Alors que la boucle d'auto-amplification du MPF n'est pas sensible aux variations de pHi, l'activation de la voie p39^{Mos}-Xp42^{Mpk1} ainsi que l'entrée en phase M induite par Xp42^{Mpk1} apparaissent comme des mécanismes fortement affectés par la diminution de pHi. La diminution de pHi pourrait modifier de manière spécifique la synthèse des protéines nécessaires à la polyadénylation de leur ARNm. Nous montrons que seuls les événements précoces qui aboutissent à l'activation du MPF et de la voie MAPK sont accélérés par une augmentation de pHi.

Nous avons mis en évidence que des variations de pHi interfèrent avec l'homéostasie calcique des ovocytes de Xénope. L'application de NH₄Cl sur les ovocytes déclenche non seulement une acidification intracellulaire mais également une augmentation du calcium intracellulaire. Les résultats électrophysiologiques démontrent que cette augmentation intracellulaire de calcium résulte d'une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires suivie d'une entrée de calcium du milieu extracellulaire par activation des courants I_{SOc}. La diminution du pHi (de l'ordre de 0.4 unités pH potentialise fortement l'entrée de calcium *via* les canaux I_{SOc}. L'alcalinisation intracellulaire des ovocytes provoque également une augmentation du calcium intracellulaire par des voies qui restent à démontrer.

Il apparaît désormais nécessaire de discriminer plus précisément la nature des mécanismes sensibles au pH et/ou au calcium. Les travaux de Sun et Machaca (2004) suggèrent que des concentrations élevées de calcium retardent la synthèse de p39^{Mos}. Ce résultat corrobore nos observations faites en présence de NH₄Cl 10 mM. Il serait intéressant de déterminer la sensibilité de la machinerie de polyadénylation, processus essentiel pour la synthèse de p39^{Mos}, face aux variations de pHi et de calcium.

De plus, Machaca et Sun (2004) observent que, si la diminution de la concentration du calcium accélère la reprise méiotique, elle entraîne des anomalies dans la formation du fuseau. Les travaux de Flament et coll. (1996) avaient déjà souligné l'importance d'une augmentation du pHi pour la migration de la vésicule germinative ainsi que la formation du fuseau de division à la membrane. Dans ces conditions, nous pourrions tester l'hypothèse

que l'augmentation de pH_i intervienne dans l'élaboration du fuseau de division *via* une augmentation subséquente de calcium.

Il serait également intéressant de focaliser les recherches sur les protéines de la famille Aurora kinases puisqu'elles sont impliquées dans le processus de polyadénylation mais également dans la formation du fuseau. Si la synthèse de Aurora A/Eg2 n'est pas affectée par l'acidification, son activité pourrait être modifiée par des variations de pH_i et/ou le calcium. En effet, Aurora A/Eg2 peut-être accumulée sous sa forme inactive (Frank-Vaillant et coll., 2000).

De plus il serait important de préciser les liens entre l'homéostasie calcique et protonique. Nous avons observé qu'une diminution ou une augmentation de pH_i entraîne une augmentation de calcium. Existe-t-il un dialogue entre l'homéostasie protonique et l'homéostasie calcique ? En effet, le NHE présente des sites de régulation par la calmoduline (Bertrand et coll., 1994). L'utilisation de sondes sensibles aux ions hydrogènes et au calcium permettrait de visualiser les modifications de pH et calcium simultanément.

L'augmentation du pH_i est un événement universel en réponse à un stimulus mitotique. Notre étude conforte l'idée que les mécanismes de la division cellulaire sont associés à des oscillations du pH_i et de la concentration calcique intracellulaire. S'il a été suggéré par le passé que les modifications de pH_i associées à l'entrée en phase M sont des événements secondaires, consécutifs à l'activation de différentes kinases, nous montrons que des variations de pH_i modulent l'entrée en phase M. Ainsi, le pH_i constituerait un mécanisme à part entière dans la régulation du cycle cellulaire.

ANNEXES

ANNEXE I

L'inhibition de la O-N-Acétetylglucosaminyltransférase empêche la transition G2/M des ovocytes de *Xenopus laevis*.

La O-N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc, ajout d'un unique résidu de N-acétetylglucosamine sur les groupements hydroxyles de Sérine ou de Thréonine) est le principal type de O-glycosylation observé dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires des cellules eucaryotes. Cette modification post-traductionnelle dynamique, qui pourrait entrer en compétition avec la phosphorylation sur des sites communs dans un processus de type yin-yang, exerce des fonctions cellulaires mal définies. Des travaux récents ont suggéré une implication des modifications de type O-GlcNAc dans le contrôle du cycle cellulaire.

En collaboration avec le Dr T. Lefebvre, de l'UMR CNRS 8576, « Glycobiologie structurale et fonctionnelle », nous avons pu démontrer que l'activité de type O-GlcNAc augmente lors de la reprise méiotique des ovocytes d'Amphibien (*Xenopus laevis*). Des interactions protéine-protéine, soumises à régulation par la O-GlcNAc sont impliquées dans la dynamique de rupture de l'enveloppe nucléaire (Lefebvre et coll., 2004).

L'OGT, O-N-Acétetylglucosaminyltransférase, est responsable du transfert de O-GlcNAc. Des stratégies d'inhibition de l'OGT par l'alloxane, montrent que la O-GlcNAc est nécessaire pour l'activation du MPF et l'activation de la voie MAPK, qu'elles soient induites par stimulation hormonale (progestérone), ou par injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Dans ces conditions, les événements précoces de l'entrée en phase M ne se produisent pas : les ovocytes ainsi traités présentent des vésicules germinatives intactes. Une stratégie alternative de réduction du taux de O-GlcNAc a été employée en traitant les ovocytes par des inhibiteurs de glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (azasérine and DON). Dans ces conditions, l'entrée en phase M n'est pas affectée. Toutefois, ces inhibiteurs s'avèrent inefficaces à modifier le pool d'UDP-GlcNAc présent dans les cellules, révélant l'inadéquation de cette stratégie pour étudier le rôle de la O-glycosylation dans les ovocytes de Xénope.

Les cibles moléculaires de la OGT, impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, sont discutées : il apparaît notamment que le contenu en O-GlcNAc des MAPK est régulé lors de la

Annexe 1

transition G2/M de la reprise méiotique des ovocytes de Xénope. Un des constituants du MPF, la cycline B2, verrait son niveau de *O*-GlcNAc varier lors de la GVBD.

PUBLICATION 4

EN PREPARATION

O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE INHIBITION PREVENTS G2/M TRANSITION IN *XENOPUS LAEVIS* OOCYTES.

**Vanessa DEHENNAUT*, ¶, Tony LEFEBVRE¶, Chantal SELLIER*,
Yves LEROY¶, René CACAN¶, Jean-Claude MICHALSKI¶,
Jean-Pierre VILAIN* and Jean-François BODART*, ‡**

From the* Laboratoire de régulation des signaux de division, EA 4020, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France and the¶ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS, bâtiment C9, cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Running title: OGT inhibition blocks M-phase entry

‡ Address correspondence to: Jean-François Bodart Laboratoire de régulation des signaux de division, EA 4020, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France Tel. 0320436847; Fax.0320434038; E-mail. jean-françois.bodart@univ-lille1.fr

Full-grown Xenopus oocytes are arrested at the prophase of the first meiotic division in a G2-like state. Progesterone triggers meiotic resumption also called G2/M transition. This event is characterized by GVBD (Germinal vesicle breakdown) and by a burst in phosphorylation level that reflect M-phase promoting factor (MPF) and MAPK pathways activation. Beside phosphorylation and ubiquitin pathways, increasing evidences have suggested that the cytosolic and nuclear-specific O-GlcNAc glycosylation also contribute to cell cycle regulation. In order to investigate the link between O-GlcNAc and cell cycle, Xenopus

oocyte, in which most of the M-phase regulators have been discovered, was used as a cell model. Use of alloxan, an O-GlcNAc transferase inhibitor blocked G2/M transition in a concentration dependent manner. Alloxan prevented GVBD, and both MPF and MAPK activations, either triggered by progesterone stimulation or by egg cytoplasm injection. Addition of detoxifying enzymes (SOD and catalase) did not rescue meiotic resumption, indicating that alloxan effect did not occur through reactive oxygen species production. Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase inhibitors (azaserine and DON) were also used but failed to prevent GVBD.

Such strategy appeared not to be relevant because assays of UDP-GlcNAc in mature and immature oocytes revealed a constant pool of the nucleotide sugar. Finally, we observed that cyclin B2, the regulatory subunit of the MPF, and the Erk2 MAP-kinase were O-GlcNAc modified. Present work underlines a crucial role for O-GlcNAc in G2/M transition and strongly suggest that its function is required for cell cycle regulation.

*Initiation of progression through the G2/M checkpoint is regulated by the mobilization of numerous transduction factors, as well by the modulation of their respective activities. Progression through the cell cycle M-phase is also regulated at the metaphase-anaphase transition. Studies in amphibian *Xenopus laevis* oocyte have greatly contribute to the knowledge of the biochemical activities of the key regulatory molecules involved in these processes (1). Immature vertebrates oocytes, arrested at prophase I of meiosis, resume their cell cycle, also called maturation, in response to hormonal stimulation (2, 3). The meiotic cell cycle is characterized by the migration 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), followed by diakinesis and spindle*

morphogenesis. Moving of the GV and anchoring of the spindle at the cortex create the appearance of a white spot (WS) at the oocyte apex. 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 (4).

Meiosis entry, analogous to G2/M transition, or M-phase entry is promoted by a cytoplasmic factor called MPF (M-Phase Promoting Factor). MPF has been demonstrated to be the universal regulator of entry into mitosis and meiosis. MPF is made up of a catalytic subunit, Cdk1 (also called cdc2) and a regulatory subunit, Cyclin B. Activation of this Cyclin-Cdk complex is controlled by phosphorylation and proteolysis (for review see 5, 6). Association between regulatory subunit and Cdk1 requires phosphorylation of Cdk1 on residue Thr161 by Cdk Activating kinase (CAK) (7). Then, to be catalytically active, Cdk1 is dephosphorylated on Thr14 and Tyr15 by Cdc25, a dual specific phosphatase (7, 8). Simultaneously to Cdk1 dephosphorylation, Cyclin B is phosphorylated (9). *Xenopus* immature oocytes, which are synchronised at diplotene stage of first meiosis, contain large amount of inactive MPF, or preMPF (5, 6). Inhibition of preMPF is provided by Myt1 that phosphorylates Cdk1 on Thr14 and Tyr15 and then inactivates the

complex. PreMPF can be directly activated by Cdc25 injection (10) or by an auto-amplification loop. The auto-amplification loop is triggered by MPF contained in cytoplasm from eggs or metaphase II arrested oocytes (11). This loop does not depend upon protein synthesis (12) and involves MPF ability to phosphorylate and activate Cdc25 (13, 14).

Simultaneously to MPF activation, Erk-like Xp42^{Mpk1} (Extracellular Regulated Kinase) is phosphorylated and activated (15). Xp42^{Mpk1} belongs to the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway that is turned on by Mos oncoprotein synthesis in response to progesterone stimulation (16). Once activated, Xp42^{Mpk1} phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (p90^{Rsk}), which negatively regulates Myt1 (17). Activation of Mos-Xp42^{Mpk1} pathway has been shown not to be required for MPF activation but for timely M-phase entry when oocytes are stimulated either by progesterone or insulin (18-20). Nevertheless, this pathway has been shown to be responsible for S-Phase suppression between metaphase I and metaphase II, for arrest at metaphase II and spindle morphogenesis (19, 21-23).

Mitogenic signals orchestrate a regulatory network of proteins mainly through post-translational modifications. Though phosphorylation is the molecular mechanism associated with the regulation of cell cycle, it is clearly not the only post-

translational mechanism involved in cell cycle progression. Recent observations have suggested that the cytosolic and nuclear-specific *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) could be involved in cell cycle progression (24-26). *O*-GlcNAc is a highly dynamic post-translational modification that may counteract phosphorylation at the same site or at an adjacent site. Two enzymes regulate *O*-GlcNAc versatility (27): the *O*-GlcNAc transferase (OGT) that modifies substrates by transfer of the GlcNAc group from UDP-GlcNAc, and *O*-GlcNAcase that hydrolyses the GlcNAc residue. *O*-GlcNAc affects numerous families of proteins including transcription factors, heat shock proteins, metabolic enzymes, kinases and phosphatases, structural proteins or nuclear pore proteins (For review see 28). Despite the existing myriad of *O*-GlcNAc proteins, the exact function(s) played by this single modification remain to be determined.

Nevertheless, several studies tend to demonstrate that *O*-GlcNAc is tightly linked to cell cycle regulation. First published data on this field reported changes that were observed in *O*-GlcNAc levels when T-lymphocytes were activated with mitogens (29). Using HT29 cells, it has been shown that microtubules destabilization provoked an increase in *O*-GlcNAc on cytokeratins (30). Micro-injection of galactosyltransferase (an

enzyme that caps *O*-GlcNAc residues) inhibited *Xenopus* oocytes M-phase entry and blocked S to M-phase transition (31). We previously reported that the G2 to M-phase transition was accompanied with a noticeable increase in *O*-GlcNAc glycosylation (24). Lastly, PUGNAC was used to inhibit *O*-GlcNAcase on cultured-cells: such treated cells progressed through the cell cycle more slowly than untreated cells (26). This delay was more pronounced during the S-phase progression and at the G2/M boundary. By contrast, inhibition of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) with DON (6-diazo-5-oxo-norleucine), resulting in low *O*-GlcNAc level, shortened S-phase and G2/M progression. In return, GFAT inhibition delayed G1 progression in comparison with controls or PUGNAC-treated cells. Taken together, these data demonstrate that *O*-GlcNAc dynamic is a key-regulatory post-translational modification in cell cycle progression. Main regulators of cell cycle may be *O*-GlcNAc modified and glycosylation, presumably in competition with phosphorylation, might act as an ON/OFF switch for their activities.

The present study stressed out a role for *O*-GlcNAc glycosylation as a key regulator mechanism for progression from G2-arrest to M-phase in *Xenopus* oocyte, through the regulation of both MPF and MAPK pathways.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Handling of oocytes

Adults *Xenopus* females were purchased from University of Rennes I, France. After anesthetizing females by immersion in 1 g.L⁻¹ 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-NaOH, pH 7.5). Fully-grown stage VI oocytes were isolated and follicles were partially removed by collagenase treatment for 30 min (1 mg.mL⁻¹ collagenase A, Roche Applied Science) followed by manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until experiments.

Stimulation and analysis of G2/M transition (meiotic resumption) in Xenopus oocytes.

Meiotic resumption was induced by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 µM of progesterone (Sigma) or by cytoplasm microinjection. Briefly, cytoplasm of matured oocytes was collected and microinjected in immature oocytes (50 nL per oocyte) using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo). GVBD was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte and confirmed by hemisection of oocyte after heat fixation

(100°C, 5 min). Alternatively, oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated and embedded in paraffin for cytological studies. Sections (7 µm) were stained with nuclear red for the detection of nuclei and chromosomes whereas picro-indigocarmine was used to reveal cytoplasmic structures (23).

Oocytes treatments

All the reagents were purchased from Sigma. Before stimulation of meiotic resumption, oocytes (15-20 per condition) were incubated overnight with concentration ranging from 1 to 5 mM alloxan, 5 mM uracil, 40-80 U catalase, 150 U superoxide dismutase (SOD), or hydrogen peroxide (concentration ranging from 0.1 to 5 mM). For GFAT inhibition experiments, 100 µM 6-diazo-5-oxo-norleucine (DON) or 20 µM azaserine were directly injected into oocytes before progesterone treatment. 5-10 oocytes were taken off at the end of the maturation, respecting the ratio of the white spot and conserved at -20°C until biochemical analysis.

Enrichment of O-GlcNAc-bearing proteins with WGA immobilized on agarose beads

For the maturation kinetic, appearance of white spots was scored every 2 hours. Batches of 20 oocytes were taken off at each time point and lysed in 100 µL of

homogenization buffer (60 mM β-glycerophosphate, 15 mM paranitrophenylphosphate, 25 mM MOPS, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and proteases inhibitors, pH 7.2). After centrifugation at 20000 g, supernatants were collected and diluted with phosphate-buffered saline (PBS). Then, samples were incubated for 90 min at 4°C with 50 µl WGA-agarose beads (Sigma). Proteins bound to WGA-beads were collected by centrifugation, washed four times with PBS, resuspended in 50 µL of Laemmli buffer and boiled for 10 min.

SDS-PAGE and Western Blotting

Proteins (the equivalent of one oocyte was loaded per lane) were run on a 10% SDS-PAGE for O-GlcNAc, phospho-p42/44 MAPK and β-catenin immunodetection or on a 17.5% modified SDS-PAGE (20, 32) for phospho-Tyr15-cdc2, cyclin B2 and p90^{rsk} immunodetection (this reticulation allows a better discrimination between active and inactive forms of these proteins) and electroblotted onto nitrocellulose sheet. Transfer efficiency was checked using Ponceau red staining. Blots were saturated in 5% (w/v) milk in TBS (Tris-buffered saline)-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL2, Affinity

Bioreagents), mouse monoclonal anti-Erk2(D-2, Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-phospho-p42/44 MAPK (Cell signaling), rabbit polyclonal anti- β -catenin (H102, Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-cyclin B2 (JG103, a gift of Dr. J. Gannon, ICRF, South Mimms, United Kingdom) and rabbit polyclonal anti-p90^{rsk} (C21, Santa Cruz biotechnologies) were used at a dilution of 1:1,000. Rabbit polyclonal anti-phospho-Tyr15-cdc2 (Cell signaling) antibodies were used at a dilution of 1:750. Then membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween and incubated with either an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (GE Healthcare) at a dilution of 1:10,000 for β -catenin, Erk2 and phospho-p42/44 MAPK detection, at a dilution of 1:5,000 for cyclin B2, p90^{rsk} and phospho-Tyr15-cdc2 detection. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

UDP-GlcNAc pools measurement by HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography)

Ten oocytes were lysed in 1 mL of hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM

MgCl₂ and proteases inhibitors, pH 7.2). 50 μ L of 1M HCl was added to the lysate for acidification. The solution was passed through a column containing 1.5 mL of Dowex 50WX2-400 in its H⁺ form. Washes of the column were performed with 10 mL of bi-permuted water (18 mega-ohms water). The unbound fraction and washes were collected on ice and adjusted with 500 μ L of Tris/HCl to pH 8.0. 250 μ L of the diluted fraction was injected using a ProPAC-PA1 column (4X250 mm) on a Dionex HPLC (High Performance Liquid Chromatography) system. The elution program analysis was the following: Tris/HCl 20 mM, pH 9.2 (solution A) for 1 minute; elution gradient for 29 min with 85% of A and 15 % NaCl at 2M (solution B); plateau of 5 min in the same conditions; elution gradient of 10 min until 100% of B was reached; plateau at 100% of B for 5 min. The column was then re-equilibrated in 100 % of A. The flow rate was of 1 mL.min⁻¹. Detection was performed using a Spectroflow 757 (KRATOS) at a wavelength of 256 nm.

RESULTS

The OGT inhibitor alloxan blocks O-GlcNAc increase and progesterone-induced G2/M transition.

Alloxan (ALX), an uracil analogue, is a inhibitor of OGT, the enzyme which

transfers GlcNAc group to substrates from UDP-GlcNAc (34, 35). Oocytes were incubated with progesterone to trigger G2/M transition, together with increasing amounts of alloxan (Fig. 1). A dose-dependent inhibition of GVBD and G2/M transition was observed when oocyte were treated with alloxan (Fig. 1A). Used as a negative control, uracil had no effect on meiosis resumption induced by hormonal stimulation (third lane). Significant inhibitory effect of alloxan was observed for concentrations ranging from 3 to 5 mM while lower doses (1 and 2 mM) had none or little effect on G2/M transition. Prevention of M-phase provoked by alloxan appeared to be correlated with an *O*-GlcNAc level decrease : *O*-GlcNAc progressively decreased from the 3 mM to 5 mM alloxan-treated oocytes to finally reach an *O*-GlcNAc pattern similar to that of immature oocytes (G2 phase). At the biochemical level, oocytes treated with alloxan concentrations ranging from 3 to 5 mM never exhibited typical pattern of M-phase entered oocytes (Fig. 1B). Rsk, whose phosphorylation directly depends upon MAPK activity, remained unphosphorylated, when phosphorylated a shift in electrophoretic mobility occurs; Cyclin B2 remained unphosphorylated (detected as a doublet of isoforms) and Cdc2 phosphorylation on Tyr15 confirmed that MPF heterodimer was under an inactive form in these oocytes (compare

first [G2-arrested oocytes], second [progesterone-treated oocytes] and last lanes [alloxan 5mM + progesterone-treated oocytes]). At the cytological level, high concentrations of alloxan prevented meiotic spindle formation, as attested by the presence of intact germinal vesicle envelope (Fig. 2C). Meiotic spindles detected were similar in oocytes treated with uracil (Fig. 2D) to those examined in control mature oocytes (Fig. 2B) .

Accumulation of beta-catenin was also examined as a marker of the meiotic process. Beta-catenin accumulates during G2/M transition due to inhibition of GSK-3 β that phosphorylates beta-catenin, leading to its degradation (35). In a previous work, we reported that beta-catenin *O*-GlcNAc content was enhanced after progesterone stimulation (24). As expected, beta-catenin was easily detected in oocytes incubated solely with progesterone or with low concentrations of alloxan (1 and 2 mM). Expression of beta-catenin was dramatically reduced when alloxan was used at higher concentrations (Fig. 1B, bottom panel).

To check for the non-toxicity and reversibility of alloxan effect, oocytes that were incubated with the OGT inhibitor (5 mM) were rinsed after overnight treatment and were allowed to reach the G2/M transition in alloxan-free ND96 medium (Fig. 3) : in these conditions, about half of

rinsed oocytes exhibited GVBD ($50 \pm 10\%$).

M-Phase entry inhibition induced by alloxan does not depend upon reactive oxygen species formation.

Free radicals have been reported to possibly control cell cycle, in particular through Cdc25 regulation (36). When in solution, alloxan is in equilibrium with its reduction product, dialuric acid, which generates superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) through a redox cycle (For review see 37). These superoxide radicals are used by superoxide dismutase (SOD) to generate hydrogen peroxide (H_2O_2). Within cells, hydrogen peroxide molecules sustain the Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} ions and are then splinted into two hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$).

To counteract potentially alloxan-mediated ROS (Reactive Oxygen Species) generation, alloxan-treated oocytes were incubated with SOD and catalase (that produces H_2O and $\frac{1}{2} O_2$ from H_2O_2) either one hour prior progesterone addition (Fig. 4, lanes 4 and 6) or overnight prior progesterone addition (Fig. 4, lanes 8 and 10). In these conditions, the presence of the two detoxifying enzymes did not prevent the action of alloxan at concentrations ranging from 3 to 5 mM: (1) GVBD did not occurred following progesterone stimulation (Fig. 4A), (2) *O*-

GlcNAc levels did not increased, (3) Rsk, MAPK and Cyclin B2 phosphorylation patterns, as well as beta-catenin accumulation profile, were typical of oocytes arrested in G2 (Fig. 4B).

Finally, oocytes were also incubated in increasing concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2 , concentrations ranging from 0.1 to 5 mM). While losing their pigmentation for 3, 4 and 5 mM H_2O_2 , oocytes nevertheless underwent GVBD, as attested by hemisection along the animal-vegetal axis after heat-fixation (Fig. 5A and data not shown). Thus, G2/M progression was not impaired by H_2O_2 . Staining with anti-*O*-GlcNAc, anti-Rsk1, anti-phospho-MAPK, anti-cyclinB2, anti-P-Tyr15-Cdc2 and anti-beta-catenin attested that oocytes incubation with hydrogen peroxide did not prevent progesterone-induced G2/M transition (Fig. 5B).

Alloxan blocks O-GlcNAc glycosylation and G2/M transition induced by egg cytoplasm injection.

G2/M transition induced by progesterone depends upon protein synthesis. But, when metaphase II-arrested oocyte (or egg) cytoplasm is injected into immature recipient oocytes, it triggers G2/M transition through the MPF auto-amplification loop, independently of protein synthesis (12). In comparison to progesterone-treated oocytes, cytoplasm-injected oocytes exhibited no decrease in

O-GlcNAc content following 3 mM alloxan incubation (Fig. 6B, top panel). Correlatively, they exhibited typical pattern of phosphorylation/dephosphorylation and beta-catenin accumulation similar to those of M-Phase oocytes (Fig. 6B): (1) Cdk 1 Tyr15 was dephosphorylated, (2) Rsk, and Cyclin B2 were phosphorylated and (3) beta-catenin was accumulated in identical proportion to the cytoplasm-injected control oocyte alone. Complete inhibition for GVBD and activation of both MPF and MAPK pathways were obtained for 4 and 5 mM concentration (Fig. 6A and B). Then, alloxan similarly blocks GVBD, MAPK and MPF pathways activations in progesterone-treated oocytes and in cytoplasm injected oocytes.

GFAT inhibition fails to prevent M-phase entry in *Xenopus* oocytes.

In somatic cells, UDP-GlcNAc pool directly depends upon glucose concentration (28, 38). UDP-GlcNAc is generated through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). HBP is finely regulated by a key-enzyme, the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). Inhibition of GFAT leads to a decrease in UDP-GlcNAc pool and consequently to a decrease in *O*-GlcNAc glycosylation. In somatic cells, such effect may be obtained using well-known GFAT inhibitors, DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine) and azaserine. Both were used in an attempt to prevent G2/M

transition induced by progesterone in *Xenopus* oocytes. When injected in immature oocytes prior to progesterone treatment, DON and azaserine have no incidence on hormonal stimulation-induced M-phase entry (Fig. 7A). No delay in GVBD kinetics was observed between azaserine or DON-injected oocytes to the control ones (water-injected). GVBD₅₀, time required for 50% of oocytes undergone GVBD, was similar to control whatever the conditions used to inhibit GFAT (data not shown). GVBD percentages in oocytes injected either with azaserine or DON exhibited no significant differences with control oocytes (Fig. 7A). At a biochemical level, Cyclin B2, Rsk and MAPK were not phosphorylated in immature G2-blocked oocytes (Fig. 7B). Upon stimulation by progesterone, Cyclin B2, MAPK and Rsk were phosphorylated, and changes in electrophoretic mobility were observed for Cyclin B2 and Rsk (Fig. 7B). In oocytes injected with either azaserine or DON, we observed the typical matured oocytes pattern of phosphorylation and beta-catenin accumulation (Fig. 7B).

GFAT inhibition does not significantly impair *O*-GlcNAc and UDP-GlcNAc content in *Xenopus* oocytes.

Strikingly, neither azaserine nor DON prevented progesterone-induced *O*-GlcNAc levels increase that accompanies M-phase entry (Fig. 7). As mentioned above,

increasing concentrations of azaserine (20, 60, 100 μ M) and DON (100, 300, 500 μ M) were tested but no effect on G2/M transition or *O*-GlcNAc levels were observed (data not shown). To understand these unexpected results, UDP-GlcNAc pool of each condition was assayed using HPAEC (High pH Anion Exchange Chromatography) (Fig. 8): no significant changes in the UDP-GlcNAc pools were observed between the different conditions, even in presence of the GFAT inhibitors. These latter observations suggest that during G2/M transition, oocytes run for *O*-GlcNAc on an existing UDP-GlcNAc pool and did not require UDP-GlcNAc synthesis for the *O*-glycosylation processes.

Cyclin B2 and Erk2 are *O*-GlcNAc modified.

Since MPF is the universal key regulator of M-Phase entry and that MAPK cascade is the main pathway by which maturation process is triggered, we examined the putative glycosylation of cyclin B2 and Erk2 during oocyte maturation. A GVBD kinetic was performed following progesterone stimulation. Every two hours, oocytes were assessed for GVBD percentage and were taken respecting the rate of GVBD/no GVBD (Fig. 9A). *O*-GlcNAc proteins were enriched on WGA-labeled beads. Bound-proteins were separated by SDS-PAGE and blotted using either an

anti-cyclin B2 antibody, or an anti-Erk2 antibody (Fig. 9B). We observed that cyclin B2 was *O*-GlcNAc modified and that the glycosylation affected the two isoforms of the doublet, i.e. the active and the inactive forms of the protein. In contrast, staining of enriched-*O*-GlcNAc proteins with the anti-Erk2 antibody revealed that only the inactive form of Erk2 (lower band stained by the anti-Erk2 on the whole cell lysates) was *O*-GlcNAc glycosylated. Staining of the whole cell lysate with anti-phospho dependent p42/44MAPK showed that the active form of the kinase corresponding to the upper band stained with the non-phospho dependent Erk2. This result demonstrates a reciprocal relationship between *O*-GlcNAc and phosphate on Erk2 correlating with the kinase activity. As a control experiment, treatment of oocytes lysates with PNGase F was performed in order to push back the eventual presence of N-linked oligosaccharides (data not shown).

DISCUSSION

M-phase entry is a particularly delicate step, preparing cells for division and which requests highly organized events at the spatial and temporal levels. These events are mainly driven by post-translational modifications modulating protein expression, activities, or promoting protein degradation. Among these

modifications, phosphorylation and ubiquitination have been extensively studied. The highly dynamic and ubiquitous post-translational modification O-GlcNAc, has been proposed to play a role in cell cycle protein function, thus presumably regulating cell cycle progression (26) and checkpoints. Consistent with previous observations in Xenopus laevis oocytes, which reported an overall increase in O-GlcNAc modification during G2/M transition that characterizes meiosis resumption (24), we show here that O-GlcNAc is clearly requested for M-Phase entry during meiosis in Xenopus oocytes.

Being the most widespread glycosylation type found within the cytosolic and nuclear compartments of eukaryotic cells, O-GlcNAc differentiates from other glycosylation types by its high dynamism. Moreover, O-GlcNAc can compete with phosphorylation either at the same or at an adjacent site. Despite the intensive study and interest devoid to O-GlcNAc, many functions ruled by this glycosylation remain to be elucidated. Taking account of recent observations, which have stressed out an active part exerted by O-GlcNAc in the regulation of cell cycle (24, 26), we explored the effects of preventing the O-GlcNAc dynamism on cell cycle progression by inhibition of OGT, expecting disruption of its progression. We took advantages of the Xenopus oocytes,

where G2/M transition may be triggered either by hormonal stimulation (progesterone) or by cytoplasm injection. In our hands, both were blocked when OGT inhibitor alloxan was added in the medium.

Historically, alloxan was used to induce experimental diabetes in animals (For review see 37). Mechanism by which diabetes is mimicked in animals relates to the production of ROS (Reactive Oxygen Species) such as hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$). Hydroxyl radicals are highly toxic for cells (especially for pancreatic beta-cells) and in conjunction with an increase flux of calcium, they provoke beta-cells death and consequently an inhibition of insulin secretion, leading to diabetes. We tested the hypothesis that ROS released by alloxan could affect G2/M transition in *Xenopus* oocytes. Indeed, ROS-mediated signal transduction pathways are involved in phosphorylation events by activating protein tyrosine kinases and protein serine-threonine kinases through a process known as "receptor transactivation". From instance, ROS inhibits ERK 1/2, JNK and p38MAPK activations induced by angiotensin II and PDGF in fibroblast (39), but ROS could alternatively sustain MAPK activity through the inhibition of MAPK phosphatases, which inactivates MAPK. ROS have been described as potent inhibitors of phosphotyrosine phosphatases, like Cdc25C (40). Thus,

evidences have been accumulated that ROS interfere with cell cycle progression (36, 41). First, and in contrast to our expectations, increasing concentrations of H_2O_2 had no effects on G2/M transition induced by hormonal stimulation: MPF and MAPK are detected under their active forms while beta-catenin accumulated normally in H_2O_2 -treated oocytes. Second, we counteracted potential ROS generation (via the alloxan-dialuric acid redox cycle) by addition of SOD and catalase, two detoxifying enzymes. Whatever the conditions used, i.e. by increasing the two enzymes amounts or by modulating the time period post-progesterone addition, SOD and catalase did not suppress the alloxan-mediated block of G2/M transition. Because both SOD and catalase failed to impair alloxan effects and due to the lack of effect of high concentration of H_2O_2 on meiosis progression it can be assume that alloxan does not act on G2/M transition through ROS generation.

Inhibition of *Xenopus* oocyte G2/M transition (either stimulated by progesterone or by cytoplasm injection) by alloxan, was correlated to a drop in the *O*-GlcNAc level. While the decrease in the *O*-GlcNAc content prevented MPF and MAPK activations, as well as beta-catenin accumulation, these effects appeared to be reversible and non toxic for oocytes since removal of alloxan from medium allowed oocytes still to undergo and

complete G2/M transition in presence of progesterone. In contrast to hormonal stimulation, cytoplasm injection drives M-Phase entry independently of protein synthesis (12). In these conditions, the decrease in *O*-GlcNAc content also lead to the absence of GBVD, MPF and MAPK activations. This last observation demonstrates that *O*-GlcNAc modification is required for the activation of the MPF auto-amplification loop.

An alternative strategy to decrease *O*-GlcNAc content is to target the enzyme responsible for UDP-GlcNAc synthesis, GFAT. Intriguingly, azaserine and DON, both inhibitors of GFAT, had no effects on progesterone-induced GVBD and activation of both MPF and MAPK. Such inefficiency to affect *O*-GlcNAc level might be related to an absence of GFAT activity in M-phase entered oocytes. This hypothesis has been reinforced by UDP-GlcNAc pools assays: there was no difference in the UDP-GlcNAc content between immature and matured oocytes. Then, use of GFAT inhibitors appears not to be a relevant strategy to decrease *O*-GlcNAc content and to study its role in *Xenopus* oocytes. In addition to these observations, it has been known for more than one decade that carbon metabolism in *Xenopus* oocytes is mainly directed to glycogen synthesis rather than to glycolysis (42). From these considerations, it can be assume that in *Xenopus* oocytes, tendency is more toward

glucose storage under its glycogenic form rather than glucose production and consequently to the formation of UDP-GlcNAc for *O*-GlcNAc processes via HBP. Because early cleavages in *Xenopus* embryos rely on the use of amino-acids as its main source of carbon, glycolysis starts only at the onset of gastrulation (43). Taken together, these observations lead to the conclusion that oocytes glycosylate their proteins on an existing UDP-GlcNAc pool in a process that does not need UDP-GlcNAc production.

Further targets and function of *O*-GlcNAc modification remain to be determined during cell cycle. While the involvement of *O*-GlcNAc at the metaphase-anaphase transition may be suspected from Slawson and coworkers' observations (26), here is the first work reporting a direct role for *O*-GlcNAc in M-Phase entry, and *O*-glycosylation of Erk2 and Cyclin B2 might account for unsuspected levels of regulation. If post-translational modifications such as phosphorylation have been described for cyclin B isoforms during G2/M progression, their functions remain unclear except for cyclin B1. The latter can be phosphorylated by MAPK and Polokine, regulating MPF nuclear export but not its enzymatic activity (44). In our hands, Cyclin B2 appeared to be *O*-GlcNAc glycosylated throughout G2 and M phases, because *O*-GlcNAc modification was not

associated with the active or inactive states of the Cyclin B2-Cdk1 complex. Hence, cyclin B2 *O*-glycosylation might be involved in protein-protein interactions between MPF and its substrates or in heterodimer formation. In contrast, Erk2 appeared glycosylated only under its inactive form, the unphosphorylated one, whereas the phosphorylated active form of Erk2 was not detected with *O*-GlcNAc. The latter observation on p42MAPK might be typical of a yin-yang relationship between *O*-GlcNAc and phosphorylation on a kinase (45). Such competition has been already described for different proteins including c-Myc (46) or RNA polymerase II (47, for review see 48). It remains to determine if *O*-GlcNAc sites on p42MAPK are related to activation site of Erk2 by MEK (15) or to domains involved either in substrate recognition or enzymatic activity itself. Though *O*-GlcNAc dynamics of cyclin B2 and Erk2 differed from global *O*-GlcNAc proteins profiles, the latter burst of *O*-GlcNAc reported earlier (24), might mask other types of dynamics. Indeed, cyclin B2 *O*-glycosylation appears constant throughout meiosis while in contrast to the global increase of *O*-GlcNAc level observed around GVBD, removal of Erk2 *O*-GlcNAc coincides with the activation of the kinase at GVBD. The latter observation underlines the complexity of *O*-GlcNAc patterns of modification. It should be also noted also that *O*-GlcNAc level immediately increase

after hormonal stimulation (two hours post-progesterone) indicating that *O*-GlcNAc is necessary for the early steps of the G2/M transition. Because both MAPK activity and cyclin B synthesis are not essential for M-phase entry in *Xenopus* oocytes (19, 20, 23 , 49), mechanisms sensitive to *O*-GlcNAc variation, which are essential for G2/M transition, remain to be elucidated.

As a valuable tool for studying *O*-GlcNAc function in cell cycle, alloxan opened a narrow field of investigation for deciphering the role of *O*-GlcNAc modification at G2/M transition. Further efforts are requested to seek for modification of *O*-GlcNAc content on the key regulators of the cell cycle.

REFERENCES

- 1- Schmitt, A. and Nebreda, A. R. (2002) *J. Cell. Sci.* **115**, 2457-9
- 2- Masui, Y. (1967) *J. Exp. Zool.* **166**, 365-75
- 3- Smith, L.D., Ecker, R.E. and Subtelny, S. (1968) *Dev. Biol.* **17**, 627-43
- 4- Hausen, P. and Riebesell, M. (1991) *The early development of Xenopus laevis. An atlas of histology*. Berlin:Springer-Verlag
- 5- Nurse, P., Masui, Y. and Hartwell, L. (1998) *Nat. Med.* **4**, 1103-6
- 6- Masui, Y. (2001) *Differentiation* **69**, 1-17
- 7- Lorca, T., Labbe, J.C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Le Bouffant, F. and Doree, M. (1992) *EMBO J.* **11**, 2381-90
- 8- Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (1991) *Cell* **64**, 903-14
- 9- Gautier, J. and Maller, J.L. (1991) *EMBO J.* **10**, 177-82
- 10- Rime, H., Huchon, D., De Smedt, V., Thibier, C., Galaktionov, K., Jesus, C. and Ozon, R. (1994) *Biol. Cell.* **82**, 11-22
- 11- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971) *J. Exp. Zool.* **177**, 129-45
- 12- Wasserman, W.J. and Masui, Y. (1975) *Exp. Cell. Res.* **91**, 381-8
- 13- Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E. and Draetta, G. (1993) *EMBO J.* **12**, 53-63
- 14- Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J.P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J.C. and Lamb, N.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5989-6000
- 15- Ferrell, J.E. Jr, Wu, M., Gerhart, J.C. and Martin, G.S. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1965-71
- 16- Sagata, M., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. and Vande Woude, G.F. (1988) *Nature* **335**, 519-25
- 17- Palmer, A., Gavin, A.C. and Nebreda, A.R. (1998) *EMBO J.* **17**, 5037-47
- 18- Fischer, D.L., Brassac, T., Galas, S. and Doree, M. (1999) *Development* **126**, 4537-46
- 19- Dupre, A., Suziedelis, K., Valuckaite, R., de Gunzburg, J., Ozon, R., Jesus, C. and Haccart, O. (2002) *Oncogene* **21**, 6425-33
- 20- Baert, F., Bodart, J.F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A. and Vilain, J.P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49714-20
- 21- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W. and Labbe, J.C. (2001) *Cell* **106**, 83-93
- 22- Bodart, J.F., Gutierrez, D.V., Nebreda, A.R., Buckner, B.D., Reseau, J.R. and Duesbery, N.S. (2002) *Dev. Biol.* **245**, 348-61

- 23- Bodart, J.F., Baert, F.Y., Sellier, C., Duesbery, N.S., Flament, S. and Vilain, J.P. (2005) *Dev. Biol.* **283**, 373-83
- 24- Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J.F., Flament, S., Michalski, J.C. and Vilain, J.P. (2004) *J. Cell. Biochem.* **93**, 999-1010
- 25- Slawson, C., Housley, M.P. and Hart, G.W. (2006) *J. Cell. Biochem.* **97**, 71-83
- 26- Slawson, C., Zachara, N.E., Vosseler, K., Cheung, W.D., Lane, M.D. and Hart, G.W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32944-56
- 27- Iyer, S.P. and Hart, G.W. (2003) *Biochemistry* **42**, 2493-9
- 28- Zachara, N.E. and Hart, G.W. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 13-28
- 29- Kearse, K.P. and Hart, G.W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1701-17
- 30- Haltiwanger, R.S. and Philipsberg, G.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8752-58
- 31- Fang, B. and Miller, M.W. (2001) *Exp. Cell. Res.* **263**, 243-53
- 32- Chesnel, F., Bonnec, G., Tardivel, A. and Boujard, D. (1997) *Dev. Biol.* **188**, 122-33
- 33- Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. and Kudlow, J.E. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **293**, 207-12
- 34- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J.C. and Marchase, R.B. (2006) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40**, 303-12
- 35- Wu, G. and He, X. (2006) *Biochemistry* **45**, 5319-23
- 36- Rudolph, J. (2005) *Antioxid. Redox. Signal* **7**, 761-7
- 37- Szkudelski, T. (2001) *Physiol. Res.* **50**, 536-46
- 38- Wells, L., Vosseler, K. and Hart, G.W. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 222-8
- 39- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F., Levi, R. and Novogrodsky, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7017-20
- 40- Savitsky, P.A. and Finkel, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20535-40
- 41- Cakir, Y. and Ballinger, S.W. (2005) *Antioxid. Redox. Signal* **7**, 726-40
- 42- Dworkin, M.B. and Dworkin-Rastl, E. (1989) *Dev. Biol.* **132**, 512-23
- 43- Dworkin, M.B. and Dworkin-Rastl, E. (1992) *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 354-62
- 44- Walsh, S., Margolis, S.S. and Kornbluth, S. (2003) *Mol. Cancer Res.* **1**, 280-9
- 45- [Park, S.Y.](#), [Ryu, J.](#) and [Lee, W.](#) (2005) *Exp. Mol. Med.* **37**, 20-9
- 46- Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I. and Hart, G.W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19229-35
- 47- Comer, F.I. and Hart, G.W. (2001) *Biochemistry* **40**, 7845-52
- 48- Zachara N.E. and Hart G.W. (2006) *Biochem. Biophys. Acta* [May 6th Epub ahead of print].

49- Hohegger H., Klotzbutcher A., [Kirk J.](#), [Howell M.](#), [le Guellec K.](#), [Fletcher K.](#), [Duncan T.](#), [Sohail M.](#), [Hunt T.](#) (2001) *Development* **128**, 3795-807.

FOOTNOTES

Acknowledgements: We thank the "Centre National de la Recherche Scientifique", the "Association pour la Recherche contre le Cancer" and the "Université des Sciences et Technologie de Lille I". We thank Arlette Lescuyer for technical assistance during this work. We are indebted to Dr. Gannon for the generous gift of anti-cyclin B2 antibodies (JG103). VD is a recipient of a fellowship from the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement".

Abbreviations used in the text: CDC, cell division cycle; CDK1, cyclin dependent kinase 1; DON, 6-diazo-5-oxo-norleucine; ERK, extracellular regulated kinase; GFAT, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; GSK3, glycogen synthase kinase 3; GV, germinal vesicle; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; HPAEC, High pH Anion Exchange Chromatography; MAPK, mitogen activated protein kinase; MPF, M-phase promoting factor; OGT, O-linked N-acetylglucosaminyltransferase; ROS, reactive oxygen species; RSK, ribosomal S6 kinase; SOD, superoxide dismutase.

LEGENDS

Figure 1: *Xenopus* oocyte meiotic resumption is prevented by alloxan, an OGT inhibitor.

Immature oocytes were treated with increasing amounts of alloxan (lanes 4 to 8). M-phase entry was then induced by progesterone treatment.

A- Germinal vesicle breakdown (GVBD) was assessed using white spot examination. Results are from three or four (asterisks) independent experiments.

B- Oocytes were homogenized in lysis buffer and western blot analyses were performed using a panel of antibodies. *O*-GlcNAc content of oocytes was tested using an anti-*O*-GlcNAc-directed antibody (RL2). Activation of Rsk, cdc2 and cyclin B2 was assessed as described under the experimental procedures section. Beta-catenin accumulation was also analyzed. Lane 1 corresponds to immature controls, lane 2 to matured controls and lane 3 to oocytes treated with 5 mM uracil. Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot

Figure 2: Alloxan prevents GVBD.

Oocytes were fixed, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (7 µm) were stained with nuclear red for detecting nuclei and chromosomes whereas picro-indigocarmine was used to reveal cytoplasmic structures.

A- Immature oocyte showing an intact germinal vesicle (GV).

B- Progesterone-treated oocyte (mature oocyte) with a typical metaphase spindle (MS) and the first polar body (PB).

C- Alloxan-treated oocyte showing an immature profile.

D- Uracil-treated oocyte showing a mature profile.

Figure 3: Alloxan effect is reversible and non-toxic.

Immature oocytes were first incubated overnight with 5 mM uracil (URA) or with 5 mM alloxan (ALX) and then meiotic resumption was stimulated (Pg). 16 hours after progesterone addition, alloxan-containing medium was removed (R) and oocytes were incubated in alloxan-free medium containing progesterone. Results are from three independent experiments.

Figure 4: Incubation of antioxidant enzymes does not reverse alloxan effect.

Immature oocytes were treated with different concentrations of alloxan (lanes 3 to 10). To counteract the potentially alloxan-mediated ROS generation, alloxan-treated oocytes were incubated with SOD and catalase either for one hour prior progesterone incubation (lane 4 and 6) or overnight (O/N) prior progesterone incubation (lane 8 and 10). Results are from four independent experiments. Lane 1 and 2 correspond to immature and mature controls respectively.

A- Germinal vesicle breakdown (GVBD) was assessed using white spot examination.

B- Oocytes were homogenized in lysis buffer and western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes, activation of Rsk, cdc2, cyclin B2 and beta-catenin accumulation were assessed as described under the experimental procedures section.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot

Figure 5: Hydrogen peroxide does not prevent *Xenopus* oocyte meiotic resumption.

Immature oocytes were incubated with increasing amounts of hydrogen peroxide (H₂O₂) overnight before progesterone treatment. Results are from four independent experiments.

A- Germinal vesicle breakdown (GVBD) was assessed using white spot examination.

B- Oocytes were homogenized in lysis buffer and western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes, activation of Rsk, cdc2, cyclin B2 and beta-catenin accumulation were assessed as described under the experimental procedures section.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot

Figure 6: Alloxan-mediated OGT inhibition also prevents cytoplasm-induced meiotic resumption.

Immature oocytes were incubated with alloxan (ALX) overnight before stimulation of meiotic resumption. Meiotic resumption was induced by injection of matured oocyte-cytoplasm into immature oocyte. Results are from three independent experiments.

A- Germinal vesicle breakdown (GVBD) was assessed using white spot examination.

B- Oocytes were homogenized in lysis buffer and western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes, activation of Rsk, cdc2, cyclin B2 and beta-catenin accumulation were assessed as described under the experimental procedures section.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot

Figure 7: GFAT inhibition does not prevent progesterone-induced meiotic resumption.

Immature oocytes were injected with GFAT inhibitors, 6-diazo-5-oxo-norleucine (DON) or azaserine (AZA) overnight before stimulation of meiotic resumption. Control oocytes were water injected. Results are from six independent experiments.

A- Germinal vesicle breakdown (GVBD) was assessed using white spot examination.

B- Oocytes were homogenized in lysis buffer and western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes, activation of Rsk, cdc2, cyclin B2 and beta-catenin accumulation were assessed as described under the experimental procedures section. Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot

Figure 8: *Xenopus laevis* oocytes UDP-GlcNAc pools are not perturb by GFAT inhibition.

Since GFAT inhibition did not block meiotic resumption contrary to OGT inhibition, UDP-GlcNAc pools of matured, immature and of DON or azaserine-treated oocytes were assayed using HPAEC.

A- Profiles obtained for mature and immature oocytes. UDP-GlcNAc standard profile is shown at the bottom panel.

B- Percentage of UDP-GlcNAc pools obtained for the different conditions compared to the mature oocytes (arbitrary assigned to 100%). Results are from four independent experiments.

Figure 9: cyclin B2 and Erk2 are *O*-GlcNAc modified.

A maturation kinetic was performed on oocytes after progesterone incubation.

A- GVBD percentage was calculated every two hours post-progesterone addition using white spot examination.

B- Batches of oocytes were collected every two hours and lysed in homogenization buffer and enrichments of *O*-GlcNAc proteins on WGA-agarose were performed (see experimental procedures section). Bound proteins were separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose sheet. Western blot analysis of cyclin B2 was performed using an anti-cyclin B2 antibody. Immunodetection of Erk2 was realized either using non-phospho or phospho dependent anti-Erk2 antibodies. Control of enrichment on WGA-beads was performed using the anti-*O*-GlcNAc antibody.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, western blot; GVBD, germinal vesicle breakdown

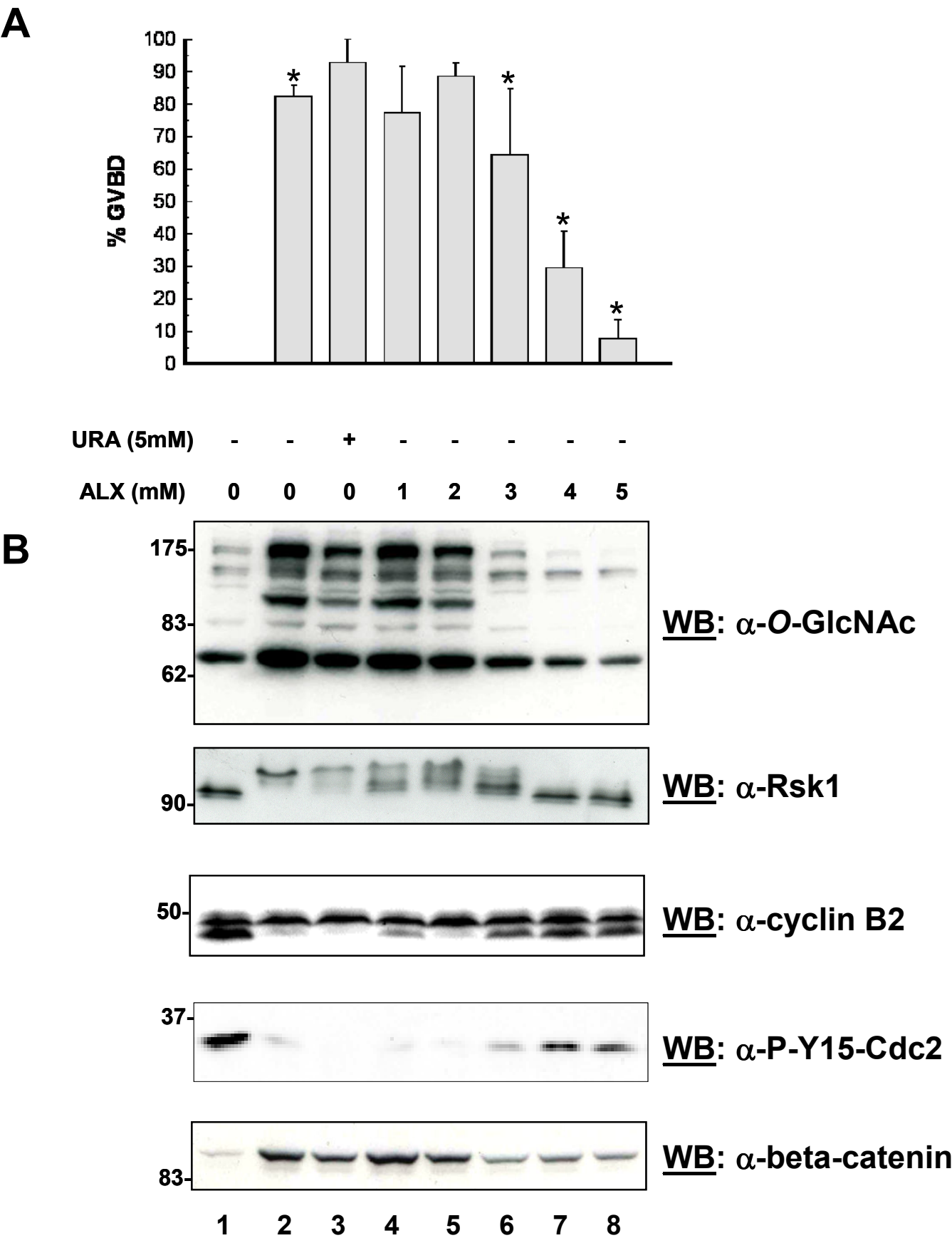


Figure 1

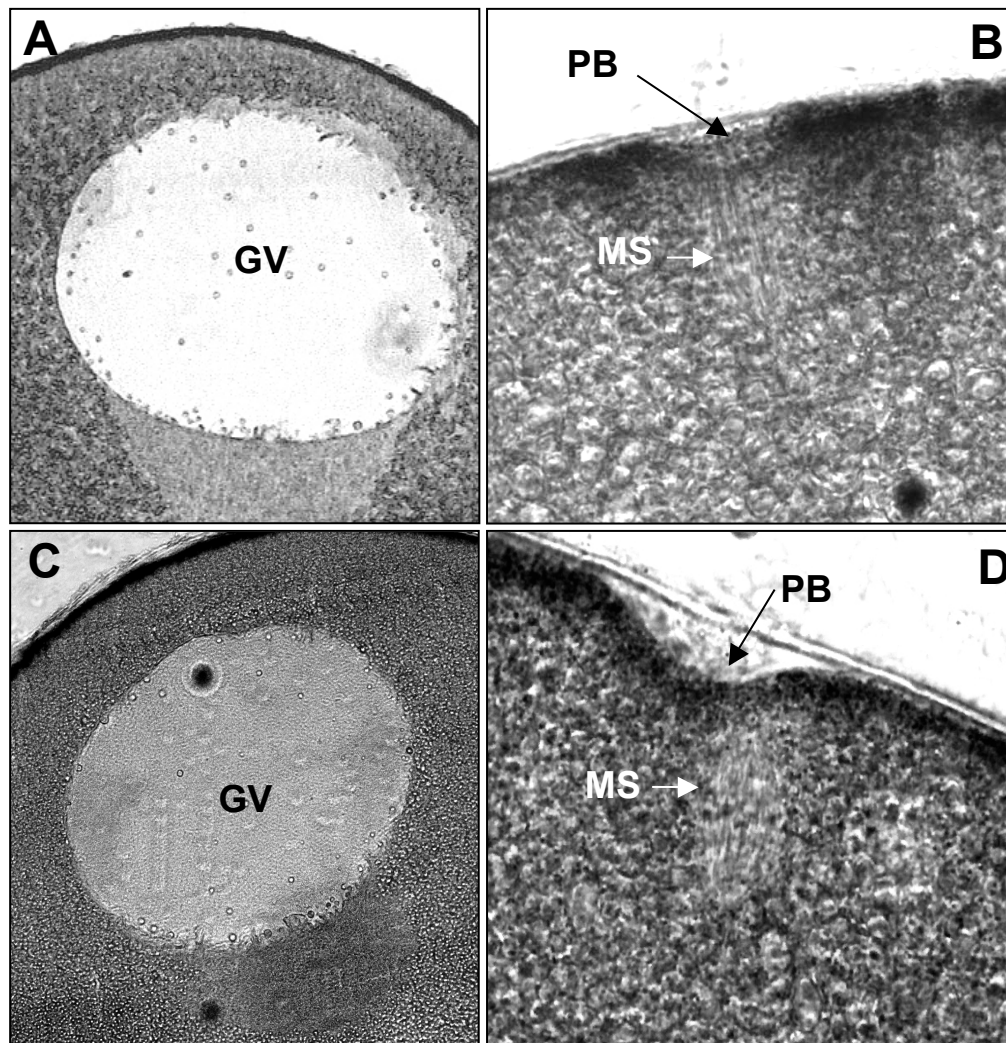
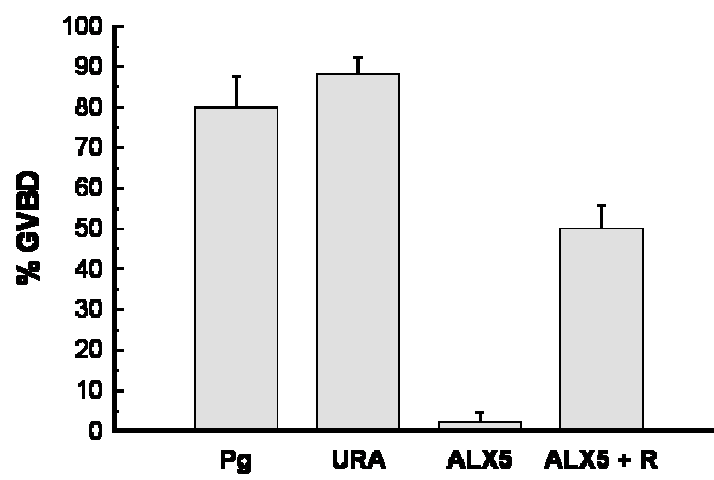
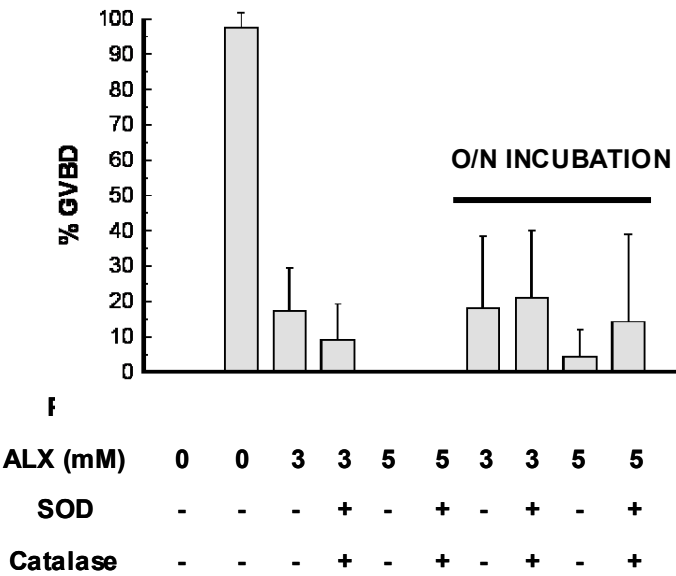


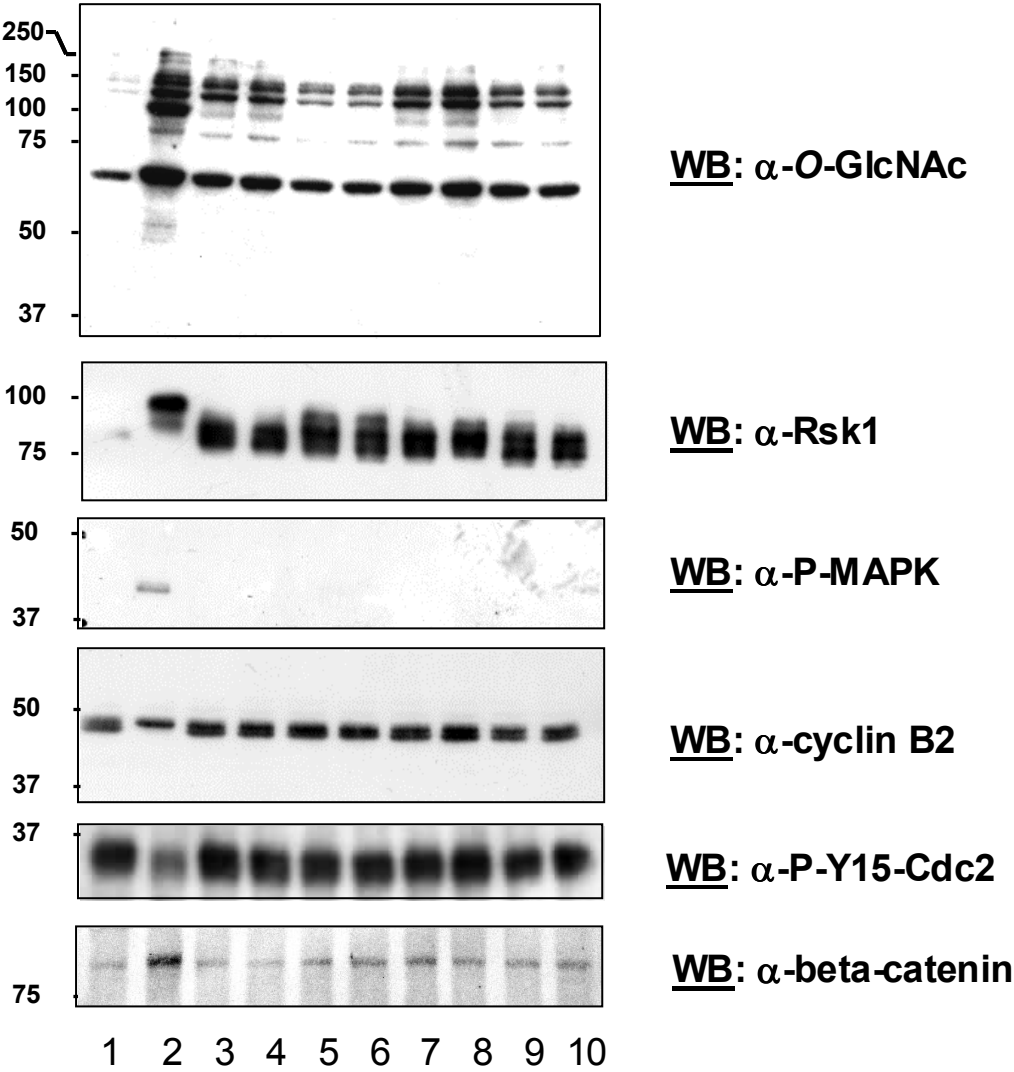
Figure 2

**Figure 3**

A



B



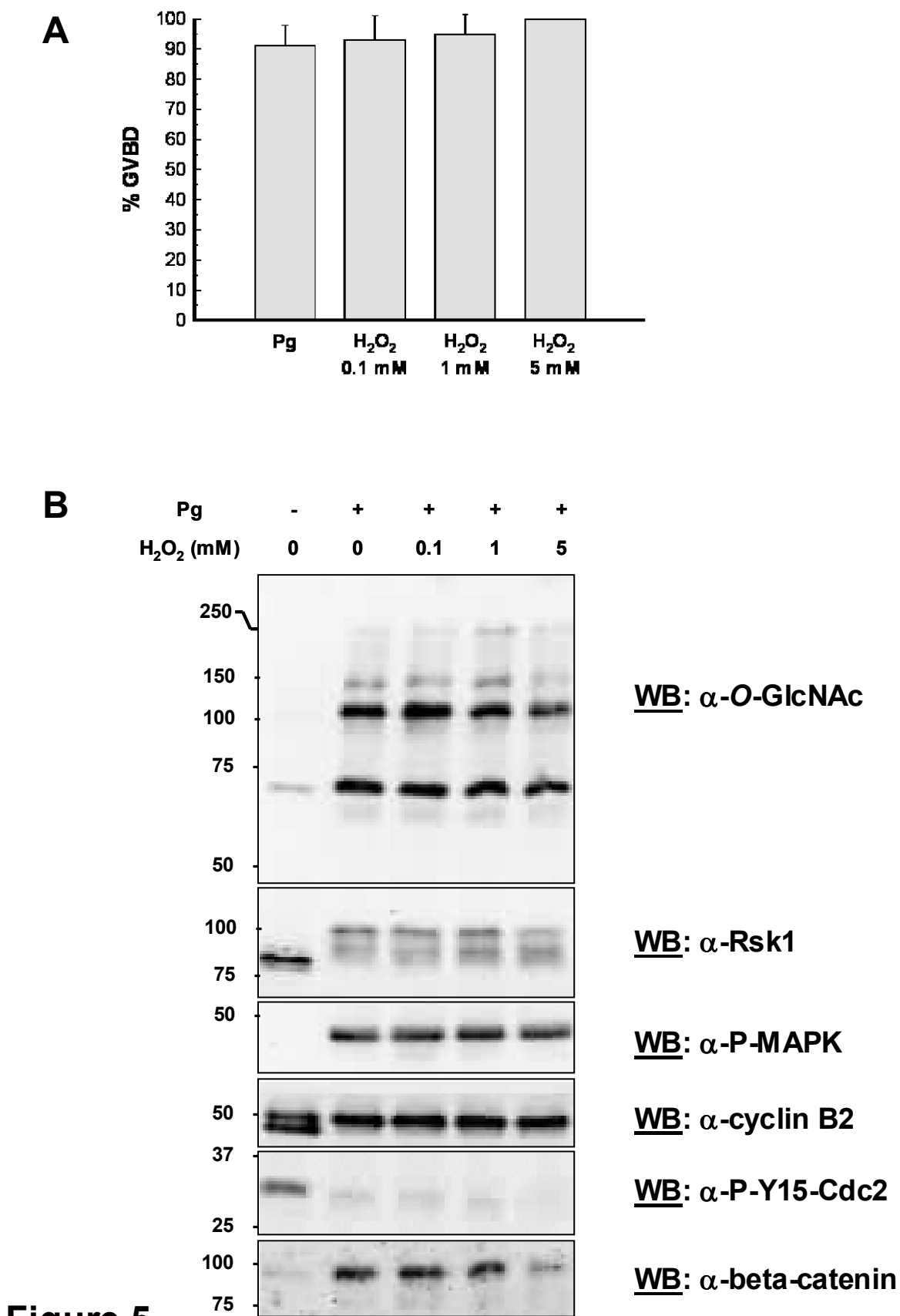
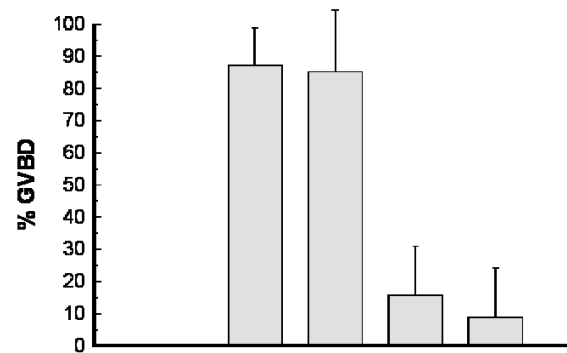
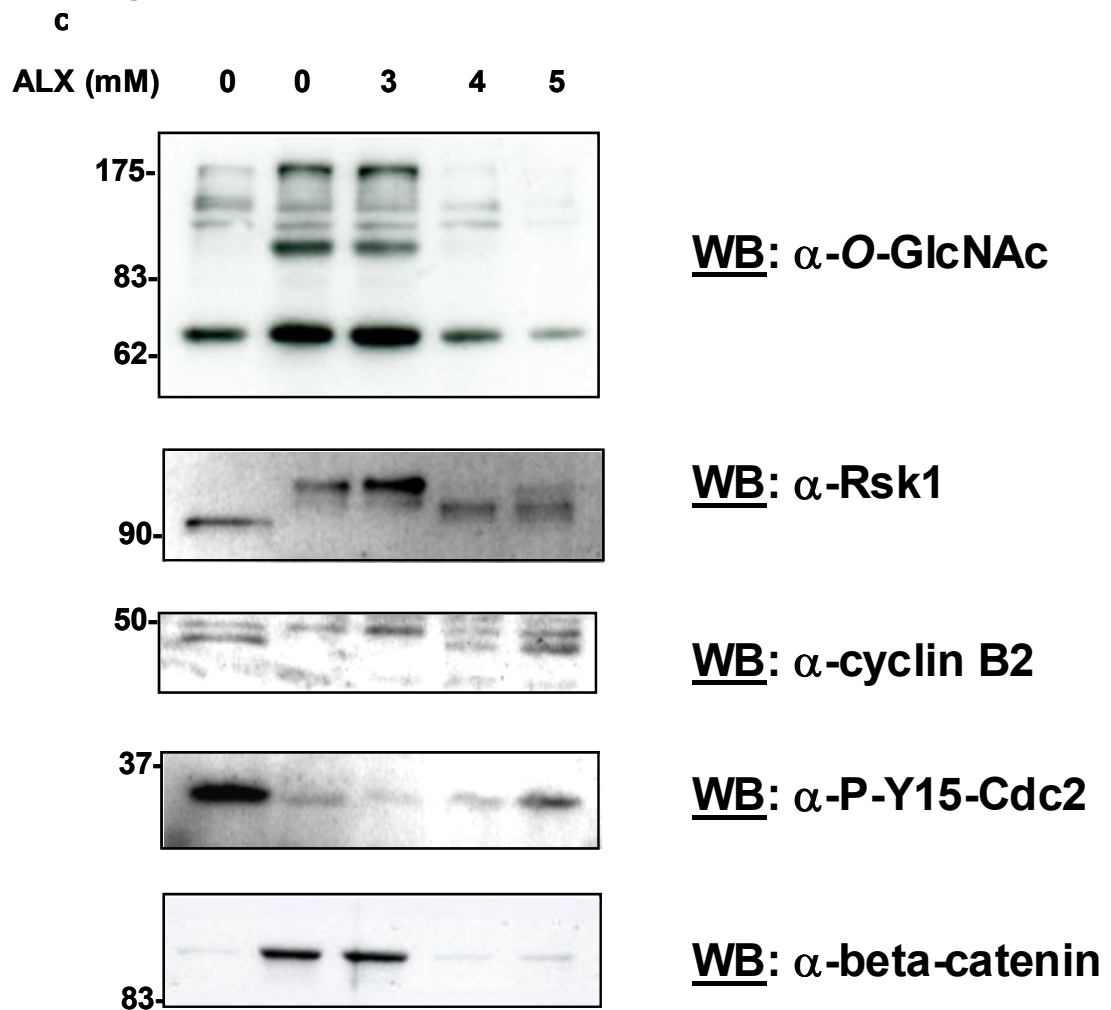
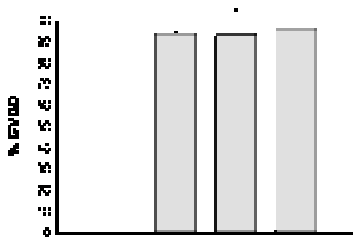


Figure 5

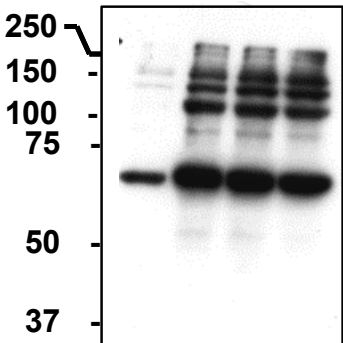
A**B****Figure 6**

A

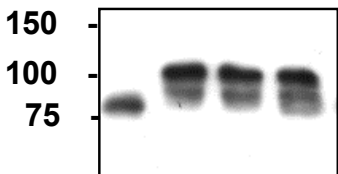


B

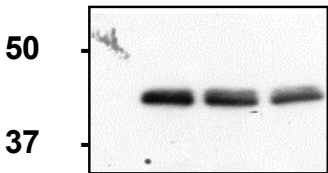
Pg	-	+	+	+
DON (100µM)	-	-	+	-
AZA (20µM)	-	-	-	+



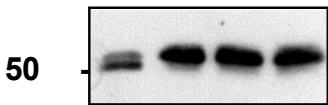
WB: α-O-GlcNAc



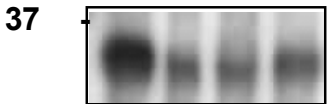
WB: α-Rsk1



WB: α-P-MAPK



WB: α-cyclin B2



WB: α-P-Y15-Cdc2



WB: α-beta-catenin

Figure 7

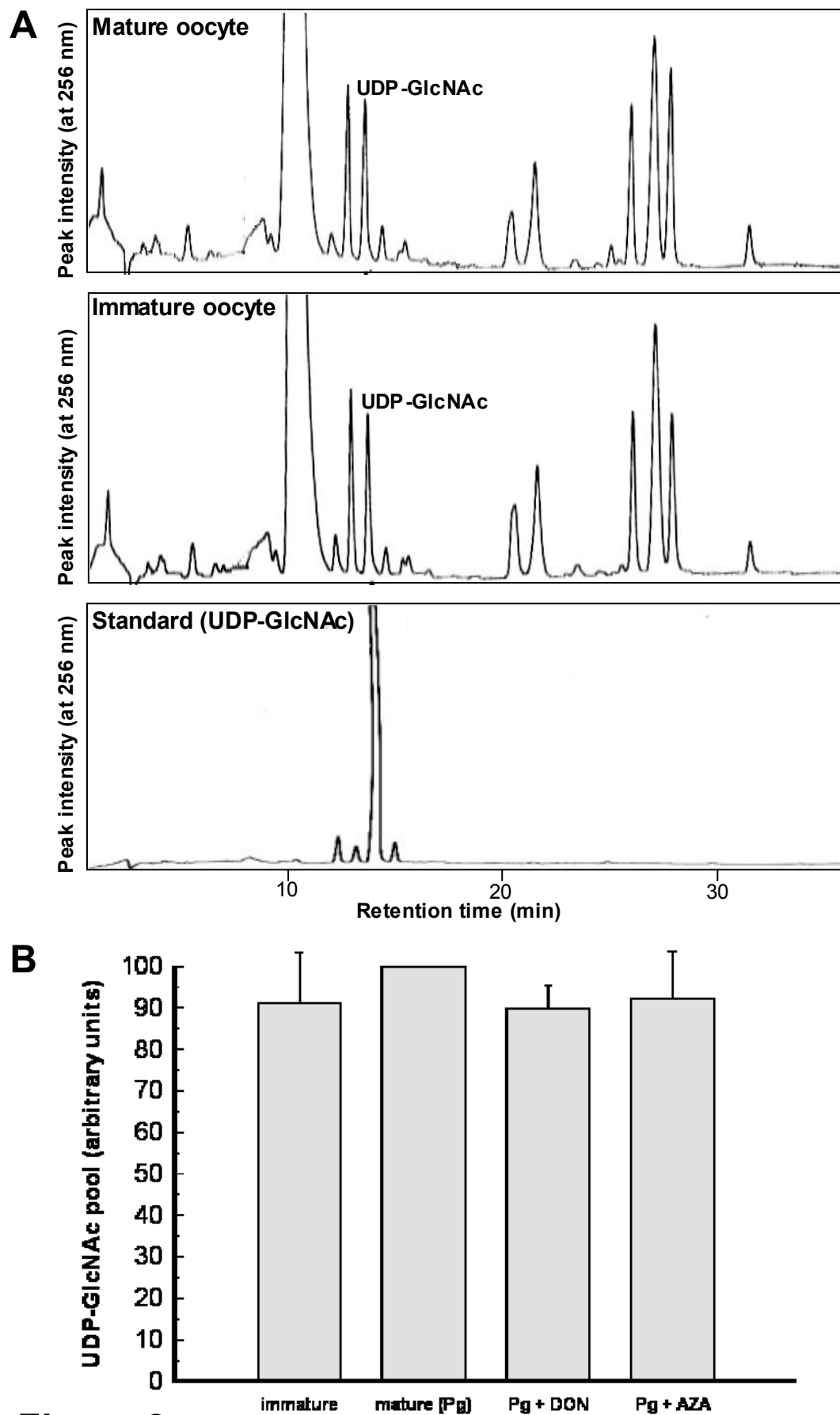
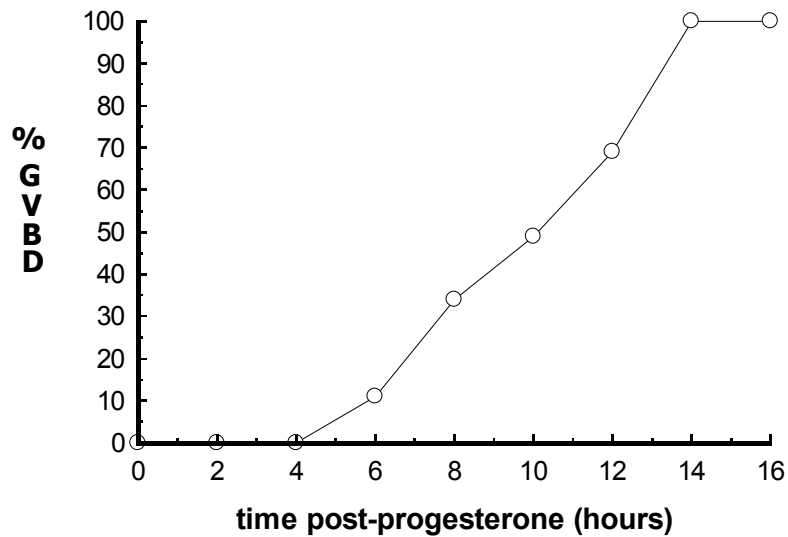
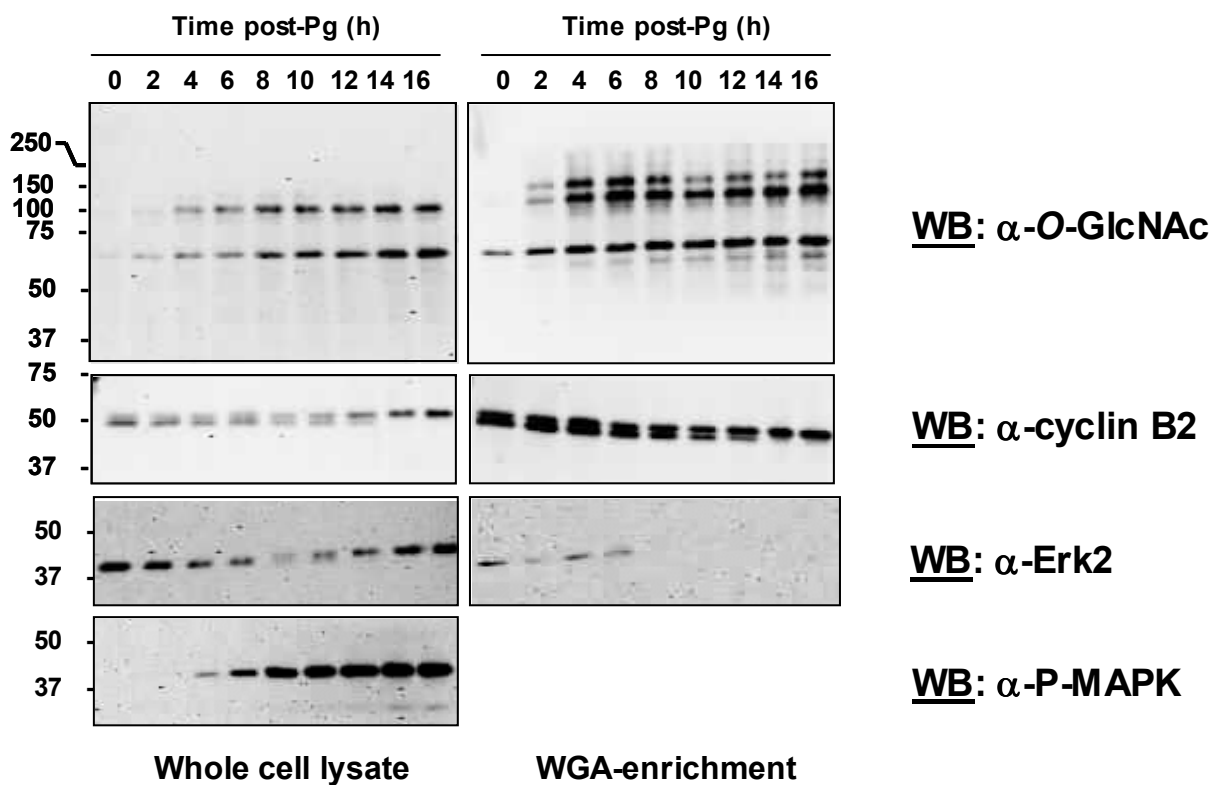


Figure 8

A**B****Figure 9**

ANNEXE II

**Valorisation des compétences –
un nouveau chapitre de la thèse.**

M^{elle} Chantal SELLIER

Ecole doctorale Biologie - Santé de Lille 2

Organisme de rattachement :

**Université des Sciences et Technologies de Lille I – Laboratoire
de Régulation des Signaux de Division.**

Mentor :

M^r François GEUZE

Sujet de thèse :

**Rôle du pH intracellulaire dans l'entrée en phase M des
ovocytes de *Xenopus laevis*.**

Directeur de thèse :

Pr Jean-Pierre VILAIN

Soutenance prévue pour le 21 novembre 2006.



Valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse.

Depuis plusieurs années, le Ministère de l'Education Nationale et les écoles Doctorales ont décidé de rendre les thèses plus professionnalisantes, afin de permettre aux doctorants qui ne peuvent pas ou ne veulent pas continuer dans le domaine de la recherche publique de mieux valoriser leurs travaux vis-à-vis d'un employeur. Il a été mis en place une expérience qui a pour but de faciliter l'insertion professionnelle des doctorants : « valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse ». Les étudiants retenus dans le cadre de ce programme doivent intégrer dans leur mémoire de thèse un nouveau chapitre présentant leurs travaux en tant que projet professionnel.

Cadre et enjeux de ma thèse

La division cellulaire fait l'objet de nombreuses études en raison de son caractère fondamental durant le développement embryonnaire mais aussi pour le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'organisme adulte. La division cellulaire est contrôlée, des anomalies de sa régulation sont impliquées dans les processus de tumorigenèse. A la fin des années 80, il a été démontré que les processus moléculaires fondamentaux régissant la prolifération cellulaire sont communs à toutes les cellules eucaryotes. L'utilisation de modèle comme l'ovocyte de Xénope a largement contribué à la compréhension du contrôle de la division cellulaire. Durant les années 90, de nombreuses études ont souligné que la prolifération cellulaire est modulée par des variations de pH intracellulaire, sans identifier les mécanismes sensibles au pH. Une meilleure compréhension de ces événements qui participent au développement tumoral est un enjeu important afin de lutter contre le cancer et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

Une acidification intracellulaire diminue la prolifération cellulaire et inversement, une alcalinisation intracellulaire accélère la prolifération cellulaire. Le but de ma thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la division cellulaire

sensibles aux variations de pH intracellulaire. Mes recherches ont été effectuées sur l'ovocyte de Xénope. De nature fondamentale, les résultats de mes recherches n'ont pas d'application directes pour les industries pharmaceutiques. Cependant, le sujet de recherche en lui-même était assez original et ambitieux du fait du large spectre des mécanismes qui peuvent être affectés par le pH intracellulaire avec le risque de ne pas identifier une cible précise.

Le sujet de ma thèse s'intègre totalement dans la thématique du laboratoire qui est d'étudier les mécanismes ioniques et moléculaires impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Ce projet de recherche avait déjà été débuté par un membre de l'équipe ainsi qu'une étudiante ayant effectué son DEA dans l'équipe. Je n'ai pas tenu de rôle personnel dans la détermination de mon sujet de thèse qui a été la continuité de mon sujet de DEA.

Le choix du laboratoire s'est fait en fonction de la thématique de recherche et du modèle cellulaire utilisé. La thèse ainsi que le DEA représentaient, avant tout, l'opportunité de travailler sur un sujet qui me passionne, les débouchées professionnelles étant secondaires. A l'issue de mon DEA, bien que n'ayant pas eu de MRT, mes directeurs de DEA m'ont laissé la possibilité de poursuivre en thèse si je le souhaitais. Comme les résultats préliminaires obtenus durant mon DEA étaient prometteurs et que je connaissais déjà le laboratoire ainsi que les techniques utilisées, j'ai choisi de poursuivre en thèse, envisageant un financement par des associations ou des organismes privés.

■ **Déroulement, gestion et coût du projet.**

Les financements qui m'ont permis de mener à bien mon projet ont été, dans un premier temps, des vacations puis un demi-poste d'ATER (Attachée Temporaire d'Etude de Recherche). Le matériel et les différents produits utilisés durant ma thèse ont été financés par des fonds publics (financement par le Ministère de la Recherche et par la région) ainsi que par des fonds privés (La Ligue Contre Le Cancer). Au cours de mes recherches, plusieurs partenaires internationaux et nationaux ont été sollicités afin d'obtenir des anticorps et des oligonucléotides développés par ces équipes :

- Dr N. Duesbery pour les oligonucléotides Morpholino antisens p39^{Mos},
- Dr J. Gannon pour l'anti-corps anti-cycline B2,
- Dr N. Standart pour l'anti-corps anti-CPEB,
- Dr C. Pringent pour l'anti-corps anti-Eg2.

Par ailleurs, mon projet de thèse m'a permis d'effectuer un stage au Etats-Unis dans l'équipe du Dr Duesbery. Ce stage a été financé par la fondation Boehringer Ingelheim ainsi que par l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1.

L'objectif de ma thèse était clair : déterminer les mécanismes qui peuvent être sensibles aux variations de pH intracellulaire. Comme les recherches sur le sujet avaient été initiées avant mon arrivée, mes encadrants savaient que certains mécanismes devaient être tout particulièrement étudiés. Bien que cadré dès le départ sur les deux principales voies moléculaires activées durant la division cellulaire, le sujet laissait une certaine liberté dans l'évolution des recherches en fonction des résultats obtenus. Ainsi, le projet qui était initialement centré sur une étude biochimique des effets des variations du pH intracellulaire lors de l'entrée en phase M a évolué en utilisant une approche électrophysiologique afin d'analyser les effets de variations de pH intracellulaire sur la concentration calcique intracellulaire. Bien que difficile pour moi car n'ayant pas suivi de formation en électrophysiologie au cours de mon cursus universitaire, j'ai dû me familiariser avec cette nouvelle technique.

Au cours de ma thèse, différents types de réunions ont eu lieu :

- des réunions de laboratoire auxquelles toute l'équipe était présente, où j'exposais l'avancement de mes résultats, et qui permettaient d'avoir une discussion avec l'ensemble du laboratoire (peu fréquente),
- des réunions formelles qui réunissaient les personnes impliquées dans le sujet (assez fréquentes) pour faire l'état sur l'avancement des recherches et savoir quelle orientation donner au projet,
- des réunions informelles, plus fréquentes, directement avec mes encadrants afin de discuter des recherches en cours.

Différents types de problèmes ont été rencontrés durant ma thèse. Certains problèmes techniques comme la perte d'habilitation à manipuler de la radioactivité sur le site de Lille 1 a fait que certaines expériences ont du être envisagées différemment. De plus, les nombreux mécanismes affectés par le pH intracellulaire m'ont amené à rechercher et à synthétiser des données bibliographiques sur des sujets variés. J'ai également dû acquérir de nombreuses connaissances en électrophysiologie, domaine qui était totalement nouveau pour moi.

Par ailleurs, la thèse a été pour moi une première expérience de la vie professionnelle et notamment la découverte de tous les problèmes relationnels qui peuvent exister au sein d'une équipe. La co-tutelle et l'intervention d'autres chercheurs dans le projet m'ont placée dans des situations parfois inconfortables, entre des jugements et des avis divergents.

Comme tout thésard, j'ai du faire face à des baisses de motivations dues à:

- des résultats espérés qui n'aboutissent pas ou des problèmes techniques qui retardent l'avancement des recherches,
- des doutes sur mon sujet, des remises en question suite aux rejets des articles ou des demandes de financement,
- des doutes sur mon avenir professionnel.

Trois personnes sont directement associées au projet : le Pr Vilain (directeur de thèse), le Dr Bodart (co-encadrant de la thèse), et moi-même. D'autres personnes sont également associées à ce projet : le Dr Paul Antoine qui m'a encadrée dans la partie électrophysiologique de mon travail et le Dr Cocquerelle qui est intervenu dans l'étude de la polyadénylation des ARNm ainsi que la technicienne du laboratoire Arlette Lescuyer. Nous pouvons également ajouter les personnels administratifs de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1 et de l'école Doctorale de Biologie Santé de Lille II qui sont intervenus plus ou moins directement durant ma thèse à travers la gestion des documents administratifs, des commandes, et l'organisation de conférences.

Ma participation à ce projet constitue bien sûr la principale ressource humaine. Outre mes encadrants de thèse, deux chercheurs ont participé à ce projet pour une durée estimée de 4 mois à temps plein. Une technicienne est également intervenue dans la réalisation de ce projet soit directement ou indirectement, pour une durée estimée de 4 mois (Tableau 1). Une partie du coût financier de ma thèse est consacrée à l'achat des produits consommables et du matériel utilisé (Tableau 2). Le projet n'a pas nécessité d'investissement lourd, les moyens techniques utilisés étant déjà disponibles dans l'équipe. Enfin, le reste du coût financier comprend les frais des formations suivies pendant la thèse (Tableau 3).

Tableau 1 : Coût en ressource humaine de la thèse (salaires estimés d'après le site www.education.gouv.fr)

	Temps estimé	Coût (en euros)
Doctorant	39 mois	16 415
Directeur de thèse	4 mois	17 220
Co-encadrant	8.5 mois	19 406
Autres chercheurs	4 mois	9 132
Technicienne	4 mois	6 248
TOTAL		68 421

Matériel	Coût (en euros)
Consommable	10 000
Gros matériel	1 500
TOTAL	11 500

Tableau 2 : Coût des outils utilisés durant la thèse.

Formation	Coût (en euros)
Bilan de compétence	150
Nouveau chapitre de la thèse	450
Stage aux USA	2 500
Congrès au Luxembourg	400
Réalisation de poster	60
Impression du manuscrit de thèse	1 000
TOTAL	4 560

Tableau 3 : Dépenses associées à la thèse.

Identification et illustration des diverses compétences mises en oeuvre

Les compétences scientifiques développées durant ma thèse concernent essentiellement la biologie cellulaire et moléculaire. Mon sujet a été abordé avec une

approche pluridisciplinaire ce qui m'a permis d'acquérir des compétences techniques dans différents domaines (biochimie, cytologie et électrophysiologie).

Ma thèse m'a permis de découvrir les différents aspects du métier de chercheur, à la fois la partie pratique, à la paillasse, avec tous les problèmes techniques que l'on peut rencontrer mais également la partie plus fondamentale, avec les recherches bibliographiques, la rédaction des articles, les demandes de financement ... J'ai pu développer durant ma thèse différentes compétences associées à la conduite d'un projet de recherche : gestion du temps (respecter des limites dans le temps), gestion financière (choix des outils en fonction de l'argent disponible), rédaction de projet de recherche (demande de financement), recherches bibliographiques (déterminer ce qui est déjà connu et ce qui mérite d'être approfondi) ainsi qu'une capacité d'adaptation me permettant d'utiliser des techniques différentes afin de mener à bien le projet.

Ma façon d'analyser mes résultats a également changé au cours de ma thèse. j'ai appris à évaluer les points les plus pertinents et à rebondir sur les points les plus prometteurs. J'ai également appris à mettre en valeur mes résultats, à les présenter d'une manière plus synthétique et plus compréhensible pour une tierce personne.

Le fait de travailler sur différents projets simultanément m'a obligée à optimiser mon temps en organisant mon travail selon la disponibilité des outils. De plus, j'ai dû développer mon sens de l'organisation pour mener de front mes expérimentations à la paillasse et les enseignements qui m'ont été confiés. J'ai dû acquérir une faculté d'adaptation aux méthodes de travail de chacun des chercheurs qui ont participé au projet ainsi qu'une grande autonomie dans la réalisation de mon projet de recherche. J'ai pu me rendre compte que l'aspect « relationnel » est une composante importante dans la conduite d'un projet de recherche.

Ma thèse m'a permis de développer des compétences dans les savoir-faires administratifs comme la gestion des commandes, l'organisation du transport et la recherche du logement lors de mon stage ou de congrès.

Ma thèse m'a également permis de développer mon sens de la communication lors des différents échanges avec les membres de l'équipe mais aussi avec des chercheurs à l'étranger lors de mon stage aux Etats-Unis ou pendant les conférences. De plus, l'enseignement ainsi que les présentations orales de mes résultats m'ont amené à adapter mon discours en fonction du public concerné.

J'ai développé mes connaissances dans le domaine informatique ainsi qu'en anglais afin de rédiger des articles ou de présenter mes résultats.

Les différents problèmes rencontrés durant ma thèse m'ont amenée à prendre du recul par rapport à mes résultats ainsi qu'à prendre de la distance entre les problèmes rencontrés au laboratoire et ma vie personnelle. Mon travail m'a demandé beaucoup de persévérance et de motivation et j'ai appris à relativiser et à rebondir après un échec.

Résultats, impact de la thèse.

En plus de mon manuscrit de thèse, mon travail a permis de contribuer à l'écriture de plusieurs articles. Sur un plan personnel, ce travail de thèse témoigne de mon aptitude à réaliser un projet avec un budget, un délai et des réponses à apporter à un problème. Par ailleurs, je pense que la thèse m'a permis d'apprendre beaucoup au niveau scientifique mais également au niveau humain. J'ai pu au cours de ma thèse vivre de nombreuses expériences enrichissantes. Le nouveau chapitre de la thèse a été pour moi l'occasion d'aborder ma thèse autrement qu'en terme de résultats scientifiques et de la considérer comme un véritable projet professionnel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~A~

- ABRIEU, A., LORCA, T., LABBE, J. C., MORIN, N., KEYSE, S. ET 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**, 239-46.
- ABRIEU, A., BRASSAC, T., GALAS, S., FISHER, D., LABBE, J. C. ET DOREE, M.** (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* **111**, 1751-7.
- ABRIEU, A., DOREE, M. ET FISHER, D.** (2001). The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* **114**, 257-67.
- ACKERMAN, M. J., WICKMAN, K. D. ET CLAPHAM, D. E.** (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* **103**, 153-79.
- ADACHI, Y., LUKE, M. ET LAEMMLI, U. K.** (1991). Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* **64**, 137-48.
- ADAMCZEWSKI, J. P., ROSSIGNOL, M., TASSAN, J. P., NIGG, E. A., MONCOLLIN, V. ET EGLY, J. M.** (1996). MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *Embo J* **15**, 1877-84.
- ALEXANDRU, G., ZACHARIAE, W., SCHLEIFFER, A. ET NASMYTH, K.** (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J* **18**, 2707-21.
- ALPERN, R. J., STAR, R. ET SELDIN, D. W.** (1988). Hepatic renal interrelations in acid-base regulation. *Am J Physiol* **255**, F807-9.
- ANDERSEN, S. S., ET KARSENTI E.** (1997). XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle. *J Cell Biol* **139**(4): 975-83.
- ANDERSEN, C. B., ROTH, R. A. ET CONTI, M.** (1998). Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **273**, 18705-8.
- 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, C. Y.** (2003). Effect of glucocorticoids on spontaneous and follicle-stimulating hormone induced oocyte maturation in mouse oocytes during culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 423-7.

- ARAKI, K., NAITO, K., HARAGUCHI, S., SUZUKI, R., YOKOYAMA, M., INOUE, M., AIZAWA, S., TOYODA, Y. ET SATO, E.** (1996). Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* **55**, 1315-24.
- ATTAPHITAYA, S., PARK, K. ET MELVIN, J. E.** (1999). Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* **274**, 4383-8.
- AUDET, R. G., GOODCHILD, J. ET RICHTER, J. D.** (1987). Eukaryotic initiation factor 4A stimulates translation in microinjected *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **121**, 58-68.
- AUSTIN, C. ET WRAY, S.** (1995). The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *J Physiol* **488**, 281-91.

~B~

- BAERT, F., BODART J. F., BOCQUET-MUCHEMBLED B., LESCUYER-ROUSSEAU A. ET 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.
- BAGOWSKI, C. P., MYERS, J. W. ET FERRELL, J. E., 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**, 37708-14.
- BAGOWSKI, C. P., XIONG, W. ET FERRELL, J. E., 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**, 1459-65.
- BAI, W. L., SINGH B., KARSHIN L., SHONK A., ARLINGHAUS B.** (1991). Phosphorylation of v-mos Ser 47 by the mitotic form of p34cdc2. *Oncogene* **6**(10): 1715-23.
- BAI, L., COLLINS, J. F., MULLER, Y. L., XU, H., KIELA, P. R. ET GHISHAN, F. K.** (1999). Characterization of cis-elements required for osmotic response of rat Na(+)/H(+) exchanger-2 (NHE-2) gene. *Am J Physiol* **277**, R1112-9.
- BAKER, P. F. ET WARNER, A. E.** (1972). Intracellular calcium and cell cleavage in early embryos of *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* **53**, 579-81.
- BALLANTYNE, S., DANIEL, D. L., JR. ET 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.
- BANDYOPADHYAY, A., BANDYOPADHYAY, J., CHOI, H. H., CHOI, H. S. ET KWON, H. B.** (1998). Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (*Rana dybowskii*) oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol* **109**, 293-301.
- BARBACID, M.** (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**, 779-827.

Références bibliographiques

- BARISH, M. E.** (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol* **342**, 309-25.
- BARKOFF, A. F., DICKSON, K. S., GRAY, N. K. ET WICKENS, M.** (2000). Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol* **220**, 97-109.
- BARRETT, C. B., SCHROETKE, R. M., VAN DER HOORN, F. A., NORDEEN, S. K. ET MALLER, J. L.** (1990). Ha-rasVal-12,Thr-59 activates S6 kinase and p34cdc2 kinase in *Xenopus* oocytes: evidence for c-mosxe-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biol* **10**, 310-5.
- BARTHOLOMEW, C. R., WOO, S. H., CHUNG, Y. S., JONES, C. ET HARDY, C. F.** (2001). Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4949-59.
- BAUD, C. ET BARISH, M. E.** (1984). Changes in membrane hydrogen and sodium conductances during progesterone-induced maturation of *Ambystoma* oocytes. *Dev Biol* **105**, 423-34.
- BAULIEU, E. E., GODEAU, F., SCHORDERET, M. ET SCHORDERET-SLATKINE, S.** (1978). Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature* **275**, 593-8.
- BAYAA, M., BOOTH, R. A., SHENG, Y. ET LIU, X. J.** (2000). The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12607-12.
- BECKER, B. E., ROMNEY, S. J. ET 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.
- BELLE, R., OZON, R. ET STINNAKRE, J.** (1977). Free calcium in full grown *Xenopus laevis* oocyte following treatment with ionophore A 23187 or progesterone. *Mol Cell Endocrinol* **8**, 65-72.
- BELLE, R., MINELLA, O., CORMIER, P., MORALES, J., POULHE, R. ET MULNER-LORILLON, O.** (1995). Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. *Prog Cell Cycle Res* **1**, 265-70.
- BEMENT, W. M. ET CAPCO, D. G.** (1990). Protein kinase C acts downstream of calcium at entry into the first mitotic interphase of *Xenopus laevis*. *Cell Regul* **1**, 315-26.
- BENNING, N., LEIPZIGER, J., GREGER, R. ET NITSCHKE, R.** (1996). Effect of alkalinization of cytosolic pH by amines on intracellular Ca²⁺ activity in HT29 cells. *Pflugers Arch* **432**, 126-33.
- BERRIDGE, M. J.** (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* **17**, 491-500.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. ET LIPP, P.** (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-8.
- BERTRAND, B., WAKABAYASHI, S., IKEDA, T., POUYSSEGUR, J. ET SHIGEKAWA, M.** (1994). The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding

Références bibliographiques

- proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* **269**, 13703-9.
- BEZPROZVANNY, I., WATRAS, J. ET EHRLICH, B. E.** (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**, 751-4.
- BHATT, R. R. ET FERRELL, J. E., JR.** (1999). The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science* **286**, 1362-5.
- BIALOJAN, C. ET TAKAI, A.** (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* **256**, 283-90.
- BIRCHMEIER, C., BROEK, D. ET WIGLER, M.** (1985). ras proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* **43**, 615-21.
- BLONDEAU, J. P. ET BAULIEU, E. E.** (1984). Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* **219**, 785-92.
- BODART, J. F., BECHARD, D., BERTOUT, M., GANNON, J., ROUSSEAU, A., VILAIN, J. P. ET 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., NEBRED, A. R., BUCKNER, B. D., RESAU, J. R. ET DUESBERY, N. S.** (2002). Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev Biol* **245**, 348-61.
- BONDEVA, T., PIROLA, L., BULGARELLI-LEVA, G., RUBIO, I., WETZKER, R. ET WYMAN, M. P.** (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* **282**, 293-6.
- BOOHER, R. N., ALFA, C. E., HYAMS, J. S. ET BEACH, D. H.** (1989). The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* **58**, 485-97.
- BOOHER, R. N., DESHAIES, R. J. ET KIRSCHNER, M. W.** (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J* **12**, 3417-26.
- BOOHER, R. N., HOLMAN, P. S. ET FATTAEY, A.** (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* **272**, 22300-6.
- BORGNE, A., OSTVOLD, A. C., FLAMENT, S. ET MEIJER, L.** (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* **274**, 11977-86.
- BORON, W. F. ET DE WEER, P.** (1976). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* **67**, 91-112.
- BOTH, G. W., BANERJEE, A. K. ET SHATKIN, A. J.** (1975a). Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1189-93.

Références bibliographiques

- BOTH, G. W., FURUICHI, Y., MUTHUKRISHNAN, S. ET SHATKIN, A. J.** (1975b). Ribosome binding to reovirus mRNA in protein synthesis requires 5' terminal 7-methylguanosine. *Cell* **6**, 185-95.
- BORON, W. F. ET BOULPAEP, E. L.** (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J Gen Physiol* **81**, 53-94.
- BOTON, R., DASCAL, N., GILLO, B. ET LASS, Y.** (1989). Two calcium-activated chloride conductances in *Xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J Physiol* **408**, 511-34.
- BOUTROS, R., DOZIER, C. ET DUCOMMUN, B.** (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-91.
- BRANDEIS, M., ROSEWELL, I., CARRINGTON, M., CROMPTON, T., JACOBS, M. A., KIRK, J., GANNON, J. ET HUNT, T.** (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4344-9.
- BRANDIS, J. W. ET RAFF, R. A.** (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. *Nature* **278**, 467-9.
- BRASSARD, M., DUCLOHIER, H., MOREAU, M. ET GUERRIER, P.** (1988). Intracellular pH change does not appear as a prerequisite for triggering activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes. *Gamete Res* **20**, 43-52.
- BRAVO, R., OTERO, C., ALLENDE, C. C. ET ALLENDE, J. E.** (1978). Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1242-6.
- BRIZUELA, L., DRAETTA, G. ET BEACH, D.** (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *Embo J* **6**, 3507-14.
- BROWAEYS-POLY, E., CAILLIAU, K. ET VILAIN, J. P.** (2000). Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. *Eur J Biochem* **267**, 6256-63.
- BROWNE, C. L., WILEY, H. S. ET DUMONT, J. N.** (1979). Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science* **203**, 182-3.
- BUMKE, M. A., NERI, D. ET ELIA, G.** (2003). Modulation of gene expression by extracellular pH variations in human fibroblasts: a transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* **3**, 675-88.
- BURCKHARDT, B. C. ET FROMTER, E.** (1992a). Pathways of NH₃/NH₄⁺ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Arch* **420**, 83-6.
- BURCKHARDT, B. C., KROLL, B. ET FROMTER, E.** (1992b). Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch* **420**, 78-82.

Références bibliographiques

- BURCKHARDT, B. C. ET THELEN, P.** (1995). Effect of primary, secondary and tertiary amines on membrane potential and intracellular pH in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* **429**, 306-12.
- BURCKHARDT, B. C. ET BURCKHARDT, G.** (1997). NH₄⁺ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. I. Basic observations. *Pflugers Arch* **434**, 306-12.
- BURKE, B. ET GERACE, L.** (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**, 639-52.
- BURNS, R. G., ISLAM, K. ET CHAPMAN, R.** (1984). The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2:tubulin interaction. *Eur J Biochem* **141**, 609-15.
- BUSSOLINO, F., WANG, J. M., TURRINI, F., ALESSI, D., GHIGO, D., COSTAMAGNA, C., PESCARONA, G., MANTOVANI, A. ET BOSIA, A.** (1989). Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration. *J Biol Chem* **264**, 18284-7.
- ~C~
- CALLAMARAS, N. ET PARKER, I.** (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in *Xenopus laevis* oocytes: localization and modulation by Ca²⁺. *Cell Calcium* **15**, 66-78.
- CALLAMARAS, N., MARCHANT, J. S., SUN, X. P. ET PARKER, I.** (1998). Activation and coordination of InsP₃-mediated elementary Ca²⁺ events during global Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **509** (Pt 1), 81-91.
- CANTLEY, L. C., AUGER, K. R., CARPENTER, C., DUCKWORTH, B., GRAZIANI, A., KAPPELLER, R. ET SOLTOFF, S.** (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**, 281-302.
- CARNERO, A. ET LACAL, J. C.** (1993). Phospholipase-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: mitogenic activity of generated metabolites. *J Cell Biochem* **52**, 440-8.
- CARNERO, A., DOLFI, F. ET LACAL, J. C.** (1994). ras-p21 activates phospholipase D and A₂, but not phospholipase C or PKC, in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biochem* **54**, 478-86.
- CARNERO, A. ET LACAL, J. C.** (1998). Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway. *FEBS Lett* **422**, 155-9.
- CARROLL, J., SWANN, K., WHITTINGHAM, D. ET WHITAKER, M.** (1994). Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* **120**, 3507-17.
- CASTRO, A., PETER, M., MAGNAGHI-JAULIN, L., VIGNERON, S., GALAS, S., LORCA, T. ET LABBE, J. C.** (2001). Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 2660-71.

Références bibliographiques

- CHARLESWORTH, A., RIDGE, J. A., KING, L. A., MACNICOL, M. C. ET MACNICOL, A. M.** (2002). A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *Embo J* **21**, 2798-806.
- CHEN, M. ET COOPER, J. A.** (1995). Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* **15**, 4727-34.
- CHEN, R. H., WATERS, J. C., SALMON, E. D. ET MURRAY, A. W.** (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAP2 with unattached kinetochores. *Science* **274**, 242-6.
- CHOPRA, A. P., BOONE, S. A., LIANG, X. ET DUESBERY, N. S.** (2003). Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem* **278**, 9402-6.
- CHUANG, L. M., MYERS, M. G., JR., BACKER, J. M., SHOELSON, S. E., WHITE, M. F., BIRNBAUM, M. J. ET KAHN, C. R.** (1993a). Insulin-stimulated oocyte maturation requires insulin receptor substrate 1 and interaction with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 6653-60.
- CHUANG, L. M., MYERS, M. G., JR., SEIDNER, G. A., BIRNBAUM, M. J., WHITE, M. F. ET KAHN, C. R.** (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**, 5172-5.
- CICIRELLI, M. F., ROBINSON, K. R. ET SMITH, L. D.** (1983). Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev Biol* **100**, 133-46.
- CICIRELLI, M. F. ET SMITH, L. D.** (1985). Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **108**, 254-8.
- CICIRELLI, M. F., TONKS, N. K., DILTZ, C. D., WEI, J. E., FISCHER, E. H. ET KREBS, E. G.** (1990). Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5514-8.
- CORK, R. J., CICIRELLI, M. F. ET ROBINSON, K. R.** (1987). A rise in cytosolic calcium is not necessary for maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* **121**, 41-7.
- COSTA, P. F., EMILIO, M. G., FERNANDES, P. L., FERREIRA, H. G. ET FERREIRA, K. G.** (1989). Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol* **413**, 199-211.
- COUGNON, M., BOUYER, P., HULIN, P., ANAGNOSTOPOULOS, T. ET PLANELLES, G.** (1996). Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Arch* **431**, 658-67.
- COUGNON, M., BENAMMOU, S., BROUILLARD, F., HULIN, P. ET PLANELLES, G.** (2002). Effect of reactive oxygen species on NH₄⁺ permeation in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1445-53.
- COUNILLON, L., SCHOLZ, W., LANG, H. J. ET POUYSSEGUR, J.** (1993). Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride

Références bibliographiques

analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol* **44**, 1041-5.

COUNILLON, L. ET POUYSSEGUR, J. (2000). The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers. *J Biol Chem* **275**, 1-4.

COWLEY, S., PATERSON, H., KEMP, P. ET MARSHALL, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**, 841-52.

CRITTENDEN, S. L., ECKMANN, C. R., WANG, L., BERNSTEIN, D. S., WICKENS, M. ET KIMBLE, J. (2003). Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1359-62.

CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M. ET HEMMINGS, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-9.

CROSS, D. A. ET SMYTHE, C. (1998). PD 98059 prevents establishment of the spindle assembly checkpoint and inhibits the G2-M transition in meiotic but not mitotic cell cycles in *Xenopus*. *Exp Cell Res* **241**, 12-22.

CSUTORA, P., SU, Z., KIM, H. Y., BUGRIM, A., CUNNINGHAM, K. W., NUCCITELLI, R., KEIZER, J. E., HANLEY, M. R., BLALOCK, J. E. ET MARCHASE, R. B. (1999). Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 121-6.

CURMI, P. A., NOGUES, C., LACHKAR, S., CARELLE, N., GONTHIER, M. P., SOBEL, A., LIDEREAU, R. ET BIECHE, I. (2000). Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer* **82**, 142-50.

~D~

DAAR, I. O., WHITE, G. A., SCHUH, S. M., FERRIS, D. K. ET VANDE WOUDE, G. F. (1991). tpr-met oncogene product induces maturation-producing factor activation in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **11**, 5985-91.

DAAR, I., YEW, N., VANDE WOUDE, G. F. (1993) Inhibition of mos-induced oocyte maturation by protein kinase A. *J Cell Biol.* **120**, 1197-202.

DANTHULURI, N. R., KIM, D. ET BROCK, T. A. (1990). Intracellular alkalinization leads to Ca²⁺ mobilization from agonist-sensitive pools in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 19071-6.

DASCAL, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 317-87.

DAVIS, D. ET SADLER, S. E. (1992). Analysis of the p21 ras system during development of meiotic competence in *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* **149**, 1-7.

DAWSON, S. P., KEIZER, J. ET PEARSON, J. E. (1999). Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6060-3.

Références bibliographiques

- DE BOND, H. L., ROSENBLATT, J., JANCARIK, J., JONES, H. D., MORGAN, D. O. ET KIM, S. H.** (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602.
- DE MOOR, C. H. ET RICHTER, J. D.** (1997). The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **17**, 6419-26.
- DE MOOR, C. H. ET RICHTER, J. D.** (2001). Translational control in vertebrate development. *Int Rev Cytol* **203**, 567-608.
- DEGUCHI, R. ET OSANAI, K.** (1994). Meiosis reinitiation from the first prophase is dependent on the levels of intracellular Ca^{2+} and pH in oocytes of the bivalves *Macra chinensis* and *Limaria hakodatensis*. *Dev Biol* **166**, 587-99.
- DEGUCHI, R. ET OSANAI, K.** (1995). Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida*: respective changes in intracellular Ca^{2+} and pH. *Dev Biol* **171**, 483-96.
- DELVAUX, M., BASTIE, M. J., CHENTOUFI, J., CRAGOE, E. J., JR., VAYSSE, N. ET RIBET, A.** (1990). Amiloride and analogues inhibit Na^{+} - H^{+} exchange and cell proliferation in AR42J pancreatic cell line. *Am J Physiol* **259**, G842-9.
- DERUA, R., STEVENS, I., WAELENS, E., FERNANDEZ, A., LAMB, N., MERLEVEDE, W. ET GORIS, J.** (1997). Characterization and physiological importance of a novel cell cycle regulated protein kinase in *Xenopus laevis* oocytes that phosphorylates cyclin B2. *Exp Cell Res* **230**, 310-24.
- DESHPANDE, A. K. ET KUNG, H. F.** (1987). Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. *Mol Cell Biol* **7**, 1285-8.
- DEUTER-REINHARD, M., APELL, G., POT, D., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L. T. ET KAVANAUGH, W. M.** (1997). SIP/SHIP inhibits *Xenopus* oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 2559-65.
- DHANASEKARAN, N., PRASAD, M. V., WADSWORTH, S. J., DERMOTT, J. M. ET VAN ROSSUM, G.** (1994). Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na^{+}/H^{+} exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J Biol Chem* **269**, 11802-6.
- DOMINGUEZ, I., DIAZ-MECO, M.T., MUNICI, M. M., BERRA, E., GARCIA DE HERREROS, A., CORNET, M. E., SANZ, L. ET MOSCAT, J.** (1992). Evidence for a role of protein kinase C zeta subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biol* **12**, 3776-83.
- DOPPLER, W., JAGGI, R. ET GRONER, B.** (1987). Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* **54**, 147-53.
- DOPPLER, W., GRONER, B. ET BALL, R. K.** (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 104-8.
- DOREE, M., MOREAU, M. ET GUERRIER, P.** (1978). Hormonal control of meiosis. In vitro induced release of calcium ions from the plasma membrane in starfish oocytes. *Exp Cell Res* **115**, 251-60.

- DOREE, M. ET HUNT, T.** (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* **115**, 2461-4.
- DRURY, K. C. ET SCHORDERET-SLATKINE, S.** (1975). Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell* **4**, 269-74.
- DUBE, F. ET GUERRIER, P.** (1982). Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm of KCl, but not by NH₄Cl, requires a calcium influx. *Dev Biol* **92**, 408-17.
- DUBE, F. ET EPEL, D.** (1986). The relation between intracellular pH and rate of protein synthesis in sea urchin eggs and the existence of a pH-independent event triggered by ammonia. *Exp Cell Res*. **161**, 191-204.
- DUCKWORTH, B. C., WEAVER, J. S. ET RUDERMAN, J. V.** (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16794-9.
- DUESBERY, N. S. ET MASUI, Y.** (1996). The role of microtubules and inositol triphosphate induced Ca²⁺ release in the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in extracts of *Xenopus laevis* oocytes. *Zygote* **4**, 21-30.
- DUESBERY, N. S., WEBB, C. P., LEPLA, S. H., GORDON, V. M., KLIMPEL, K. R., COPELAND, T. D., AHN, N. G., OSKARSSON, M. K., FUKASAWA, K., PAULL, K. D. ET AL.** (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* **280**, 734-7.
- DUMONT, J. N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**, 153-79.
- DUNPHY, W. G. ET KUMAGAI, A.** (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**, 189-96.
- DUPRE, A., SUZIEDELIS, K., VALUCKAITE, R., DE GUNZBURG, J., OZON, R., JESSUS, C. ET HACCARD, O.** (2002). *Xenopus* H-RasV12 promotes entry into meiotic M phase and cdc2 activation independently of Mos and p42(MAPK). *Oncogene* **21**, 6425-33.

~E~

- EL-ETR, M., SCHORDERET-SLATKINE, S. ET BAULIEU, E. E.** (1979). Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin. *Science* **205**, 1397-9.
- EL-JOUNI, W., JANG, B., HAUN, S. ET MACHACA, K.** (2005). Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* **288**, 514-25.
- ENDICOTT, J. A., NOBLE, M. E. ET TUCKER, J. A.** (1999). Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 738-44.
- EPPIG, J. J. ET DUMONT, J. N.** (1974). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). II. The induction and subcellular localization of tyrosinase activity in developing oocytes. *Dev Biol* **36**, 330-42.

Références bibliographiques

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

ERIKSON, E. ET MALLER, J. L. (1989). In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during *Xenopus* oocyte maturation. *J Biol Chem* **264**, 13711-7.

ERIKSON, E. ET MALLER, J. L. (1991). Purification and characterization of ribosomal protein S6 kinase I from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem* **266**, 5249-55.

ETO, W., HIRANO, K., HIRANO, M., NISHIMURA, J. ET KANAIDE, H. (2003). Intracellular alkalization induces Ca^{2+} influx via non-voltage-operated Ca^{2+} channels in rat aortic smooth muscle cells. *Cell Calcium* **34**, 477-84.

EVANS, T., ROSENTHAL, E. T., YOUNGBLOM, J., DISTEL, D. ET HUNT, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-96.

EVAUL, K., JAMNONGJIT, M., BHAGAVATH, B. ET HAMMES, S. R. (2006). Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane $\text{G}\{\beta\}\{\gamma\}$ -mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors. *Mol Endocrinol*, Epub ahead of print.

EYERS, P. A., LIU, J., HAYASHI, N. R., LEWELLYN, A. L., GAUTIER, J. ET MALLER, J. L. (2005) Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase *J Biol Chem.* **280**, 24339-46.

~F~

FABIAN, J. R., MORRISON, D. K. ET DAAR, I. O. (1993). Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* **122**, 645-52.

FAN, H. Y., TONG, C., LIAN, L., LI, S. W., GAO, W. X., CHENG, Y., CHEN, D. Y., SCHATTEN, H. ET 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.

FANG, G., YU, H. ET KIRSCHNER, M. W. (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**, 1871-83.

FANG, G., YU, H. ET KIRSCHNER, M. W. (1998b). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* **2**, 163-71.

FAROOQ, A., PLOTNIKOVA, O., CHATURVEDI, G., YAN, S., ZENG, L., ZHANG, Q. ET ZHOU, M. M. (2003). Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP. *Structure* **11**, 155-64.

FARUKI, S., DOREE, M. ET KARSENTI, E. (1992). cdc2 kinase-induced destabilization of MAP2-coated microtubules in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* **101 (Pt 1)**, 69-78.

- FEATHERSTONE, C. ET RUSSELL, P.** (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* **349**, 808-11.
- FELLOUS, A., KUBELKA, M., THIBIER, C., TAIEB, F., HACCARD, O. ET JESSUS, C.** (1994). Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Int J Dev Biol* **38**, 651-9.
- FERBY, I., BLAZQUEZ, M., PALMER, A., ERITJA, R. ET NEBRED, A. R.** (1999). A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* **13**, 2177-89.
- FERGUSON, J. E., HAN, J. K., KAO, J. P. ET NUCCITELLI, R.** (1991). The effects of inositol trisphosphates and inositol tetrakisphosphate on Ca²⁺ release and Cl⁻ current pattern in the *Xenopus laevis* oocyte. *Exp Cell Res* **192**, 352-65.
- FERRELL, J. E., JR., WU, M., GERHART, J. C. ET 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.
- FERRELL, J. E., JR.** (1999). *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays* **21**(10): 833-42.
- FESQUET, D., LABBE, J. C., DERANCOURT, J., CAPONY, J. P., GALAS, S., GIRARD, F., LORCA, T., SHUTTLEWORTH, J., DOREE, M. ET CAVADORE, J. C.** (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* **12**, 3111-21.
- FESQUET, D., FITZPATRICK, P. J., JOHNSON, A. L., KRAMER, K. M., TOYN, J. H. ET JOHNSTON, L. H.** (1999). A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *Embo J* **18**, 2424-34.
- FINIDORI-LEPICARD, J., SCHORDERET-SLATKINE, S., HANOUNE, J. ET BAULIEU, E. E.** (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **292**, 255-7.
- FISHER, R. P. ET MORGAN, D. O.** (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**, 713-24.
- FISHER, D. L., BRASSAC, T., GALAS, S. ET DOREE, M.** (1999). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* **126**, 4537-46.
- FISHER, D. L., MANDART, E. ET DOREE, M.** (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *Embo J* **19**, 1516-24.
- FLAMENT, S., BROWAEYS, E., RODEAU, J. L., BERTOUT, M. ET VILAIN, J. P.** (1996). *Xenopus* oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int J Dev Biol* **40**, 471-6.
- FLAMENT, S., BODART J. F., BROWAEYS, E., BERTOUT, M., ROUSSEAU A., GANNON J., ET 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.

Références bibliographiques

- FONTANILLA, R. A. ET NUCCITELLI, R.** (1998). Characterization of the sperm-induced calcium wave in *Xenopus* eggs using confocal microscopy. *Biophys J* **75**, 2079-87.
- FORRISTALL, C., PONDEL, M., CHEN, L. ET KING, M. L.** (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* **121**, 201-8.
- FORTUNE, J. E., CONCANNON, P. W. ET HANSEL, W.** (1975). Ovarian progesterone levels during in vitro oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod* **13**, 561-7.
- FRANK-VAILLANT, M., JESSUS, C., OZON, R., MALLER, J. L. ET HACCARD, O.** (1999). Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in *Xenopus* oocytes in response to progesterone. *Mol Biol Cell* **10**, 3279-88.
- FRANK-VAILLANT, M., HACCARD, O., THIBIER, C., OZON, R., ARLOT-BONNEMAINS, Y., PRIGENT, C. ET JESSUS, C.** (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., HACCARD, O., OZON, R. ET JESSUS, C.** (2001). Interplay between Cdc2 kinase and the c-Mos/MAPK pathway between metaphase I and metaphase II in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*. **231**, 279-88.
- FRASCHINI, R., FORMENTI, E., LUCCHINI, G. ET PIATTI, S.** (1999). Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol* **145**, 979-91.
- FREEMAN, R. S., PICKHAM, K. M., KANKI, J. P., LEE, B. A., PENA, S. V. ET DONOGHUE, D. J.** (1989). *Xenopus* homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5805-9.
- FREEMAN, R. S., MEYER, A. N., LI, J. ET DONOGHUE, D. J.** (1992). Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J Cell Biol* **116**, 725-35.
- FUJIWARA, T., NAKADA, K., SHIRAKAWA, H. ET MIYAZAKI, S.** (1993). Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* **156**, 69-79.
- FURUNO, N., NISHIZAWA, M., OKAZAKI, K., TANAKA, H., IWASHITA, J., NAKAJO, N., OGAWA, Y. ET SAGATA, N.** (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *Embo J* **13**, 2399-410.
- FURUNO, N., KAWASAKI, A. ET SAGATA, N.** (2003). Expression of cell-cycle regulators during *Xenopus* oogenesis. *Gene Expr Patterns* **3**, 165-8.

~G~

GAFFRE, M., DUPRE, A., VALUCKAITE, R., SUZIEDELIS, K., JESSUS, C. ET HACCARD, O. (2006) Deciphering the H-Ras pathway in *Xenopus* oocyte. *Oncogene* **25**, 5155-62.

GALAKTIONOV, K. ET BEACH, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* **67**, 1181-94.

- GALAKTIONOV, K., JESSUS, C. ET BEACH, D.** (1995). Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* **9**, 1046-58.
- GALLO, C. J., HAND, A. R., JONES, T. L. ET JAFFE, L. A.** (1995). Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *J Cell Biol* **130**, 275-84.
- GARCIA DE HERREROS, A., DOMINGUEZ, I., DIAZ-MECO, M. T., GRAZIANI, G., CORNETT, M. E., GUDDAL, P. H., JOHANSEN, T. ET MOSCAT, J.** (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**, 6825-9.
- GARD, D. L.** (1992). Microtubule organization during maturation of *Xenopus* oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev Biol* **151**, 516-30.
- GAUTIER, J., MATSUKAWA, T., NURSE, P. ET MALLER, J.** (1989). Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* **339**, 626-9.
- GAUTIER, J., MINSHULL, J., LOHKA, M., GLOTZER, M., HUNT, T. ET MALLER, J. L.** (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**, 487-94.
- GAUTIER, J. ET MALLER, J. L.** (1991). Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *Embo J* **10**, 177-82.
- GEBAUER, F., XU, W., COOPER, G. M. ET 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.
- GELERSTEIN, S., SHAPIRA, H., DASCAL, N., YEKUEL, R. ET ORON, Y.** (1988). Is a decrease in cyclic AMP a necessary and sufficient signal for maturation of amphibian oocytes? *Dev Biol* **127**, 25-32.
- GILES, N., FORREST, A. ET GABRIELLI, B.** (2003). 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. *J Biol Chem* **278**, 28580-7.
- GOBET, I., LIPPAI, M., TOMKOWIAK, M., DUROCHER, Y., LECLERC, C., MOREAU, M. ET GUERRIER, P.** (1995). 4-aminopyridine acts as a weak base and a Ca²⁺ mobilizing agent in triggering oocyte meiosis reinitiation and activation in the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Int J Dev Biol* **39**, 485-91.
- GODEAU, J. F., SCHORDERET-SLATKINE, S., HUBERT, P. ET BAULIEU, E. E.** (1978). Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2353-7.
- GOODHARDT, M., FERRY, N., BUSCAGLIA, M., BAULIEU, E. E. ET HANOUNE, J.** (1984). Does the guanine nucleotide regulatory protein Ni mediate progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase? *Embo J* **3**, 2653-7.
- GORBSKY, G. J., CHEN, R. H. ET MURRAY, A. W.** (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol* **141**, 1193-205.

- GORIS, J., HERMANN, J., HENDRIX, P., OZON, R. ET MERLEVEDE, W.** (1989). Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* **245**, 91-4.
- GOTOH, Y., MORIYAMA, K., MATSUDA, S., OKUMURA, E., KISHIMOTO, T., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., YAHARA, I., SAKAI, H. ET NISHIDA, E.** (1991). Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *Embo J* **10**, 2661-8.
- GOTOH, Y. ET NISHIDA, E.** (1995). Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol Reprod Dev* **42**, 486-92.
- GOTOH, Y., MASUYAMA, N., DELL, K., SHIRAKABE, K. ET NISHIDA, E.** (1995). Initiation of Xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* **270**, 25898-904.
- GOULD, K. L. ET NURSE, P.** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
- GOULD, M. C. ET STEPHANO, J. L.** (1993). Nuclear and cytoplasmic pH increase at fertilization in *Urechis caupo*. *Dev Biol* **159**, 608-17.
- GOULD, M. C., STEPHANO, J. L., ORTIZ-BARRON, B. J. ET PEREZ-QUEZADA, I.** (2001). Maturation and fertilization in *Lottia gigantea* oocytes: intracellular pH, Ca(2+), and electrophysiology. *J Exp Zool* **290**, 411-20.
- GRAINGER, J. L., WINKLER, M. M., SHEN, S. S. ET STEINHARDT, R. A.** (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchine egg and early embryo. *Dev Biol* **68**, 396-406.
- GRANDIN, N. ET CHARBONNEAU, M.** (1991). Cycling of intracellular free calcium and intracellular pH in *Xenopus* embryos: a possible role in the control of the cell cycle. *J Cell Sci* **99 (Pt 1)**, 5-11.
- GRAVES, P. R., LOVLY, C. M., UY, G. L. ET PIWNICA-WORMS, H.** (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-51.
- GREY, R. D., WORKING, P. K. ET HEDRICK, J. L.** (1976). Evidence that the fertilization envelope blocks sperm entry in eggs of *Xenopus laevis*: interaction of sperm with isolated envelopes. *Dev Biol* **54**, 52-60.
- GROISMAN, I., HUANG, Y. S., MENDEZ, R., CAO, Q., THEURKAUF, W. ET RICHTER, J. D.** (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* **103**, 435-47.
- GROOM, L. A., SNEDDON, A. A., ALESSI, D. R., DOWD, S. ET KEYSE, S. M.** (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* **15**, 3621-32.
- GROSS, S. D., SCHWAB, M. S., LEWELLYN, A. L. ET MALLER, J. L.** (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* **286**(5443): 1365-7.

- GROSS, S. D., SCHWAB, M. S., TAIEB, F. E., LEWELLYN, A. L., QIAN, Y. W. ET 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.
- GROSS, S. D., LEWELLYN, A. L. ET MALLER, J. L.** (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **276**, 46099-103.
- GU, W., DENG, Y., ZENKLUSEN, D. ET SINGER, R. H.** (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* **18**, 1452-65.
- GUAN, K. L., FIGUEROA, C., BRTVA, T. R., ZHU, T., TAYLOR, J., BARBER, T. D. ET VOJTEK, A. B.** (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* **275**, 27354-9.
- GUERRIER, P., BRASSARD, M., DAVID, C., ET MOREAU, M.** (1986). Sequential control of meiosis of the Prosobranch Mollusc *Patella vulgata*. *Dev Biol* **114**, 315-24.
- GUERRIER, P., LECLERC-DAVID, C. ET MOREAU, M.** (1993). Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev Biol* **159**, 474-84.
- GUILLEMETTE, G. ET SEGUI, J. A.** (1988). Effects of pH, reducing and alkylating reagents on the binding and Ca²⁺ release activities of inositol 1,4,5-triphosphate in the bovine adrenal cortex. *Mol Endocrinol* **2**, 1249-55.
- GUO, X. W., TH'NG, J. P., SWANK, R. A., ANDERSON, H. J., TUDAN, C., BRADBURY, E. M. ET ROBERGE, M.** (1995). Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *Embo J* **14**, 976-85.
- GUTTRIDGE, K. L., SMITH, L. D. ET MILEDI, R.** (1995). *Xenopus* Gq alpha subunit activates the phosphatidylinositol pathway in *Xenopus* oocytes but does not consistently induce oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1297-301.
- ~H~
- HACCARD, O., JESSUS, C., CAYLA, X., GORIS, J., MERLEVEDE, W., ET ANDOZON, R.** (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., SARCEVIC B., LEWELLYN, A., HARTLEY, R. S., ROY L., IZUMI T., ERIKSON, E. ET MALLER, J.** (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* **262**(5137): 1262-5.
- HACCARD, O., LEWELLYN, A., HARTLEY, R. S., ERIKSON, E. ET MALLER, J. L.** (1995). Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol* **168**, 677-82.
- HADWIGER, J. A., WITTENBERG, C., RICHARDSON, H. E., DE BARROS LOPES, M. ET REED, S. I.** (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6255-9.

Références bibliographiques

- HAGAG, N., LACAL, J. C., GRABER, M., AARONSON, S. ET VIOLA, M. V.** (1987). Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* **7**, 1984-8.
- HAGTING, A., JACKMAN, M., SIMPSON, K. ET PINES, J.** (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* **9**, 680-9.
- HAINAUT, P., KOWALSKI, A., GIORGETTI, S., BARON, V. ET VAN OBBERGHEN, E.** (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.
- HAKE, L. E. ET RICHTER, J. D.** (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **79**, 617-27.
- HAN, J. K., FUKAMI, K. ET NUCCITELLI, R.** (1992). Reducing inositol lipid hydrolysis, Ins(1,4,5)P3 receptor availability, or Ca²⁺ gradients lengthens the duration of the cell cycle in *Xenopus laevis* blastomeres. *J Cell Biol* **116**, 147-56.
- HAN, J. K. ET LEE, S. K.** (1995). Reducing PIP2 hydrolysis, Ins(1,4,5)P3 receptor availability, or calcium gradients inhibits progesterone-stimulated *Xenopus* oocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 931-9.
- HANCOCK, J. F., MAGEE, A. I., CHILDS, J. E. ET MARSHALL, C. J.** (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167-77.
- HANLON, N. ET BARFORD, D.** (1998). Purification and crystallization of the CDK-associated protein phosphatase KAP expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**, 508-11.
- HANNON, G. J., CASSO, D. ET BEACH, D.** (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1731-5.
- HANOCQ-QUERTIER, J. ET BALTUS, E.** (1981). Phosphorylation of ribosomal proteins during maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem* **120**, 351-5.
- HARGUINDEY, S., ORIVE, G., LUIS PEDRAZ, J., PARADISO, A. ET RESHKIN, S. J.** (2005). The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochim Biophys Acta* **1756**, 1-24.
- HARTLEY, R. S., LEWELLYN, A. L. ET MALLER, J. L.** (1994). MAP kinase is activated during mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **163**, 521-4.
- HARTZELL, H. C.** (1996). Activation of different Cl currents in *Xenopus* oocytes by Ca liberated from stores and by capacitative Ca influx. *J Gen Physiol* **108**, 157-75.
- HARTZELL, H. C., MACHACA, K. ET HIRAYAMA, Y.** (1997). Effects of adenophostin-A and inositol-1,4,5-trisphosphate on Cl⁻ currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **51**, 683-92.
- HATCH, K. R. ET 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.

- HEALD, R. ET MCKEON, F.** (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**, 579-89.
- HEHL, S., STOYANOV, B., OEHL, W., SCHONHERR, R., WETZKER, R. ET HEINEMANN, S. H.** (2001). Phosphoinositide 3-kinase-gamma induces *Xenopus* oocyte maturation *via* lipid kinase activity. *Biochem J* **360**, 691-8.
- HEIDECKER, G., HULEIHEL, M., CLEVELAND, J. L., KOLCH, W., BECK, T. W., LLOYD, P., PAWSON, T. ET RAPP, U. R.** (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol* **10**, 2503-12.
- HESKETH, T. R., MOORE, J. P., MORRIS, J. D., TAYLOR, M. V., ROGERS, J., SMITH, G. A. ET METCALFE, J. C.** (1985). A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature* **313**, 481-4.
- HIRSCH, A. H., GLANTZ, S. B., LI, Y., YOU, Y. ET RUBIN, C. S.** (1992). Cloning and expression of an intron-less gene for AKAP 75, an anchor protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *J Biol Chem* **267**, 2131-4.
- HOCHEGGER, H., KLOTZBUCHER, A., KIRK, J., HOWELL, M., LE GUELLEC, K., FLETCHER, K., DUNCAN, T., SOHAIL, M. ET HUNT, T.** (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development* **128**, 3795-807.
- HOFFMANN, I., CLARKE, P. R., MARCOTE, M. J., KARSENTI, E. ET DRAETTA, G.** (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* **12**, 53-63.
- HORNE, M. M. ET GUADAGNO, T. M.** (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **161**, 1021-8.
- HORVAT, B., TAHERI, S. ET SALIHAGIC, A.** (1992). Tumour cell proliferation is abolished by inhibitors of Na⁺/H⁺ and HCO₃⁻/Cl⁻ exchange. *Eur J Cancer* **29A**, 132-7.
- HOULE, J. G. ET WASSERMAN, W. J.** (1983). Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **97**, 302-12.
- HOUSLAY, M. D., WAKELAM, M. J., MURPHY, G. J., GAWLER, D. J. ET PYNE, N. J.** (1987). Glucagon stimulates adenylate cyclase through GR2 glucagon receptors: a process which can be attenuated by glucagon stimulating inositol phospholipid metabolism through GR1 glucagon receptors. *Biochem Soc Trans* **15**, 21-4.
- HOWARD, E. L., CHARLESWORTH, A., WELK, J. ET 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. ET ERIKSON, R. L.** (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell* **6**, 237-45.
- HUARTE, J., BELIN, D., VASSALLI, A., STRICKLAND, S. ET VASSALLI, J. D.** (1987). Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev* **1**, 1201-11.

Références bibliographiques

HUCHON, D., CROZET, N., CANTENOT, N. ET OZON, R. (1981). Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod Nutr Dev* **21**, 135-48.

HUCHON, D., RIME, H., JESSUS, C. ET OZON, R. (1993). Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biol Cell* **77**, 133-41.

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

HUNTER, T. ET PINES, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-82.

HUTCHINS, J. R., DIKOVSKAYA, D. ET CLARKE, P. R. (2002). Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in *Xenopus* Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding. *FEBS Lett* **528**, 267-71.

~|~

II, I. ET REBHUN, L. I. (1979). Acid release following activation of surf clam (*Spisula solidissima*) eggs. *Dev Biol* **72**, 195-200.

INOUE, S., AOYAMA, S., MIYATA, T., TSUJI, F. I. ET SAKAKI, Y. (1989). Overexpression and purification of the recombinant Ca²⁺-binding protein, apoaquorin. *J Biochem (Tokyo)* **105**, 473-7.

ITO, T. J., HISANAGA, S., HOSOI, T., KISHIMOTO, T. ET HOTANI, H. (1997). Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* **36**, 12574-82.

IWABUCHI, M., OHSUMI, K., YAMAMOTO, T. M., SAWADA, W. ET KISHIMOTO, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *Embo J* **19**, 4513-23.

IZUMI, T. ET MALLER, J. L. (1991). Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol* **11**, 3860-7.

IZUMI, T., WALKER, D. H. ET MALLER, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell* **3**, 927-39.

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

~)~

JACOBELLI, S., HANOCQ, J., BALTUS, E. ET BRACHET, J. (1974). Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor. *Differentiation* **2**, 129-35.

- JANICOT, M., FLORES-RIVEROS, J. R. ET LANE, M. D.** (1991). The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **266**, 9382-91.
- JEFFREY, P. D., RUSSO, A. A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J. ET PAVLETICH, N. P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-20.
- JEONG, S. M., LEE, J. H., KIM, S., RHIM, H., LEE, B. H., KIM, J. H., OH, J. W., LEE, S. M. ET NAH, S. Y.** (2004). Ginseng saponins induce store-operated calcium entry in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **142**, 585-93.
- JESSUS, C., RIME, H., HACCARD, O., VAN LINT, J., GORIS, J., MERLEVEDE, W. ET OZON, R.** (1991). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* **111**, 813-20.
- JESSUS, C. ET OZON, R.** (2004). How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol Cell* **96**, 187-92.
- JOHNSON, G. L. ET LAPADAT, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-2.
- JOHNSTON, R. N. ET PAUL, M.** (1977). Calcium influx following fertilization of *Urechis caupo* eggs. *Dev Biol* **57**, 364-74.

~K~

- KADO, R. T. ET BAUD, C.** (1981). The rise and fall of electrical excitability in the oocyte of *Xenopus laevis*. *J Physiol (Paris)* **77**, 1113-7.
- KALLIO, M., WEINSTEIN, J., DAUM, J. R., BURKE, D. J. ET GORBSKY, G. J.** (1998). Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol* **141**, 1393-406.
- KANG, M. G., KULISZ, A. ET WASSERMAN, W. J.** (1998). Raf-1 kinase, a potential regulator of intracellular pH in *Xenopus* oocytes. *Biol Cell* **90**, 477-85.
- KANKI, J. P. ET DONOGHUE, D. J.** (1991). Progression from meiosis I to meiosis II in *Xenopus* oocytes requires de novo translation of the mosxe protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5794-8.
- KAPUS, A., GRINSTEIN, S., WASAN, S., KANDASAMY, R. ET ORLOWSKI, J.** (1994). Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* **269**, 23544-52.
- KARAISKOU, A., JESSUS, C., BRASSAC, T. ET OZON, R.** (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**, 3747-56.

Références bibliographiques

- KARAISKOU, A., PEREZ, L. H., FERBY, I., OZON, R., JESSUS, C. ET NEBRED, A. R.** (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem* **276**, 36028-34.
- KARAISKOU, A., LEPRETRE, A. C., PAHLAVAN, G., DU PASQUIER, D., OZON, R. ET JESSUS, C.** (2004). Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development* **131**, 1543-52.
- KATSU, Y., YAMASHITA, M. ET NAGAHAMA, Y.** (1999). Translational regulation of cyclin B mRNA by 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing hormone) during oocyte maturation in a teleost fish, the goldfish (*Carassius auratus*). *Mol Cell Endocrinol* **158**, 79-85.
- KEIPER, B. D. ET RHOADS, R. E.** (1997). Cap-independent translation initiation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res* **25**, 395-402.
- KIM, D. ET SMITH, T. W.** (1988). Cellular mechanisms underlying calcium-proton interactions in cultured chick ventricular cells. *J Physiol* **398**, 391-410.
- KIM, S. H., LIN, D. P., MATSUMOTO, S., KITAZONO, A. ET MATSUMOTO, T.** (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* **279**, 1045-7.
- KISELYOV, K., XU, X., MOZHAYEVA, G., KUO, T., PESSAH, I., MIGNERY, G., ZHU, X., BIRNBAUMER, L. ET MUALLEM, S.** (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478-82.
- KLANK, C. A., SU, Y. R., CALLEN, D. F., WANG, Z., MENETON, P., BAIRD, N., KANDASAMY, R. A., ORLOWSKI, J., OTTERUD, B. E., LEPPERT, M. ET AL.** (1995). Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* **25**, 615-22.
- KLINE, D. ET NUCCITELLI, R.** (1985). The wave of activation current in the *Xenopus* egg. *Dev Biol* **111**, 471-87.
- KLINE, D.** (1988). Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol* **126**, 346-61.
- KLOC, M. ET ETKIN, L. D.** (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* **121**, 287-97.
- KOBAYASHI, H., MINSHULL, J., FORD, C., GOLSTEYN, R., POON, R. ET HUNT, T.** (1991). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* **114**, 755-65.
- KOBAYASHI, H., STEWART, E., POON, R., ADAMCZEWSKI, J. P., GANNON, J. ET HUNT, T.** (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**, 1279-94.
- KOBRINSKY, E., ONDRIAS, K. ET MARKS, A. R.** (1995). Expressed ryanodine receptor can substitute for the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Xenopus laevis* oocytes during progesterone-induced maturation. *Dev Biol* **172**, 531-40.

- KOBRINSKY, E. M. ET KIRCHBERGER, M. A.** (2001). Evidence for a role of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thapsigargin and Bcl-2 induced changes in *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Oncogene* **20**, 933-41.
- KOCH, K. S. ET LEFFERT, H. L.** (1979). Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. *Cell* **18**, 153-63.
- KOLCH, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305.
- KOPITO, R. R., LEE, B. S., SIMMONS, D. M., LINDSEY, A. E., MORGANS, C. W. ET SCHNEIDER, K.** (1989). Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* **59**, 927-37.
- KORN, L. J., SIEBEL, C. W., MCCORMICK, F. ET ROTH, R. A.** (1987). Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes. *Science* **236**, 840-3.
- KOSAKO, H., NISHIDA, E. ET GOTOH, Y.** (1993). cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *Embo J* **12**, 787-94.
- KOSAKO, H., GOTOH, Y. ET NISHIDA, E.** (1994a). Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J Biol Chem* **269**, 28354-8.
- KOSAKO, H., GOTOH, Y. ET NISHIDA, E.** (1994b). Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *Embo J* **13**, 2131-8.
- KOTANI, T. ET 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.
- KOVACINA, K. S. ET ROTH, R. A.** (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**, 1303-11.
- KRAMER, E. R., GIEFFERS, C., HOLZL, G., HENGSTSCHLAGER, M. ET PETERS, J. M.** (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* **8**, 1207-10.
- KUERSTEN, S. ET GOODWIN, E. B.** (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* **4**, 626-37.
- KUGE, H., BROWNLEE, G. G., GERSHON, P. D. ET RICHTER, J. D.** (1998). Cap ribose methylation of c-mos mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* **26**, 3208-14.
- KUMAGAI, A. ET DUNPHY, W. G.** (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-14.
- KUMAGAI, A. ET DUNPHY, W. G.** (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* **70**, 139-51.
- KUMAGAI, A. ET DUNPHY, W. G.** (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* **273**, 1377-80.

Références bibliographiques

- KUMAGAI, A., YAKOWEC, P. S. ET DUNPHY, W. G.** (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* **9**, 345-54.
- KUME, S., YAMAMOTO, A., INOUE, T., MUTO, A., OKANO, H. ET MIKOSHIBA, K.** (1997). Developmental expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and structural changes in the endoplasmic reticulum during oogenesis and meiotic maturation of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **182**, 228-39.
- KURUMA, A. ET HARTZELL, H. C.** (2000). Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals. *J Gen Physiol* **115**, 59-80.
- KURUMA, A., HIRAYAMA, Y. ET HARTZELL, H. C.** (2000). A hyperpolarization- and acid-activated nonselective cation current in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1401-13.
- KUSANO, K., MILEDI, R. ET STINNAKRE, J.** (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol* **328**, 143-70.
- KYOZUKA, K., DEGUCHI, R., YOSHIDA, N. ET YAMASHITA, M.** (1997). Change in intracellular Ca²⁺ is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Dev Biol* **182**, 33-41.
- ~L~
- LACERDA, A. E., PEREZ-REYES, E., WEI, X., CASTELLANO, A. ET BROWN, A. M.** (1994). T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with beta subunits. *Biophys J* **66**, 1833-43.
- LASKEY, R. A., MILLS, A. D., GURDON, J. B. ET PARTINGTON, G. A.** (1977). Protein synthesis in oocytes of *Xenopus laevis* is not regulated by the supply of messenger RNA. *Cell* **11**, 345-51.
- LAURENT, A., BASSET, M., DOREE, M. ET LE PEUCH, C. J.** (1988). Involvement of a calcium-phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* **226**, 324-30.
- LAWLER, S.** (1998). Microtubule dynamics: if you need a shrink try stathmin/Op18. *Curr Biol* **8**, R212-4.
- LECHLEITER, J. D. ET CLAPHAM, D. E.** (1992). Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes. *Cell* **69**, 283-94.
- LEE, S. C. ET STEINHARDT, R. A.** (1981). pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **85**, 358-69.
- LEE, M. S., ENOCH, T. ET PIWNICA-WORMS, H.** (1994). mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem* **269**, 30530-7.
- LEE, B. S., GUNN R. B. AND KOPITO R.R.** (1991) Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *J Biol Chem.* Jun 25;266(18):11448-54.

Références bibliographiques

- LEE, J. T., MIYANO, T., AND MOOR, .M.** (2000). Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* **8**(2): 119-25.
- LEES, E., FAHA, B., DULIC, V., REED, S. I. ET HARLOW, E.** (1992). Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev* **6**, 1874-85.
- LEES, E. M. ET HARLOW, E.** (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 1194-201.
- LEFEBVRE, T., BAERT, F., BODART, J. F., FLAMENT, S., MICHALSKI, J. C. ET VILAIN, J. P.** (2004). Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J Cell Biochem* **93**, 999-1010.
- LEISER, M., RUBIN, C. S. ET ERLICHMAN, J.** (1986). Differential binding of the regulatory subunits (RII) of cAMP-dependent protein kinase II from bovine brain and muscle to RII-binding proteins. *J Biol Chem* **261**, 1904-8.
- LENORMAND, J. L., DELLINGER, R. W., KNUDSEN, K. E., SUBRAMANI, S. ET DONOGHUE, D. J.** (1999). Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *Embo J* **18**, 1869-77.
- LEWIS, T., GROOM, L. A., SNEDDON, A. A., SMYTHE, C. ET 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.
- LI, Y. ET BENEZRA, R.** (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**, 246-8.
- LI, Y., GORBEA, C., MAHAFFEY, D., RECHSTEINER, M. ET BENEZRA, R.** (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12431-6.
- LIEBOLD, K. M., REIFARTH, F. W., CLAUSS, W. ET WEBER, W.** (1996). cAMP-activation of amiloride-sensitive Na⁺ channels from guinea-pig colon expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **431**, 913-22.
- LIPSKAIA, L. ET LOMPPE, A. M.** (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* **96**, 55-68.
- LISKA, A. J., POPOV, A. V., SUNYAEV, S., COUGHLIN, P., HABERMANN, B., SHEVCHENKO, A., BORK, P. ET KARSENTI, E.** (2004). Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. *Proteomics* **4**, 2707-21.
- LIU, J. X., SINGH, B., WLODEK, D. ET ARLINGHAUS, R. B.** (1990). Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene* **5**, 171-8.

Références bibliographiques

- LIU, Z. ET PATINO, R.** (1993). High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod* **49**, 980-8.
- LIU, X. J., SORISKY, A., ZHU, L. ET PAWSON, T.** (1995). Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* **15**, 3563-70.
- LIU, F., STANTON, J. J., WU, Z. ET PIWNICA-WORMS, H.** (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* **17**, 571-83.
- LOHKA, M. J., HAYES, M. K. ET MALLER, J. L.** (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3009-13.
- LOPEZ-HERNANDEZ, E. ET SANTOS, E.** (1999). Oncogenic Ras-induced germinal vesicle breakdown is independent of phosphatidylinositol 3-kinase in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* **451**, 284-8.
- LOPO, A. ET VACQUIER, V. D.** (1977). The rise and fall of intracellular pH of sea urchin eggs after fertilisation. *Nature* **269**, 590-2.
- LORCA, T., GALAS S., FESQUET D., DEVAULT A., CAVADORE J.C ET DOREE M.** (1991). Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca(2+)-calmodulin dependent event. *Embo J* **10**(8): 2087-93.
- LORCA, T., LABBE, J. C., DEVAULT, A., FESQUET, D., CAPONY, J. P., CAVADORE, J. C., LE BOUFFANT, F. ET DOREE, M.** (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J* **11**, 2381-9.
- LORCA, T., CRUZALEGUI F.H., FESQUET, D., CAVADORE, J. C., MERY, J., MEANS A., ET DOREE M LE BOUFFANT, F. ET DOREE, M** (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**(6452): 270-3.
- LORCA, T., CASTRO, A., MARTINEZ, A. M., VIGNERON, S., MORIN, N., SIGRIST, S., LEHNER, C., DOREE, M. ET LABBE, J. C.** (1998). Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* **17**, 3565-75.
- LOTAN, I., DASCAL, N., COHEN, S. ET LASS, Y.** (1982). Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature* **298**, 572-4.
- LUTZ, L. B., KIM, B., JAHANI, D., AND HAMMES, S. R.** (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J Biol Chem* **275**(52): 41512-20.
- LUTZ, L. B., COLE, L. M., GUPTA, M. K., KWIST, K. W., AUCHUS, R. J. ET HAMMES, S. R.** (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13728-33.

~M~

- MACHACA, K. ET HAUN, S.** (2000). Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of *Xenopus* meiosis. *J Biol Chem* **275**, 38710-5.
- MACHACA, K. ET HAUN, S.** (2002). Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca^{2+} store depletion from store-operated Ca^{2+} entry. *J Cell Biol* **156**, 75-85.
- MACHACA, K.** (2004). Increased sensitivity and clustering of elementary Ca^{2+} release events during oocyte maturation. *Dev Biol* **275**, 170-82.
- MAK, D. O., MCBRIDE, S. ET FOSKETT, J. K.** (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15821-5.
- MAKELA, T. P., TASSAN, J. P., NIGG, E. A., FRUTIGER, S., HUGHES, G. J. ET WEINBERG, R. A.** (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371**, 254-7.
- MALLER, J., WU, M. ET GERHART, J. C.** (1977). Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* **58**, 295-312.
- MALLER, J. L. ET KREBS, E. G.** (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **252**, 1712-8.
- MALLER, J. L., BUTCHER, F. R. ET KREBS, E. G.** (1979). Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **254**, 579-82.
- MALLER, J. L. ET KOONTZ, J. W.** (1981). A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. *Dev Biol* **85**, 309-16.
- MALLER, J. L.** (2003). Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science* **300**, 594-5.
- MALY, K., UBERALL, F., LOFERER, H., DOPPLER, W., OBERHUBER, H., GRONER, B. ET GRUNICKE, H. H.** (1989). Ha-ras activates the $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter by a protein kinase C-independent mechanism. *J Biol Chem* **264**, 11839-42.
- MANSOUR, S. J., RESING, K. A., CANDI, J. M., HERMANN, A. S., GLOOR, J. W., HERSKIND, K. R., WARTMANN, M., DAVIS, R. J. ET AHN, N. G.** (1994). Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 304-14.
- MARCHANT, J. S., RAMOS, V. ET PARKER, I.** (2002). Structural and functional relationships between Ca^{2+} puffs and mitochondria in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1374-86.

Références bibliographiques

- MARGOLIS, S. S., WALSH, S., WEISER, D. C., YOSHIDA, M., SHENOLIKAR, S. ET KORNBLUTH, S.** (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J* **22**, 5734-45.
- MAROT, J., BELLE, R. ET OZON, R.** (1976). [Oocyte maturation in *Xenopus laevis*. Arguments in favor of the role of calcium ions]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **282**, 1301-4.
- MASUI, Y.** (1967). Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool* **166**, 365-75.
- MASUI, Y. ET MARKERT, C. L.** (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**, 129-45.
- MASUI, Y., MEYERHOF, P. G., MILLER, M. A. ET WASSERMAN, W. J.** (1977). Roles of divalent cations in maturation and activation of vertebrate oocytes. *Differentiation* **9**, 49-57.
- MASUI, Y.,** (2000). The elusive cytostatic factor in the animal egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 228-32.
- MATTEN, W., DAAR, I. ET VANDE WOUDE, G. F.** (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* **14**, 4419-26.
- MATTEN, W. T., COPELAND, T. D., AHN, N. G. ET VANDE WOUDE, G. F.** (1996). Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* **179**, 485-92.
- MEIJER, L., AZZI, L. ET WANG, J. Y.** (1991). Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *Embo J* **10**, 1545-54.
- MENDEZ, R., HAKE, L. E., ANDRESON, T., LITTLEPAGE, L. E., RUDERMAN, J. V. ET RICHTER, J. D.** (2000a). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **404**, 302-7.
- MENDEZ, R., MURTHY, K. G., RYAN, K., MANLEY, J. L. ET RICHTER, J. D.** (2000b). Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell* **6**, 1253-9.
- MENDEZ, R. ET RICHTER, J. D.** (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 521-9.
- MENDEZ, R., BARNARD, D. ET RICHTER, J. D.** (2002). Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *Embo J* **21**, 1833-44.
- MEYERHOF, P. G. ET MASUI, Y.** (1979). Properties of a cytostatic factor from *Xenopus laevis* eggs. *Dev Biol* **72**, 182-7.
- MILARSKI, K. L., DUNPHY, W. G., RUSSELL, P., GOULD, S. J. ET NEWPORT, J. W.** (1991). Cloning and characterization of *Xenopus cdc2*, a component of MPF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**, 377-84.
- MILEDI, R. ET PARKER, I.** (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **357**, 173-83.

- MILOVANOVIC, S., FRINDT, G., TATE, S. S. ET WINDHAGER, E. E.** (1991). Expression of renal Na(+)-Ca2+ exchange activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* **261**, F207-12.
- MILS, V., BALDIN, V., GOUBIN, F., PINTA, I., PAPIN, C., WAYE, M., EYCHENE, A. ET DUCOMMUN, B.** (2000). Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. *Oncogene* **19**, 1257-65.
- MINSHULL, J., PINES, J., GOLSTEYN, R., STANDART, N., MACKIE, S., COLMAN, A., BLOW, J., RUDERMAN, J. V., WU, M. ET HUNT, T.** (1989). The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* **12**, 77-97.
- MINSHULL, J., GOLSTEYN, R., HILL, C. S. ET HUNT, T.** (1990). The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *Embo J* **9**, 2865-75.
- MINSHULL, J., MURRAY, A., COLMAN, A. ET HUNT, T.** (1991). *Xenopus* oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol* **114**, 767-72.
- MINSHULL, J., SUN, H., TONKS, N. K. ET MURRAY, A. W.** (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **79**, 475-86.
- MOE, O. W.** (1999). Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2412-25.
- MOELLING, K., HEIMANN, B., BEIMLING, P., RAPP, U. R. ET SANDER, T.** (1984). Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature* **312**, 558-61.
- MOOLENAAR, W. H., TSIEN, R. Y., VAN DER SAAG, P. T. ET DE LAAT, S. W.** (1983). Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* **304**, 645-8.
- MOREAU, M., GUERRIER, P. ET DOREE, M.** (1976). [Early changes in the electric properties of the oocyte plasma membrane of *Xenopus laevis* during the reinitiation of meiosis induced by progesterone, para chloromercuribenzoate (PCMB) or the ionophore A 23187]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **282**, 1309-12.
- MOREAU, M., GUERRIER, P., DOREE, M. ET ASHLEY, C. C.** (1978). Hormone-induced release of intracellular Ca²⁺ triggers meiosis in starfish oocytes. *Nature* **272**, 251-3.
- MOREAU, M., VILAIN, J. P. ET GUERRIER, P.** (1980). Free calcium changes associated with hormone action in amphibian oocytes. *Dev Biol* **78**, 201-14.
- MOREAU, M., DAVID, C. ET AZZI, L.** (1990). Changes in membrane properties during in-vitro meiotic maturation of the limpet *Patella vulgata*. *Int J Dev Biol* **34**, 441-51.
- MORIN, N., ABRIEU, A., LORCA, T., MARTIN F., ET DOREE, M.** (1994). The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs. *Embo J* **13**(18): 4343-52.
- MORRILL, G. A. ET ZIEGLER, D.** (1980). Na⁺ and K⁺ uptake and exchange by the amphibian oocyte during the first meiotic division. *Dev Biol* **74**, 216-23.

Références bibliographiques

- MORRIS, M. C., HEITZ, A., MERY, J., HEITZ, F. ET DIVITA, G.** (2000). An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins. *J Biol Chem* **275**, 28849-57.
- MORRISON, D. K., HEIDECKER, G., RAPP, U. R. ET COPELAND, T. D.** (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* **268**, 17309-16.
- MORRISON, D. K. ET CUTLER, R. E.** (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 174-9.
- MUDA, M., THEODOSIOU, A., RODRIGUES, N., BOSCHERT, U., CAMPS, M., GILLIERON, C., DAVIES, K., ASHWORTH, A. ET ARKINSTALL, S.** (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**, 27205-8.
- MUELLER, P. R., COLEMAN, T. R., KUMAGAI, A. ET DUNPHY, W. G.** (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
- MULNER-LORILLON, O., POULHE, R., CORMIER, P., LABBE, J. C., DOREE, M. ET BELLE, R.** (1989). Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *FEBS Lett* **251**, 219-24.
- MUNARON, L., ANTONIOTTI, S. ET LOVISOLO, D.** (2004). Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol Med* **8**, 161-8.
- MURAKAMI, M. S. ET 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.
- MURRAY, A. W. ET KIRSCHNER, M. W.** (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-80.
- MURRAY, A. W., SOLOMON, M. J. ET KIRSCHNER, M. W.** (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-6.
- MUSLIN, A. J., KLIPPEL, A. ET WILLIAMS, L. T.** (1993a). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* **13**, 6661-6.
- MUSLIN, A. J., MACNICOL, A. M. ET WILLIAMS, L. T.** (1993b). Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol* **13**, 4197-202.

~N~

- NACCACHE, P. H., FAUCHER, N., CAON, A. C. ET MCCOLL, S. R.** (1988). Propionic acid-induced calcium mobilization in human neutrophils. *J Cell Physiol* **136**, 118-24.
- 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**, 190-6.

- NAKAJO, N., YOSHITOME, S., IWASHITA, J., IIDA, M., UTO, K., UENO, S., OKAMOTO, K. ET SAGATA, N.** (2000). Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* **14**, 328-38.
- NAKHOUL, N. L., HERING-SMITH, K. S., ABDULNOUR-NAKHOUL, S. M. ET HAMM, L. L.** (2001). Transport of NH(3)/NH in oocytes expressing aquaporin-1. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F255-63.
- NASMYTH, K., PETERS, J. M. ET UHLMANN, F.** (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* **288**, 1379-85.
- NASSAR, N., HORN, G., HERRMANN, C., SCHERER, A., MCCORMICK, F. ET WITTINGHOFFER, A.** (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**, 554-60.
- NEANT, I. ET GUERRIER, P.** (1988). 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* **176**, 68-79.
- NEBRED, A. R., MARTIN-ZANCA, D., KAPLAN, D. R., PARADA, L. F. ET SANTOS, E.** (1991). Induction by NGF of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes expressing the trk proto-oncogene product. *Science* **252**, 558-61.
- NEBRED, A. R. ET 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.
- NEBRED, A. R., GANNON, J. V. AND HUNT, T.** (1995). Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J* **14**, 5597-607.
- NELKIN, B., NICHOLS, C. ET VOGELSTEIN, B.** (1980). Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* **109**, 233-8.
- NIGG, E. A.** (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471-80.
- NIGG, E. A.** (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* **8**, 312-7.
- NILSSON, I. ET HOFFMANN, I.** (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* **4**, 107-14.
- NISHIZAWA, M., OKAZAKI, K., FURUNO, N., WATANABE, N. ET SAGATA, N.** (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Embo J* **11**, 2433-46.
- NISHIZAWA, M., FURUNO, N., OKAZAKI, K., TANAKA, H., OGAWA, Y. ET SAGATA, N.** (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *Embo J* **12**, 4021-7.
- NUCCITELLI, R., YIM, D. L. ET SMART, T.** (1993). The sperm-induced Ca²⁺ wave following fertilization of the *Xenopus* egg requires the production of Ins(1, 4, 5)P₃. *Dev Biol* **158**, 200-12.

Références bibliographiques

- NUGENT, J. H., ALFA, C. E., YOUNG, T. ET HYAMS, J. S.** (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* **99** (Pt 3), 669-74.
- NUMATA, M., PETRECCA, K., LAKE, N. ET ORLOWSKI, J.** (1998). Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **273**, 6951-9.
- ~O~
- O'CONNOR, C. M. ET SMITH, L. D.** (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev Biol* **52**, 318-22.
- O'CONNOR, C. M., ROBINSON, K. R. ET SMITH, L. D.** (1977). Calcium, potassium, and sodium exchange by full-grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* **61**, 28-40.
- OE, T., NAKAJO, N., KATSURAGI, Y., OKAZAKI, K. ET SAGATA, N.** (2001). Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **229**, 250-61.
- OHSUMI, K., SAWADA, W. ET KISHIMOTO, T.** (1994). Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* **107** (Pt 11), 3005-13.
- O'KEEFE, S. J., WOLFES, H., KIESSLING, A. A. ET COOPER, G. M.** (1989). Microinjection of antisense c-mos oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7038-42.
- OKUMURA, E., FUKUHARA, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., TACHIBANA, K. ET KISHIMOTO, T.** (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* **4**, 111-6.
- OLATE, J., ALLENDE, C. C., ALLENDE, J. E., SEKURA, R. D. ET BIRNBAUMER, L.** (1984). Oocyte adenylyl cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin. *FEBS Lett* **175**, 25-30.
- OOKATA, K., HISANAGA, S., BULINSKI, J. C., MUROFUSHI, H., AIZAWA, H., ITOH, T. J., HOTANI, H., OKUMURA, E., TACHIBANA, K. ET KISHIMOTO, T.** (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* **128**, 849-62.
- OPRESKO, L. K. ET WILEY, H. S.** (1990). Functional reconstitutions of the human epidermal growth factor receptor system in *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* **111**, 1661-71.
- ORLOWSKI, J., KANDASAMY, R. A. ET SHULL, G. E.** (1992). Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* **267**, 9331-9.
- ORLOWSKI, J. ET GRINSTEIN, S.** (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 22373-6.

OSKARSSON, M., McCLEMENTS, W. L., BLAIR, D. G., MAIZEL, J. V. ET VANDE WOUDE, G. F. (1980). Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus. *Science* **207**, 1222-4.

~P~

PADMANABHAN, K. ET RICHTER, J. D. (2006). Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes Dev* **20**, 199-209.

PALMER, A., GAVIN, A. C. ET NEBRED, 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.

PAN, B. T. ET COOPER, G. M. (1990). Role of phosphatidylinositol metabolism in ras-induced *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* **10**, 923-9.

PAPIN, C., ROUGET, C., LORCA, T., CASTRO, A. ET MANDART, E. (2004). XCdh1 is involved in progesterone-induced oocyte maturation. *Dev Biol* **272**, 66-75.

PAREKH, A. B. (1995). Interaction between capacitative Ca^{2+} influx and Ca^{2+} -dependent Cl^- currents in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **430**, 954-63.

PAREKH, A. B. ET PENNER, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**, 901-30.

PARIS, S. ET POUYSSEGUR, J. (1983). Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* **258**, 3503-8.

PARIS, S. ET POUYSSEGUR, J. (1984). Growth factors activate the Na^+/H^+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H^+ . *J Biol Chem* **259**, 10989-94.

PARIS, J. ET RICHTER, J. D. (1990). Maturation-specific polyadenylation and translational control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenylation complexes. *Mol Cell Biol* **10**, 5634-45.

PARIS, J., SWENSON, K., PIWNICA-WORMS, H. ET 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.

PARKER, I. ET MILEDI, R. (1987). Inositol trisphosphate activates a voltage-dependent calcium influx in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **231**, 27-36.

PARKER, L. L., ATHERTON-FESSLER, S. ET PIWNICA-WORMS, H. (1992). p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2917-21.

PARKER, I. ET IVORRA, I. (1993). Confocal microfluorimetry of Ca^{2+} signals evoked in *Xenopus* oocytes by photoreleased inositol trisphosphate. *J Physiol* **461**, 133-65.

PARKER, I. ET YAO, Y. (1994). Relation between intracellular Ca^{2+} signals and Ca^{2+} -activated Cl^- current in *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium* **15**, 276-88.

- PARYS, J. B., SERNETT, S. W., DELISLE, S., SNYDER, P. M., WELSH, M. J. ET CAMPBELL, K. P.** (1992). Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **267**, 18776-82.
- PARYS, J. B., MCPHERSON, S. M., MATHEWS, L., CAMPBELL, K. P. ET LONGO, F. J.** (1994). Presence of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, calreticulin, and calsequestrin in eggs of sea urchins and *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **161**, 466-76.
- PARYS, J. B. ET BEZPROZVANNY, I.** (1995). The inositol trisphosphate receptor of *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium* **18**, 353-63.
- PATRA, D. ET DUNPHY, W. G.** (1996). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev* **10**, 1503-15.
- PATRA, D. ET DUNPHY, W. G.** (1998). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev* **12**, 2549-59.
- PATRA, D., WANG, S. X., KUMAGAI, A. ET DUNPHY, W. G.** (1999). The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* **274**, 36839-42.
- PAUL, M.** (1975). Release of acid and changes in light-scattering properties following fertilization of *Urechis caupo* eggs. *Dev Biol* **43**, 299-312.
- PAULES, R. S., BUCCIONE, R., MOSCHEL, R. C., VANDE WOUDE, G. F. ET EPPIG, J. J.** (1989). Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5395-9.
- PAULOVICH, A. G. ET HARTWELL, L. H.** (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**, 841-7.
- PEAUCELLIER, G.** (1978). Acid release at meiotic maturation of oocytes in the polychaete annelid *Sabellaria alveolata*. *Experientia* **34**, 789-90.
- PERDIGUERO, E., PILLAI, M. J., BODART, J. F., HENNERSDORF, F., FRODIN, M., DUESBERY, N. S., ALONSO, G. ET NEBRED, A. R.** (2003). Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C. *Embo J* **22**, 5746-56.
- PERONA, R. ET SERRANO, R.** (1988). Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* **334**, 438-40.
- PETER, M., NAKAGAWA, J., DOREE, M., LABBE, J. C. ET NIGG, E. A.** (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**, 591-602.
- PETER, M., SANGHERA, J. S., PELECH, S. L. ET NIGG, E. A.** (1992). Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *Eur J Biochem* **205**, 287-94.

- PETER, M., CASTRO, A., LORCA, T., LE PEUCH, C., MAGNAGHI-JAULIN, L., DOREE, M. ET LABBE, J. C.** (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes. *Nat Cell Biol* **3**, 83-7.
- PETER, M., LABBE, J. C., DOREE, M. ET MANDART, E.** (2002). A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development* **129**, 2129-39.
- PHAM, C. D., VUYYURU, V. B., YANG, Y., BAI, W. ET SINGH, B.** (1999). Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene* **18**, 4287-94.
- PICARD, A., GALAS, S., PEAUCELLIER, G. ET DOREE, M.** (1996). Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *Embo J* **15**, 3590-8.
- PIERI, C., LUSTYIK, G., GIULI, C. ET BERTONI-FREDDARI, C.** (1984). Amiloride inhibition of triiodothyronine stimulated hepatocyte proliferation in vivo, and involvement of the intracellular Na⁺ content in mitotic regulation: an X-ray microanalytic study. *Cytobios* **41**, 71-83.
- PIERI, C., MUZZIOLI, M., GIULI, C. ET BERTONI-FREDDARI, C.** (1985). Amiloride inhibits the PHA-evoked mouse splenic lymphocyte proliferation. *Boll Soc Ital Biol Sper* **61**, 175-81.
- PINES, J. ET HUNTER, T.** (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* **13**, 3772-81.
- PLANELLES, G., THOMAS, S. R. ET ANAGNOSTOPOULOS, T.** (1993). Change of apparent stoichiometry of proximal-tubule Na(+)-HCO₃⁻ cotransport upon experimental reversal of its orientation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7406-10.
- POENIE, M., ALDERTON, J., TSIEN, R. Y. ET STEINHARDT, R. A.** (1985). Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature* **315**, 147-9.
- POON, R. Y., YAMASHITA, K., ADAMCZEWSKI, J. P., HUNT, T. ET SHUTTLEWORTH, J.** (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J* **12**, 3123-32.
- POON, R. Y. ET HUNTER, T.** (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-3.
- POSADA, J., SANGHERA, J., PELECH, S., AEBERSOLD, R. ET COOPER, J. A.** (1991). Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**, 2517-28.
- POSADA, J., YEW, N., AHN, N. G., VANDE WOUDE, G. F. ET 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.
- POUYSESGUR, J., SARDET, C., FRANCHI, A., L'ALLEMAIN, G. ET PARIS, S.** (1984). A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4833-7.

Références bibliographiques

- POUYSEUR, J., FRANCHI, A., L'ALLEMAIN, G. ET PARIS, S.** (1985). Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett* **190**, 115-9.
- PRONK, G. J., DE VRIES-SMITS, A. M., ELLIS, C. ET BOS, J. L.** (1993). Complex formation between the p21ras GTPase-activating protein and phosphoproteins p62 and p190 is independent of p21ras signalling. *Oncogene* **8**, 2773-80.
- PUCEAT, M.** (1999). pH regulatory ion transporters: an update on structure, regulation and cell function. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1216-29.
- PUTNAM, R. W.** (1995). Intracellular pH regulation. *Cell Physiology Book*, 212-28.
- PUTNEY, L. K., DENKER, S. P. ET BARBER, D. L.** (2002). The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 527-52.
- PUTNEY, L. K. ET BARBER, D. L.** (2003). Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem* **278**, 44645-9.

~Q~

- QIAN, Y. W., ERIKSON, E., LI, C. ET MALLER, J. L.** (1998a). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* **18**, 4262-71.
- QIAN, Y. W., ERIKSON, E. ET MALLER, J. L.** (1998b). Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science* **282**, 1701-4.
- QIAN, Y. W., ERIKSON, E., TAIEB, F. E. ET MALLER, J. L.** (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 1791-9.

~R~

- RACOWSKY, C.** (1986). The releasing action of calcium upon cyclic AMP-dependent meiotic arrest in hamster oocytes. *J Exp Zool* **239**, 263-75.
- RALEY-SUSMAN, K. M., SAPOLSKY, R. M. ET KOPITO, R. R.** (1993). Cl⁻/HCO₃⁻ exchange function differs in adult and fetal rat hippocampal neurons. *Brain Res* **614**, 308-14.
- RANDRIAMAMPITA, C. ET TSIEN, R. Y.** (1993). Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* **364**, 809-14.
- RAPP, U. R., GOLDSBOROUGH, M. D., MARK, G. E., BONNER, T. I., GROFFEN, J., REYNOLDS, F. H., JR. ET STEPHENSON, J. R.** (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4218-22.
- REIFARTH, F. W., AMASHEH, S., CLAUSS, W. ET WEBER, W.** (1997). The Ca²⁺-inactivated Cl⁻ channel at work: selectivity, blocker kinetics and transport visualization. *J Membr Biol* **155**, 95-104.

- REMPEL, R. E., SLEIGHT, S. B. ET MALLER, J. L.** (1995). Maternal Xenopus Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *J Biol Chem* **270**, 6843-55.
- RESHKIN, S. J., BELLIZZI, A., CALDEIRA, S., ALBARANI, V., MALANCHI, I., POIGNEE, M., ALUNNI-FABBRONI, M., CASAVOLA, V. ET TOMMASINO, M.** (2000). Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* **14**, 2185-97.
- REVERTE, C. G., AHEARN, M. D. ET HAKE, L. E.** (2001). CPEB degradation during Xenopus oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Dev Biol* **231**, 447-58.
- REYNHOUT, J. K. ET SMITH, L. D.** (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol* **38**, 394-400.
- REZAI, K., KULISZ, A. ET WASSERMAN, W. J.** (1994). Protooncogene product, c-mos kinase, is involved in upregulating Na⁺/H⁺ antiporter in Xenopus oocytes. *Am J Physiol* **267**, C1717-22.
- RICHTER, J. D. ET SMITH, L. D.** (1981). Differential capacity for translation and lack of competition between mRNAs that segregate to free and membrane-bound polysomes. *Cell* **27**, 183-91.
- RICHTER, J. D., WASSERMAN, W. J. ET SMITH, L. D.** (1982). The mechanism for increased protein synthesis during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol* **89**, 159-67.
- RICHTER, J. D.** (1991). Translational control during early development. *Bioessays* **13**, 179-83.
- RIME, H., HACCARD, O. ET OZON, R.** (1992). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic amp-dependent protein kinase in Xenopus oocytes. *Dev Biol* **151**, 105-10.
- RIME, H., HUCHON, D., DE SMEDT, V., THIBIER, C., GALAKTIONOV, K., JESSUS, C. ET OZON, R.** (1994). Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol Cell* **82**, 11-22.
- ROBINSON, K. R.** (1985). Maturation of Xenopus oocytes is not accompanied by electrode-detectable calcium changes. *Dev Biol* **109**, 504-8.
- ROCHE, S., DOWNWARD, J., RAYNAL, P. ET COURTNEIDGE, S. A.** (1998). A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* **18**, 7119-29.
- RODEAU, J. L. ET VILAIN, J. P.** (1986) Changes in Membrane Potential, membrane resistance, and intracellular H⁺, K⁺, Na⁺ and Cl⁻ activities during the progesterone-induced maturation of Urodele Amphibian oocytes. *Dev Biol* **120**, 481-93.

Références bibliographiques

- RODEAU, J. L., FLAMENT, S., BROWAEYS, E. ET VILAIN, J. P.** (1998). Effect of procaine on membrane potential and intracellular pH in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Membr Biol* **15**, 145-51.
- ROTH, Z., CHAYEN, N. ET DIKSTEIN, S.** (1983) The involvement of the intracellular redox state and pH in the metabolic control of stimulus--response coupling. *Int Rev Cytol.* **85**:39-61.
- ROY, L. M., SINGH, B., GAUTIER, J., ARLINGHAUS, R.B., NORDEEN, K.S. AND MALLER, J. L.** (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., SWENSON, K. I., WALKER, D. H., GABRIELLI, B. G., LI, R. S., PIWNICA-WORMS, H. ET MALLER, J. L.** (1991). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A. *J Cell Biol* **113**, 507-14.
- ROY, L. M., HACCARD, O., IZUMI, T., LATTES, B. G., LEWELLYN, A. L. ET MALLER, J. L.** (1996). Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus*. *Oncogene* **12**, 2203-11.
- RUSSELL, J. M. ET BORON, W. F.** (1976). Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* **264**, 73-4.
- ~S~
- SADHU, K., REED, S. I., RICHARDSON, H. ET RUSSELL, P.** (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5139-43.
- SADLER, S. E. ET MALLER, J. L.** (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* **256**, 6368-73.
- SADLER, S. E. ET MALLER, J. L.** (1987). In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem* **262**, 10644-50.
- SADLER, S. E. ET MALLER, J. L.** (1989). A similar pool of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes is stimulated by insulin, insulin-like growth factor 1, and [Val12,Thr59]Ha-ras protein. *J Biol Chem* **264**, 856-61.
- SAGATA, N., OSKARSSON, M., COPELAND, T., BRUMBAUGH, J. ET VANDE WOUDE, G. F.** (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* **335**, 519-25.
- SAGATA, N.** (1995). The role of Mos in oocyte maturation : prevention of parthenogenetic activation. *Cell Technology* **14**: 51-59.
- SAGATA, N., DAAR, I., OSKARSSON, M., SHOWALTER, S. D. ET VANDE WOUDE, G. F.** (1989a). The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science* **245**, 643-6.

- SAGATA, N., WATANABE, N., VANDE WOUDE, G. F. ET IKAWA, Y.** (1989b). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342**, 512-8.
- SALTIEL, A. R. ET KAHN, C. R.** (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.
- SAMPSON, S. R. ET COOPER, D. R.** (2006). Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol Genet Metab* **89**, 32-47.
- SANTELLA, L.** (1998). The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 317-24.
- SASAKI, S., ISHIBASHI, K., NAGAI, T. ET MARUMO, F.** (1992). Regulation mechanisms of intracellular pH of *Xenopus laevis* oocyte. *Biochim Biophys Acta* **1137**, 45-51.
- SCHMALZING, G., ECKARD, P., KRONER, S. ET PASSOW, H.** (1990). Downregulation of surface sodium pumps by endocytosis during meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* **258**, C179-84.
- SCHMITT, A. ET NEBRED, A. R.** (2002). Inhibition of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4361-6.
- SCHOLZ, W., ALBUS, U., COUNILLON, L., GOGELIN, H., LANG, H. J., LINZ, W., WEICHERT, A. ET SCHOLKENS, B. A.** (1995). Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **29**, 260-8.
- SCHORDERET-SLATKINE, S. ET DRURY, K. C.** (1973). Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differ* **2**, 247-54.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M. ET BAULIEU, E.** (1976). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. *Nature* **262**, 289-90.
- SCHORDERET-SLATKINE, S. ET BAULIEU, E. E.** (1977). Induction by progesterone and a "maturation-promoting factor" of soluble proteins in *Xenopus laevis* in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **286**, 421-33.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M. ET BAULIEU, E. E.** (1977). Progesterone-induced meiotic reinitiation in vitro in *Xenopus laevis* oocytes: a role for the displacement of membrane-bound calcium. *Differentiation* **9**, 67-76.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M., BOQUET, P., GODEAU, F. ET BAULIEU, E. E.** (1978). Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes: a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level. *Cell* **15**, 1269-75.
- SCHUETZ, A. W.** (1967). Effect of steroids on germinal vesicle of oocytes of the frog (*Rana pipiens*) in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **124**, 1307-10.
- SCHUETZ, A. W.** (1975). Cytoplasmic activation of starfish oocytes by sperm and divalent ionophore A-23187. *J Cell Biol.* **66**, 86-94.

Références bibliographiques

- SCHULTHEISS, M., NEUMCKE, B. ET RICHTER, H. P.** (1997). Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores. *Cell Mol Life Sci* **53**, 842-9.
- SCHWAB, M., LUTUM, A. S. ET SEUFERT, W.** (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**, 683-93.
- SCHWAB, M. S., ROBERTS, B. T., GROSS, S. D., TUNQUIST, B. J., TAIEB, F. E., LEWELLYN, A. L. ET MALLER, J. L.** (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* **11**, 141-50.
- SCOLNICK, E. M., PAPAGEORGE, A. G. ET SHIH, T. Y.** (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**, 5355-9.
- SEKI, G., COPPOLA, S. ET FROMTER, E.** (1993). The Na(+)-HCO₃⁻ cotransporter operates with a coupling ratio of 2 HCO₃⁻ to 1 Na⁺ in isolated rabbit renal proximal tubule. *Pflugers Arch* **425**, 409-16.
- SHAPIRA, H., LUPU-MEIRI, M., GERSHENGORN, M. C. ET ORON, Y.** (1990). Activation of two different receptors mobilizes calcium from distinct stores in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **57**, 1281-5.
- SHEETS, M. D., FOX, C. A., HUNT, T., VANDE WOUDE, G. ET WICKENS, M.** (1994). The 3'-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes Dev* **8**, 926-38.
- SHEETS, M. D., WU, M. ET WICKENS, M.** (1995). Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature* **374**, 511-6.
- SHEN, S. S. ET STEINHARDT, R. A.** (1978). Direct measurement of intracellular pH during metabolic derepression of the sea urchin egg. *Nature* **272**, 253-4.
- SHENG, Y., TIBERI, M., BOOTH, R. A., MA, C. ET LIU, X. J.** (2001). Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr Biol* **11**, 405-16.
- SHENG, J., KUMAGAI, A., DUNPHY, W. G. ET VARSHAVSKY, A.** (2002). Dissection of c-MOS degron. *Embo J* **21**, 6061-71.
- SHIBUYA, E. K., MORRIS, J., RAPP, U. R. ET 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.
- SHIH, T. Y., PAPAGEORGE, A. G., STOKES, P. E., WEEKS, M. O. ET SCOLNICK, E. M.** (1980). Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* **287**, 686-91.
- SHIMOMURA, O.** (1985). Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol* **39**, 351-72.
- SHIMOMURA, O., MUSICKI, B. ET KISHI, Y.** (1988). Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. *Biochem J* **251**, 405-10.

Références bibliographiques

- SIGRIST, S. J. ET LEHNER, C. F.** (1997). Drosophila fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* **90**, 671-81.
- SINGH, B. ET ARLINGHAUS, R. B.** (1997). Mos and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 251-9.
- SISKIND, M. S., MCCOY, C. E., CHOBANIAN, A. ET SCHWARTZ, J. H.** (1989). Regulation of intracellular calcium by cell pH in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **256**, C234-40.
- SKOLNIK, E. Y., LEE, C. H., BATZER, A., VICENTINI, L. M., ZHOU, M., DALY, R., MYERS, M. J., JR., BACKER, J. M., ULLRICH, A., WHITE, M. F. ET AL.** (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo J* **12**, 1929-36.
- SLOTKI, I., SCHWARTZ, J. H. ET ALEXANDER, E. A.** (1993). Interrelationship between cell pH and cell calcium in rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* **265**, C432-8.
- SMITH, L. D., ECKER, R. E. ET SUBTELNY, S.** (1968). In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Dev Biol* **17**, 627-43.
- SMITH, L. D. ET ECKER, R. E.** (1969). Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Dev Biol* **19**, 281-309.
- SMITH, L. D. ET ECKER, R. E.** (1971). The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* **25**, 232-47.
- SMITH, R. C.** (1986). Protein synthesis and messenger RNA levels along the animal-vegetal axis during early *Xenopus* development. *J Embryol Exp Morphol* **95**, 15-35.
- SOLIS-GARRIDO, L. M., PINTADO, A. J., ANDRES-MATEOS, E., FIGUEROA, M., MATUTE, C. ET MONTIEL, C.** (2004). Cross-talk between native plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ internal store in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **279**, 52414-24.
- SOLOMON, M. J., GLOTZER, M., LEE, T. H., PHILIPPE, M. ET KIRSCHNER, M. W.** (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63**, 1013-24.
- SOLOMON, M. J., LEE, T. ET KIRSCHNER, M. W.** (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* **3**, 13-27.
- SOLOMON, M. J.** (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**(2): 180-6.
- SOLOMON, M. J., HARPER, J. W. ET SHUTTLEWORTH, J.** (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* **12**, 3133-42.
- SOLOMON, M. J.** (1994). The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem Sci* **19**, 496-500.

Références bibliographiques

- SOMASUNDARAM, B. ET MAHAUT-SMITH, M. P.** (1995). A novel monovalent cation channel activated by inositol trisphosphate in the plasma membrane of rat megakaryocytes. *J Biol Chem* **270**, 16638-44.
- SPEAKER, M. G. ET BUTCHER, F. R.** (1977). Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature* **267**, 848-50.
- STEBBINS-BOAZ, B. ET RICHTER, J. D.** (1994). Multiple sequence elements and a maternal mRNA product control cdk2 RNA polyadenylation and translation during early *Xenopus* development. *Mol Cell Biol* **14**, 5870-80.
- STEBBINS-BOAZ, B., CAO, Q., DE MOOR, C. H., MENDEZ, R. ET RICHTER, J. D.** (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* **4**, 1017-27.
- STEHNO-BITTEL, L., KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY, L., PEREZ-TERZIC, C. ET CLAPHAM, D. E.** (1995). The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca²⁺ release in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **270**, 30068-74.
- STEINHARDT, R. A. ET ALDERTON, J.** (1988). Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature* **332**, 364-6.
- STEPHANO, J. L. ET GOULD, M. C.** (1997). Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). II. Role of intracellular pH in parthenogenesis induction. *Dev Growth Differ* **39**, 99-104.
- STEVENS, I., DERUA, R., RONDELEZ, E., WAELEKENS, E., MERLEVEDE, W. ET GORIS, J.** (1999). Identification of cyk, a cyclin B2 kinase, as a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and its role during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Exp Cell Res* **252**, 303-18.
- STITH, B. J. ET MALLER, J. L.** (1984). The effect of insulin on intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **102**, 79-89.
- STITH, B. J. ET MALLER, J. L.** (1985). Increased intracellular pH is not necessary for ribosomal protein s6 phosphorylation, increased protein synthesis, or germinal vesicle breakdown in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **107**, 460-9.
- STITH, B. J. ET MALLER, J. L.** (1987). Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Exp Cell Res* **169**, 514-23.
- STITH, B. J., JAYNES, C., GOALSTONE, M. ET SILVA, S.** (1992). Insulin and progesterone increase ³²P³²O₄-labeling of phospholipids and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium* **13**, 341-52.
- STRAUSFELD, U., LABBE, J. C., FESQUET, D., CAVADORE, J. C., PICARD, A., SADHU, K., RUSSELL, P. ET DOREE, M.** (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* **351**, 242-5.
- STRAUSFELD, U., FERNANDEZ, A., CAPONY, J. P., GIRARD, F., LAUTREDOU, N., DERANCOURT, J., LABBE, J. C. ET LAMB, N. J.** (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem* **269**, 5989-6000.

Références bibliographiques

- STURGILL, T. W., RAY, L. B., ERIKSON, E. ET MALLER, J. L.** (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**, 715-8.
- SUN, L. ET MACHACA, K.** (2004). Ca(2+)(cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *J Cell Biol* **165**, 63-75.
- SUNKARA, P. S., WRIGHT, D. A. ET RAO, P. N.** (1979). Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 2799-802.
- SWENSON, K. I., FARRELL, K. M. ET RUDERMAN, J. V.** (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* **47**, 861-70.
- SZWERGOLD, B. S., BROWN, T. R. ET FREED, J. J.** (1989). Bicarbonate abolishes intracellular alkalization in mitogen-stimulated 3T3 cells. *J Cell Physiol* **138**, 227-35.
- ~T~
- TAIEB, F., THIBIER, C. ET JESSUS, C.** (1997). On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol Reprod Dev* **48**, 397-411.
- TAIEB, F.E., GROSS, S.D., LEWELLYN, A.L. ET MALLER, J. L.** (2001). Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* **11**(7): 508-13.
- TAKAHASHI, E., ABE, J., GALLIS, B., AEBERSOLD, R., SPRING, D. J., KREBS, E. G. ET BERK, B. C.** (1999). p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1. *J Biol Chem* **274**, 20206-14.
- TANG, C. Y., CHEN, Y. W., JOW, G. M., CHOU, C. J. ET JENG, C. J.** (2005). Beauvericin activates Ca²⁺-activated Cl⁻ currents and induces cell deaths in *Xenopus* oocytes via influx of extracellular Ca²⁺. *Chem Res Toxicol* **18**, 825-33.
- TANOUE, T., YAMAMOTO T., MAEDA M., ET NISHIDA, E.** (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.
- TANOUE, T. ET NISHIDA, E.** (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**, 455-62.
- TASSAN, J. P., SCHULTZ, S. J., BARTEK, J. ET NIGG, E. A.** (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**, 467-78.
- TAYLOR, M. A., ROBINSON, K. R. ET SMITH, L. D.** (1985). Intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation: role in translational control in *Xenopus* oocytes. *J Embryol Exp Morphol* **89 Suppl**, 35-51.

Références bibliographiques

- TAYLOR, S. S. ET MCKEON, F.** (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* **89**, 727-35.
- TAYLOR, S. S., HA, E. ET MCKEON, F.** (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* **142**, 1-11.
- THEODOSIOU, A. ET ASHWORTH, A.** (2002a). Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase. *Oncogene* **21**, 2387-97.
- THEODOSIOU, A. ET ASHWORTH, A.** (2002b). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3009.
- THIBIER, C., DE SMEDT, V., POULHE, R., HUCHON, D., JESSUS, C. ET OZON, R.** (1997). In vivo regulation of cyostatic activity in *Xenopus* metaphase II-arrested oocytes. *Dev Biol* **185**, 55-66.
- THOM, G., MINSHALL, N., GIT, A., ARGASINSKA, J. ET STANDART, N.** (2003). Role of cdc2 kinase phosphorylation and conserved N-terminal proteolysis motifs in cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB) complex dissociation and degradation. *Biochem J* **370**, 91-100.
- TIAN, J., KIM, S., HEILIG, E. ET RUDERMAN, J. V.** (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14358-63.
- TOKMAKOV, A. A., SATO, K. I. ET FUKAMI, Y.** (2000). Deregulation of mitogen-activated protein kinase at low pH due to a structural rearrangement of activation segment. *Biochim Biophys Acta* **1476**, 66-74.
- TOWLE, D. W., BAKSINSKI, A., RICHARD, N. E. ET KORDYLEWSKI, M.** (1991). Characterization of an endogenous Na⁺/H⁺ antiporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Exp Biol* **159**, 359-69.
- TSE, C. M., LEVINE, S. A., YUN, C. H., MONTROSE, M. H., LITTLE, P. J., POUYSSEGUR, J. ET DONOWITZ, M.** (1993). Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem* **268**, 11917-24.
- TSUJI, F. I., OHMIYA, Y., FAGAN, T. F., TOH, H. ET INOUE, S.** (1995). Molecular evolution of the Ca(2⁺)-binding photoproteins of the Hydrozoa. *Photochem Photobiol* **62**, 657-61.
- TWIGG, J., PATEL, R. ET WHITAKER, M.** (1988). Translational control of InsP3-induced chromatin condensation during the early cell cycles of sea urchin embryos. *Nature* **332**, 366-9.

~V~

- VAN BEVEREN, C., GALLESCHAW, J. A., JONAS, V., BERNIS, A. J., DOOLITTLE, R. F., DONOGHUE, D. J. ET VERMA, I. M.** (1981). Nucleotide sequence and formation of the transforming gene of a mouse sarcoma virus. *Nature* **289**, 258-62.

Références bibliographiques

- VANHAESEBROECK, B., HIGASHI, K., RAVEN, C., WELHAM, M., ANDERSON, S., BRENNAN, P., WARD, S. G. ET WATERFIELD, M. D.** (1999). Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *Embo J* **18**, 1292-302.
- VANHAESEBROECK, B. ET WATERFIELD, M. D.** (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**, 239-54.
- VARNOLD, R. L. ET SMITH, L. D.** (1990). Protein kinase C and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes. *Development* **109**, 597-604.
- VASILYEV, A., KHATER, K. ET RAKOWSKI, R. F.** (2004). Effect of extracellular pH on presteady-state and steady-state current mediated by the Na⁺/K⁺ pump. *J Membr Biol* **198**, 65-76.
- VASQUEZ, R. J., GARD, D. L. ET CASSIMERIS, L.** (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol* **127**, 985-93.
- VASQUEZ, R. J., GARD, D. L. ET CASSIMERIS, L.** (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* **43**, 310-21.
- VASSALLI, J. D., HUARTE, J., BELIN, D., GUBLER, P., VASSALLI, A., O'CONNELL, M. L., PARTON, L. A., RICKLES, R. J. ET STRICKLAND, S.** (1989). Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes Dev* **3**, 2163-71.
- VERDE, F., LABBE, J. C., DOREE, M. ET KARSENTI, E.** (1990). Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* **343**, 233-8.
- VERDE, F., DOGTEROM, M., STELZER, E., KARSENTI, E. ET LEIBLER, S.** (1992). Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* **118**, 1097-108.
- VERLHAC, M. H., KUBIAK, J. Z., WEBER, M., GERAUD, G., COLLEDGE, W. H., EVANS, M. J. ET 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. ET 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. ET MARO, B.** (2000b). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J* **19**, 6065-74.
- VISINTIN, R., PRINZ, S. ET AMON, A.** (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**, 460-3.
- VILAIN J.P.** (1977). "Maturation in vitro des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michach (Amphibien Urodèle)" *Mém Soc Zool France Symp L Gallien Progrès récents en Biologie du Développement des amphibiens*, 93-102.

- VILAIN J.P., MOUMENE M., MOREAU M.** (1989) Chloride current modulation during meiosis in *Xenopus* oocytes. *J Exp Zool*, **250**(1): p. 100-8.
- VILAIN J.P., RODEAU J. L. ET GAILLARD** (1993) Fluorescence probe measurement of intracellular pH during meiosis reinitiation by ammonia in oocytes of the mollusc *Patella Vulgata*. *Comp Biochem Physiol* **104A**, 3, 479-82.
- VOJTEK, A. B., HOLLENBERG, S. M. ET COOPER, J. A.** (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-14.
- VORLAUFER, E. ET PETERS, J. M.** (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol Biol Cell* **9**, 1817-31
- ~W~
- WAKUI, M., OSIPCHUK, Y. V. ET PETERSEN, O. H.** (1990). Receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell* **63**, 1025-32.
- WALLACE, R. A. ET STEINHARDT, R. A.** (1977). Maturation of *Xenopus* oocytes. II. Observations on membrane potential. *Dev Biol* **57**, 305-16.
- WANG, Z., SCHULTHEIS, P. J. ET SHULL, G. E.** (1996). Three N-terminal variants of the AE2 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem* **271**, 7835-43.
- WANG, J. ET LIU, X. J.** (2004). Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J Cell Sci* **117**, 5107-16.
- WANG, J., CAO, W. L. ET LIU, X. J.** (2006) Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. *Cell Cycle* **5**, 213-7.
- WASSERMAN, W. J. ET MASUI, Y.** (1975a). Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* **91**, 381-8.
- WASSERMAN, W. J. ET MASUI, Y.** (1975b). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J Exp Zool* **193**, 369-75.
- WASSERMAN, W. J. ET SMITH, L. D.** (1978). The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol* **78**, R15-22.
- WASSERMAN, W. J., PINTO, L. H., O'CONNOR, C. M. ET SMITH, L. D.** (1980). Progesterone induces a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1534-6.
- WASSERMAN, W. J. ET SMITH, L. D.** (1981). Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes. *J Cell Biol* **89**, 389-94.

Références bibliographiques

- WASSERMAN, W. J. ET HOULE, J. G.** (1984). The regulation of ribosomal protein S-6 phosphorylation in *Xenopus* oocytes: a potential role for intracellular pH. *Dev Biol* **101**, 436-45.
- WASSERMAN, W. J., FREEDMAN, A. B. ET LABELLA, J. J.** (1990). sn-1,2-diacylglycerol levels increase in progesterone-stimulated *Xenopus laevis* oocytes. *J Exp Zool* **255**, 63-71.
- WASSERMAN, W. J.** (1992). The rapid transient decrease of sn-1,2-diacylglycerol in progesterone-stimulated *Xenopus laevis* oocytes is the result of an ethanol artifact. *Dev Biol* **154**, 223-5.
- WATANABE, N., VANDE WOUDE, G. F., IKAWA, Y. ET SAGATA, N.** (1989). Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **342**, 505-11.
- WATANABE, N., HUNT, T., IKAWA, Y. ET SAGATA, N.** (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **352**, 247-8.
- WATANABE, N., BROOME, M. ET HUNTER, T.** (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *Embo J* **14**, 1878-91.
- WEBER, W. M., LIEBOLD, K. M., REIFARTH, F. W. ET CLAUSS, W.** (1995). The Ca(2+)-induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl⁻ channel. *J Membr Biol* **148**, 263-75.
- WEBER, W.** (1999). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* **1421**, 213-33.
- WEINSTEIN, S. P., KOSTELLOW, A. B., ZIEGLER, D. H. ET MORRILL, G. A.** (1982). Progesterone-induced down-regulation of electrogenic Na⁺, K⁺-ATPase during the first
- WELLS, W. A. ET MURRAY, A. W.** (1996). Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol* **133**, 75-84. meiotic division in amphibian oocytes. *J Membr Biol* **69**, 41-8.
- WELLS, N. J., WATANABE, N., TOKUSUMI, T., JIANG, W., VERDECIA, M. A. ET HUNTER, T.** (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci* **112 (Pt 19)**, 3361-71.
- WHITE, M. F., SHOELSON, S. E., KEUTMANN, H. ET KAHN, C. R.** (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem* **263**, 2969-80.
- WICKENS, M., BERNSTEIN, D. S., KIMBLE, J. ET PARKER, R.** (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* **18**, 150-7.
- WILLUMSEN, B. M., CHRISTENSEN, A., HUBBERT, N. L., PAPAGEORGE, A. G. ET LOWY, D. R.** (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**, 583-6.
- WINKLER, M. M., MATSON, G. B., HERSHEY, J. W. ET BRADBURY, E. M.** (1982). 31P-NMR study of the activation of the sea urchin egg. *Exp Cell Res* **139**, 217-22.

- WINKLER, M. M., NELSON, E. M., LASHBROOK, C. ET HERSHEY, J. W.** (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* **107**, 290-300.
- WOODGETT, J. R.** (2005). Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 150-7.
- WOODLAND, H. R.** (1974). Changes in the polysome content of developing *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* **40**, 90-101.
- WOODWARD, R. M. ET MILEDI, R.** (1992). Sensitivity of *Xenopus* oocytes to changes in extracellular pH: possible relevance to proposed expression of atypical mammalian GABAB receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **16**, 204-10.
- WORLEY, P. F., BARABAN, J. M., SUPATTAPONE, S., WILSON, V. S. ET SNYDER, S. H.** (1987). Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. Regulation by pH and calcium. *J Biol Chem* **262**, 12132-6.
- WU, M. ET GERHART, J. C.** (1980). Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **79**, 465-77.
- WU, G., MCBRIDE, D.W. ET HAMILL, O.P.** (1998). Mg²⁺ block and inward rectification of mechanosensitive channels in *Xenopus* oocytes. *Pflug Arch Eur J Physiol* **435**, 572-674.
- ~Y~
- YANG, Y., HERRMANN, C. H., ARLINGHAUS, R. B. ET SINGH, B.** (1996). Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A. *Mol Cell Biol* **16**, 800-9.
- YANG, J., BARDES, E. S., MOORE, J. D., BRENNAN, J., POWERS, M. A. ET KORNBLUTH, S.** (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**, 2131-43.
- YANG, J., WINKLER, K., YOSHIDA, M. ET KORNBLUTH, S.** (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *Embo J* **18**, 2174-83.
- YANNOUKAKOS, D., MEYER, H. E., VASSEUR, C., DRIANCOURT, C., WAJCMAN, H. ET BURSAX, E.** (1991). Three regions of erythrocyte band 3 protein are phosphorylated on tyrosines: characterization of the phosphorylation sites by solid phase sequencing combined with capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* **1066**, 70-6.
- YAO, Y. ET PARKER, I.** (1994). Ca²⁺ influx modulation of temporal and spatial patterns of inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ liberation in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **476**, 17-28.
- YAO, B., ZHANG, Y., DELIKAT, S., MATHIAS, S., BASU, S. ET KOLESNICK, R.** (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* **378**, 307-10.

YAO, Y., FERRER-MONTIEL, A. V., MONTAL, M. ET TSIEN, R. Y. (1999). Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98**, 475-85.

YEW, N., MELLINI, M. L. ET VANDE WOUDE, G. F. (1992). Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature* **355**, 649-52.

YOSHITOME, S., FURUNO, N. ET SAGATA, N. (1998). Overexpression of the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2, but not of cyclin B1, inhibits bipolar spindle formation in *Xenopus* oocytes. *Biol Cell* **90**, 509-18.

~Z~

ZACHARIAE, W., SCHWAB, M., NASMYTH, K. ET SEUFERT, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721-4.

ZACHARIAE, W. ET NASMYTH K., (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **13**(16): 2039-58.

ZETTERBERG, A. ET ENGSTROM, W. (1981a). Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts. *J Cell Physiol* **108**, 365-73.

ZETTERBERG, A. ET ENGSTROM, W. (1981b). Mitogenic effect of alkaline pH on quiescent, serum-starved cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4334-8.

ZHANG, B. H. ET GUAN, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* **19**, 5429-39.

ZHAO, X., BATTEN, B., SINGH, B. ET ARLINGHAUS, R. B. (1990). Requirement of the c-mos protein kinase for murine meiotic maturation. *Oncogene* **5**, 1727-30.

ZHAO, X., SINGH, B., ET BATTEN, B. E. (1991). The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene* **6**(1): 43-9.

ZHOU, Y. ET KING, M. L. (1996a). Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* **122**, 2947-53.

ZHOU, Y. ET KING, M. L. (1996b). RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **179**, 173-83.

ZHU, L., OHAN, N., AGAZIE, Y., CUMMINGS, C., FARAH, S. ET LIU, X. J. (1998). Molecular cloning and characterization of *Xenopus* insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinology* **139**, 949-54.

ZHU, Y., RICE, C. D., PANG, Y., PACE, M. ET THOMAS, P. (2003). 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**, 2231-6.

Références bibliographiques

ZIEGLER, D. ET MORRILL, G. A. (1977). Regulation of the amphibian oocyte plasma membrane ion permeability by cytoplasmic factors during the first meiotic division. *Dev Biol* **60**, 318-25.

ZIMMERMANN, S. ET MOELLING, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286**, 1741-4.

Rôle de l'homéostasie protonique lors de la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope.

La reprise méiotique des ovocytes de Xénope peut-être stimulée par la progestérone ou par l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures. La stimulation hormonale déclenche l'activation simultanée du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$. Par contre, l'injection de cytoplasme d'ovocytes matures entraîne la seule activation de la boucle d'auto-amplification du MPF puis l'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$, ce qui permet d'étudier séparément ces deux voies. Nous montrons, par l'utilisation d'inhibiteurs de MEK ou d'antisens dirigés contre $p39^{\text{Mos}}$, que la cinétique de la GVBD induite par injection de cytoplasme dépend de l'accumulation de $p39^{\text{Mos}}$.

Les effets de variations physiologiques de pH ont été étudiés dans différentes conditions de stimulation de la reprise méiotique: progestérone, injection de cytoplasme ou de MAPK constitutivement active. Différentes stratégies ont été utilisées pour modifier le pHi (NH_4Cl , injection de tampon à différents pH, modification du pHe). Nos résultats mettent en évidence que les événements précoces de l'activation du MPF et de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ sont accélérés par l'alcalinisation intracellulaire et retardés par l'acidification intracellulaire alors que les mécanismes d'auto-amplification du MPF ne sont pas sensibles aux variations de pHi. Cependant, l'activation de la voie $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ par le MPF est retardée par l'acidification. De même, l'acidification retarde, voire inhibe, l'entrée en phase M induite par injection de MAPK constitutivement active.

Nous montrons également que le NH_4Cl provoque une augmentation de calcium qui participe au retard de GVBD induit par l'acidification.

Role of proton homeostasis during G2/M transition in *Xenopus* oocyte.

Meiosis resumption in *Xenopus* oocyte can be stimulated by progesterone or by egg cytoplasm microinjection. Hormonal stimulation triggers simultaneous activations of MPF and $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ pathways. In contrast, egg cytoplasm microinjection results only in MPF auto-amplification loop and following $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ pathway activations. These two conditions allowed us to study separately these three pathways. We showed, by using MEK inhibitor or antisens against $p39^{\text{Mos}}$, that egg cytoplasm-induced GVBD kinetic is dependent upon $p39^{\text{Mos}}$ accumulation.

Effects of physiological pHi variations were studied in different conditions of meiotic resumption stimulation: progesterone, egg cytoplasm microinjection and constitutively active MAPK microinjection. Changes of pHi were induced by NH_4Cl , injection of buffer at different pH, pHe changes. Our results highlight that the early events of maturation (MPF and $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ activations) are accelerated by intracellular alcalinisation and are delayed by intracellular acidification. Even though MPF auto-amplification is pH-independent, the MPF induced- $p39^{\text{Mos}}\text{-Xp42}^{\text{Mpk1}}$ activation is pH-dependent. Thus acidification induced a delay, even prevented, constitutively active MAPK-induced M phase entry.

Finally, we showed that NH_4Cl induces calcium increase that contributes to pH-dependent GVBD delay.

Mots clefs : Xénope, ovocyte, méiose, progestérone, pH, calcium, MPF, MAPK, polyadénylation, Mos, GVBD, courant chlore.