



controle de la transition meiose I/meiose II et role de DOC1R au cours de l'arret CSF lors de la maturation meiotique chez la souris

Marie-Emilie Terret

► To cite this version:

Marie-Emilie Terret. controle de la transition meiose I/meiose II et role de DOC1R au cours de l'arret CSF lors de la maturation meiotique chez la souris. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT: . tel-00009435

HAL Id: tel-00009435

<https://theses.hal.science/tel-00009435>

Submitted on 9 Jun 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie
(PARIS VI)**

Spécialité Biologie du Développement

Présentée par **Marie-Emilie TERRET** pour obtenir le grade
de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse

**Contrôle de la transition méiose I/méiose II
et rôle de DOC1R au cours de l'arrêt CSF
lors de la maturation méiotique chez la
souris**

Thèse soutenue le 2 juillet 2004 devant le jury composé de

Dr Bernard MARO	Président
Dr Claude PRIGENT	Rapporteur
Dr Jacek KUBIAK	Rapporteur
Dr Isabelle VERNOS	Examinateur
Dr Thierry LORCA	Examinateur
Dr Marie-Hélène VERLHAC	Directrice de thèse

**Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie
(PARIS VI)**

Spécialité Biologie du Développement

Présentée par **Marie-Emilie TERRET** pour obtenir le grade
de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse

**Contrôle de la transition méiose I/méiose II
et rôle de DOC1R au cours de l'arrêt CSF
lors de la maturation méiotique chez la
souris**

Thèse soutenue le 2 juillet 2004 devant le jury composé de

Dr Bernard MARO	Président
Dr Claude PRIGENT	Rapporteur
Dr Jacek KUBIAK	Rapporteur
Dr Isabelle VERNOS	Examinateur
Dr Thierry LORCA	Examinateur
Dr Marie-Hélène VERLHAC	Directrice de thèse

Remerciements...

Ma thèse a été pour moi comme un long trajet en montagnes russes. Une succession de hauts et de bas dans tous les compartiments de ma vie, qui m'ont donné l'impression de la vivre à 200 à l'heure! je remercie tous ceux qui se sont embarqués dans le wagon avec moi, sans eux je ne serais pas là et grâce à eux je me suis sentie vraiment vivante pour le meilleur et pour le pire! Ces remerciements sont très longs, mais ça me paraît important de dire maintenant tout ça, car ce sera sans doute la première et la dernière fois□

Merci aux Dr **Jacek Kubiak** et **Claude Prigent**, qui, en tant que rapporteurs de ma thèse, ont émis de nombreuses critiques objectives et m'ont ainsi permis d'améliorer mon manuscrit. Merci aux Dr **Isabelle Vernos** et **Thierry Lorca** d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse et d'avoir évalué mon travail.

Merci **Bernard**. Vous m'avez prise en DEA et donc donné l'opportunité de réaliser ma thèse chez vous puis chez Marie-Hélène. Vous avez toujours été là pour m'encourager et me témoigner votre confiance. Ça a compté pour moi.

Merci **Marie-Hélène**. J'ai beaucoup appris de toi pendant 5 ans. Tu as su me former et me laisser voler vite de mes propres ailes. Tu es une grande scientifique et tu es humaine□ pour preuve le soutien que tu m'as apporté dans un de mes passages à vide. Ça m'a beaucoup touchée. J'espère avoir été à la hauteur.

Merci à tous les membres passés et présents des laboratoires Maro et Verlhac.

D'abord **Pascale**, je t'ai vue évoluer énormément depuis que je suis là, faire preuve d'initiatives et d'adaptation. Nos discussions au travail me manqueront là-bas.

Richard, j'ai beaucoup aimé parler avec toi, de politique, de toi, de moi, de films, de tes enfants. Je ne retrouverai pas de discussions aussi franches et variées là-bas.

Angélica, j'ai appris à te connaître et à voir que tu tenais à nous, tes «petits».

Sophie, je te dois beaucoup car tu m'as ramassée dans des états pas possibles un certain nombre de fois. Tu es la bonté même, et une grande scientifique également. J'emporterai là-bas un dessin d'Antoine et le goût de tes truffes au chocolat noir.

Steph, merci pour ta franchise, ton crisi-choc et la manière que tu as de relativiser et d'avoir les pieds sur terre.

Tran, j'emporterai de toi ta bonne humeur et tes éclats de rire.

Katja, merci pour ton aide tout au long de ma thèse. Une aide scientifique (pour les manips ensembles, la relecture du pavé final...) et amicale (merci pour m'avoir fait découvrir Lille et passé des bons moments avec toi et Christophe). Je te souhaite bonne chance pour ta position, tu la mérites□

Théo, tu es quelqu'un de vif et passionné par la science. Tu as apporté une bouffée d'air au labo.

Merci **Olivier**, pour tes conseils sur les post-docs, la relecture de l'article DOC1R, les photos de ton ptit bout.. Bonne chance pour la suite immédiate.

Merci les anciens, **Emilie□Golbahar** et **Nico**. Emilie tu m'as montré comment microinjecter, Golbahar tu m'as fait partager ton expérience personnelle de labo, Nico tu m'as communiqué un peu de ton optimisme.

Merci l'ancien/nouveau, **Stéphane**. Pour tes discussions sur les vieux films, tes conseils en livres, ton enthousiasme en ce qui concerne les autres. Je souhaite que tu réussisses, car si toi tu ne fais pas de science, à quoi bon.

Merci aux membres de l'**UMR7622**, passés et présents. Merci à **Rinette, Zandrine, Seb, Aude** (...) pour un certain nombre de soirées mémorables.

Merci à certaines personnes de l'**IJM** pour les beer sessions et le tournoi de foot annuel.

Merci aux trois saucisses, **Chris, J-Nyves, et Alex**, qui m'ont intégrée à leur groupe quand je suis arrivée seule à Paris et qui m'ont aidée à me sentir chez moi. Merci tout spécialement à Christophe pour son aide au laboratoire, notamment dans l'euthanasie des souris.

Merci à **Jean-René** pour avoir aussi cru en moi et pour les ballades le long des quais de la Seine. Des moments simples qui m'ont aidée à aller de l'avant.

Merci **Borhane** pour ta présence toujours là à mes côtés. Tu t'es toujours inquiété de savoir si j'allais bien. J'emporterai beaucoup de souvenirs en tout genre (une photo au man ray, une carte du moulin de la galette, plein de t-shirts (cool!)) et ton amitié.

Merci **Fred**, l'ami qui en dit beaucoup sans jamais trop parler. Tes bras de fin de soirée me manqueront, quand tu nous serres fort et que tu nous dis qu'on est tes amis et que tu nous aimes.

Merci **Annie**, pour les soirées passées ensemble, à rire ou à pleurer. Pour ton soutien en beaucoup d'occasions, ainsi qu'à Jérémie. Merci pour Bayonne que je n'oublierai pas, aux soirées chez toi avec pluie dans l'appart et jet de dicos dans le trou à mecs. Merci de m'avoir écoutée et de m'avoir laissée t'écouter.

Merci **Clem**, pour ton amitié et ton soutien tout au long de ma thèse. Je te souhaite plein de bonnes choses, pour casser la spirale négative dans laquelle tu es. Tu mérites d'être heureuse, c'est une question de temps. Je regretterai nos petits restos hebdomadaires, les dîners chez toi, et je ne verrai pas Emma grandir pour un temps.

Merci à mes copines de Lyon. **Marie, Caro, Aurel, Vigie, Nath, Elo, Nad P.** Vous avez été une de mes bouffées d'oxygène en dehors de Paris et de la bio, et ça fait du bien! Marie, je suis très fière de ta réussite professionnelle. Caro, tu as été et tu es très forte étant donné ce que la vie t'a réservé! je suis toujours là pour toi, et encore une fois je sais pourquoi j'aime le rock et le cake aux olives. Aurel je ne verrai pas ton petit Jules avant de partir, mais je t'enverrai des Kdos de là-bas. Vigie tu as la palme de la pire thèse qui ai jamais existée, chapeau pour avoir tenu 4 ans!! Nath, on se verra là-bas dans pas longtemps, et j'espère que ça te permettra de respirer, Eric aurait été très fier de toi. Elo, à quand un p'tit! Nad P, on ne se verra pas ce Noël comme d'habitude, mais ptet le prochain, aux US ou au Canada.

Merci à **Nadège**. Tu as toujours été là pour moi comme je l'ai été. On a partagé notre gouffre et notre ciel. Je suis fière de tes choix, qui n'ont jamais fait preuve de facilité. Et je suis et serai là pour t'aider à les assumer.

Merci à mes ex-lyonnais **Boris et Romain**. En DEA, c'est grâce à vous que j'ai connu et aimé Paris. Boris tu m'as accueillie chez toi toute cassée pendant 10 jours. Avec toi, c'est comme si on se voyait tout le temps, comme quoi la distance... Romain tu m'as sortie et tu as pris soin de moi. Tu m'as fait rencontrer **Alex, Louise, Arnaud, Etienne, Johanne, Julia** (...) qui m'ont beaucoup apporté. Merci à l'objectif lune! et aux soirées en face du musée Picasso!

Merci à mes parisiens. D'abord **Emily** qui m'a faite correctrice de ses romans, **Nico** qui m'a faite figurante de ses films, **Romain**, qui raconte toujours la lune, **Vincent** pour son sitcom, **Laure** pour son mot en chinois et **Flo** pour son rire et son air de J.Malkovitch.

Merci **Thib**, tu as été (et tu l'es encore) très important à une période de ma vie, et si je me suis sortie de cette période noire c'est en partie grâce à toi. Depuis tu es toujours là, et ça compte énormément pour moi. Merci à votre bande de cops aussi, **Julie** (notamment sa découverte à Bayonne), **Lionel, Fathia, Seve, Ge, Karim, Jan, Seb (the butcher), Guillaume** (...) pour m'avoir bien changé les idées en soirées.

Merci **Julien** pour ton amitié rare. Toi aussi tu m'as remontée à bloc et tu as été là dans des moments pas faciles. Je te dois beaucoup. Merci pour les nuits blanches au parc près du lac, pour les soirées arrosées chez Alain, chez Tintin, chez Huguette et à l'Inne. Merci pour le WE en Bretagne (ou en Normandie, je suis nulle en géo). Le musée Boudin restera pour moi impérissable ainsi que le mariage dans l'église en forme de nef de bateau). Je me souviendrai aussi de mon anniversaire cette année, quand je mettrai ma casquette en été à NY. Merci de m'avoir fait aussi partager ta vie avec tes soucis et tes joies. Je n'ai pas oublié 3 gros, on ira promis

Merci **Vincent**. Pour m'avoir permis de te connaître un peu, et je n'en suis pas déçue. Pour m'avoir apporté beaucoup de bonheur et de joie. Pour les sandwichs au saumon/avocat, les ballades dans Paris by day by night, le jardin des plantes avec ses fossiles, plantes en serre, cactus, zoo, galerie de l'évolution, kangourous, pour l'aquarium pas loin, pour les cinémas, les restos, les livres, les CD, les histoires... Merci d'être mon ami maintenant, j'espère que je le suis aussi.

Merci à la **famille Szeftel** pour son soutien et pour m'avoir acceptée en son sein. Un grand merci tout particulier à **Rachel**. Rachel, je suis contente de vous avoir connue, vous avez été très forte dans la maladie, et si un jour j'ai des enfants avec votre fils, je pourrai leur parler de vous comme d'une grande femme. Battez vous jusqu'au bout, nous sommes tous à vos côtés.

Merci à ma famille, à **mamie Renée** qui m'aime malgré le fait que je tue plein de souris, à **Jean, Roselyne, Jean-Ba et Nathalie** pour les réunions le dimanche. Merci à **mes parents, Chantal et Dominique**, tous les deux vous m'avez toujours laissée faire ce que je voulais, en me faisant confiance, et en me soutenant dans mon choix une fois celui-ci pris. Vous m'avez donné le goût de la curiosité intellectuelle, de lire, d'écrire, d'aller au cinéma, d'aller au musée, de voyager, et le goût des autres. Vous m'avez aimée comme je vous aime en retour. Le proverbe de papa m'a aidée ainsi que des générations de copains à moi « un cœur vaillant, rien d'impossible ». C'est grâce à vous que j'en suis arrivée là.

Enfin merci à **Jérémie**, d'être lui, d'être avec moi, d'avoir toujours été là.

SOMMAIRE

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	4
<i>INDEX DES FIGURES</i>	6
<i>INTRODUCTION</i>	7
DIVISIONS CELLULAIRES ET MATURATION MEIOTIQUE	9
I. GENERALITES	9
II. LE CYCLE CELLULAIRE	10
1. L'interphase.....	10
2. La mitose	11
3. Coordination des différentes phases du cycle cellulaire.....	11
4. Contrôle moléculaire du cycle cellulaire.....	12
41. Régulation par phosphorylation	12
42. Régulation par association aux Cyclines et par la stabilité des Cyclines	12
43. Régulation par les CKI	13
44. Régulation par localisations différentielles.....	13
III. LA MATURATION MEIOTIQUE	13
1. L'ovogénèse et les différents arrêts du cycle	13
2. Généralités sur la maturation méiotique chez la souris	14
21. Les différentes phases de la mitose	15
22. Les différents évènements de la maturation méiotique chez la souris.....	16
3. Reprise de la méiose	17
31. La levée du blocage en prophase: diminution de l'AMPc et de l'activité PKA.....	17
32. Activation et régulations du MPF en réponse à la baisse d'activité PKA	18
a) Le MPF.....	18
b) Formation de l'amorce de MPF	19
i. Formation d'une amorce de MPF à partir du pré-MPF.....	20
ii. Formation d'une amorce de MPF à partir de CDK1 monomérique	21
c) boucle d'auto-amplification.....	22
d) Différences xénope/souris	22
i. Les néo-synthèses protéiques	22
ii. Candidats pour les néo-synthèses protéiques chez le xénope	23
33. L'entrée en mitose.....	27
4. Première phase M de méiose	29
41. Cas général de la formation des fuseaux de division et de l'alignement des chromosomes.....	29
a) Les microtubules et les protéines associées	29
i. Les microtubules.....	29
ii. Facteurs stabilisants et déstabilisants.....	30
iii. Les moteurs associés.	31
b) Les différents types de microtubules dans un fuseau de division.....	32
c) Changement d'état des microtubules en début de division cellulaire.....	33
d) Mise en place du fuseau.....	33
i. cas des cellules avec centrosomes pourvus de centrioles.....	33
ii. Sans centrioles: quelles cellules?	34
iii. Un système dépendant de la chromatine.....	35
iiii. effet chromatine et la voie Ran.	36
iiii. les cibles de la voie Ran.	37
e) Les kinétochores et les mouvements des chromosomes dans le fuseau	38
i. Congression.....	39

f) Fuseaux et MAP Kinase.....	40
42- Cas particulier de l'ovocyte de souris: formation, migration du fuseau de méiose I et division asymétrique.....	41
a) Formation du fuseau de méiose I chez la souris	41
b) Migration du fuseau.....	41
i. Migration du fuseau et voie Mos/.../MAPK.....	42
ii. Migration du fuseau et Formine	43
5. Sortie de première phase M	44
51. Le point de contrôle du fuseau en mitose.....	44
a) Point de contrôle du fuseau et dégradation.....	44
b) Les cibles du point de contrôle.....	44
i. La Cycline B	44
ii. La sécurine	45
iii. La séparase, cible de la sécurine	45
c) les composants du point de contrôle.	46
d) défauts détectés.	46
e) Interactions des protéines du point de contrôle.	47
f) L'APC et ses régulations.....	49
i. APC/CDC20.....	50
ii. APC/CDH1.....	50
iii. phosphorylations et déphosphorylations de l'APC.	50
52. Alignement et séparation des chromosomes homologues en méiose I.....	51
53. Existence d'un point de contrôle du fuseau en méiose I?.....	52
a) Cas du xénopé	52
b) Cas de la levure et du nématode.....	53
c) Cas de l'homme et de la souris.....	53
6. Transition entre les deux phases M de méiose.....	56
61. CDC6.....	56
62. Rôle des Cyclines.....	57
63. Rôle de la voie Mos/.../MAPK	58
64. Wee1	59
7. Seconde phase M de méiose et arrêt CSF en métaphase II	60
71. Reformation du fuseau de division et alignement des chromosomes	60
72. Arrêt en métaphase II.....	60
a) Le CSF.....	60
b) Voie Mos/.../MAPK et établissement de l'arrêt CSF.....	61
c) Emi1 et le maintien de l'arrêt CSF.....	64
d) CDK2/Cycline E.....	65
73. fécondation.....	65
RESULTATS	67
ARTICLE 1	68
ARTICLE 2	73
ARTICLE 3	77
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	80
I. TRANSITION MEIOSE I/MEIOSE II CHEZ LA SOURIS	81
PERSPECTIVES	82
II. NOUVEAUX SUBSTRATS DES MAPK DANS L'OVOCYTE DE SOURIS ET ARRET CSF	83
PERSPECTIVES	83
1. Relation entre DOC1R et l'importine- α	83
2. Relation entre DOC1R et les microtubules	84
3. Relation entre fonction, régulation et localisation de DOC1R	84
4. Voie Ran et relation avec DOC1R	86
5. Rôle en mitose ?	87

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	89
ANNEXES.....	120
<i>Annexe 1.....</i>	<i>121</i>
<i>Annexe 2.....</i>	<i>122</i>
<i>Annexe 3.....</i>	<i>123</i>
<i>Annexe 4.....</i>	<i>124</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

APC/C- Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
Bub- Budding uninhibited by benomyl
CAK- CDK Activating Kinase
CDC- Cell Division Cycle
CDH1- CDC20 Homolog 1
CDK- Cyclin Dependent Kinase
CENP- CENtromeric Protein
Cip- Cyclin dependent kinase Inhibitor Protein
CLIP- Cytoplasmic LInker Protein
CKI- Cyclin dependent Kinase Inhibitor
CPEB- Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CRS- Cytoplasmique Retention Sequence
Csm1- Chromosome segregation in meiosis 1
CSF- CytoStatic Factor
Cut- Cells untimely torn
D box- Destruction box
dbcAMP- dibutyryl cyclic AMP
DOC1R- Deleted in Oral Cancer 1 Related
Eg- Egg
Emi1- Early mitotic inhibitor 1
ERK- Extracellular Regulated Kinase
Formin- limb deformity
GV- Germinal Vesicle
GVBD- Germinal Vesicle BreakDown
INCENP- INner CENtromere Protein
LH- Hormone Luténésante
Lrs4- loss of rDNA silencing 4
M (I, II)- Métaphase (I, II)
Mad- mitotic arrest deficient
Mam 1- Monopolar microtubule attachment during meiosis I
MAP- Microtubule Associated Protein
MAPK- Mitogen Activated Protein Kinase
MCAK- Mitotic Centromere Associated Kinesin
MCM- Mini Chromosome Maintenance proteins
MEK- MAPK ERK Kinase
MEI-S332- Meiotic-S332
MISS- MAPK Intercating and Spindle Stabilizing
MKLP 1- Mitotic Kinesin Like Protein 1
MPF- M phase Promoting Factor
Mps 1- Monopolar spindle 1
MTOC- MicroTubule Organizing Center
Myt 1- Membrane associated and tyrosine/threonine specific 1
Ndc10- Nuclear division cycle 10
NES- Nuclear Export Signal
NLS- Nuclear localisation Signal
Nod- NO distributive disjunction
NuMA- Nuclear protein that associates with the Mitotic Apparatus

Op 18- Oncoprotein 18
ORC- Origin Recognition Complex
p90^{RSK} - p90 Ribosomal S6 Kinase
Pds1- Precocious dissociation of sister chromatids 1
PIM- PIMples
PKA- cyclic AMP dependent Protein Kinase
Phase G- Gap
Phase M- Mitose
Phase S- Synthèse
PP2A- Phosphatase 2A
PTTG- Pituitary Tumor Transforming Gene
Ran-GAP- Ran GTPase Activating Protein
RCC1- Regulator of Chromosome Condensation 1
Rec8- Recombination protein 8
Ringo- Rapid inducer of G2/M in oocytes
RNAi- RNA interférence
Rod- Rough deal
SCF- Skp1-Cullin-F box protein
Sugoshin- guardian spirit en japonais.
Smc- Structural maintenance of chromosomes
Scc- Sister chromatid cohesion
Spo- Sporulation protein
TPX2- Targeting Protein for XKLP2
TuRC- Tubulin Ring Complex
XCTK 2- Xenopus C-Terminal Kinesin 2
XKCM 1- Xenopus Kinesin Catastrophe Modulator 1
XKid- Xenopus Kinesin with DNA binding domain
XKLP (1,2)- Xenopus Kinesin-Like Protein B(1, 2)
ZW10- Zeste White 10

INDEX DES FIGURES

- Figure 1: le cycle cellulaire
Figure 2: l'ovogénèse chez les vertébrés
Figure 3: les différents blocs
Figure 4: la mitose
Figure 5: l'anaphase
Figure 6: la maturation méiotique chez la souris
Figure 7: la levée du bloc en prophase
Figure 8: mise en évidence de l'activité MPF chez l'amphibien par transfert de cytoplasme
Figure 9: activation initiale du MPF décrite chez le xénope
Figure 10: l'auto-amplification du MPF
Figure 11: l'activation du MPF chez le xénope et la souris
Figure 12: l'activité MPF au cours de la maturation méiotique chez la souris
Figure 13: candidats pour les néo-synthèses protéiques chez le xénope
Figure 14: l'activité MAPK au cours de la maturation méiotique chez la souris
Figure 15: microtubules et instabilité dynamique
Figure 16: centrosome et polarité des microtubules
Figure 17: les moteurs
Figure 18: protéines responsables des différents mouvements existant dans le fuseau
Table 1: les moteurs microtubulaires
Table 2: les moteurs chromosomiques
Figure 19: les différentes sortes de microtubules du fuseau
Figure 20: le cycle du centrosome
Figure 21: régulation de la RAN GTPase
Figure 22: l'effet chromatine
Figure 23: mouvements des chromosomes sur le fuseau de division
Figure 24: formation des fuseaux de méiose I
Figure 25: rôles des MAPK au cours de la maturation méiotique chez la souris
Figure 26: rôle de la voie Mos/.../MAPK dans la migration du fuseau de MI
Figure 27: transition métaphase/anaphase en mitose
Figure 28: senseurs du point de contrôle du fuseau aux kinétochores en mitose
Figure 29: les régulations de l'APC
Figure 30: orientation des chromatides sœurs en mitose et méiose
Figure 31: cas de l'homme et des souris XO
Figure 32: sortie de méiose I et réPLICATION
Figure 33: mise en évidence de l'activité CSF chez l'amphibien par transfert de cytoplasme
Figure 34: voie MAPK et arrêt CSF
Figure 35: contrôle de l'arrêt en métaphase II
Figure 36: principales différences entre les ovocytes de xénope et de souris
Figure 37: DOC1R co-immunoprécipite avec l'importine α d'extraits d'ovocytes de xénope
Figure 38: hypothèse de travail
Figure 39: mutagénèse de DOC1R
Figure 40: phénotypes obtenus après injection des mutants DOC1R de phosphorylation

INTRODUCTION

Au cours de ma thèse, j'ai étudié des mécanismes régulant la maturation méiotique de l'ovocyte de souris, processus essentiel à la formation des gamètes femelles haploïdes appelés ovules. Si le déroulement du cycle cellulaire et ses mécanismes de régulation sont connus et étudiés depuis longtemps, les processus contrôlant la maturation méiotique le sont moins. La mitose conduit à l'obtention de deux cellules filles ayant le même contenu en ADN et permet la multiplication clonale des cellules. Des dérèglements de ce processus peuvent conduire à la multiplication anarchique des cellules et à un processus de cancérisation. La méiose est une succession de deux divisions cellulaires sans synthèse d'ADN « intermédiaire », la première division étant réductionnelle et la seconde équationnelle, afin d'obtenir des gamètes ayant la moitié du contenu en ADN par rapport à la cellule mère. Des défauts dans ce processus peuvent conduire à des problèmes de stérilité féminine (Bergere et al., 2001), ainsi qu'à la formation d'embryons aneuploïdes et trisomiques. Au cours de la mitose, l'ADN de la cellule s'organise en chromosomes condensés qui s'alignent sur la plaque métaphasique du fuseau de division afin d'être ségrégés en deux lots équivalents à l'issue de la division cellulaire. Un mécanisme de contrôle bloque la cellule en métaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur la plaque métaphasique, évitant ainsi une séparation précoce et anarchique des chromatides sœurs et assurant que le contenu en ADN est bien séparé en deux fractions égales. Ce mécanisme de contrôle inhibe l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome, une ubiquitine ligase) qui ne peut pas cibler ses substrats pour la dégradation. En méiose I, des résultats contradictoires, selon les espèces, ont été publiés quant à l'existence d'un mécanisme de contrôle de ce type (passant par l'inhibition de l'APC/C) contrôlant la séparation des chromosomes homologues. Chez des espèces comme le nématode et la levure, il a été montré que l'APC/C actif et la séparase (une activité indirectement régulée par ce mécanisme de contrôle en mitose) sont requis pour effectuer la première division de méiose, alors que chez le xénope l'APC/C actif n'est pas requis. Chez la souris, organisme le plus proche de l'homme parmi ceux étudiés, l'existence d'un mécanisme de contrôle de ce type était très controversée quand j'ai commencé mon étude. J'ai montré que l'activité séparase est requise pour effectuer la transition métaphase/anaphase au cours de la première division de méiose, suggérant qu'un mécanisme de contrôle dépendant de l'activité de l'APC/C est fonctionnel et requis chez la souris pour effectuer la transition méiose I/méiose II.

A la fin de la maturation méiotique, l'ovocyte reste bloqué en métaphase de seconde division de méiose, en attente de la fécondation. Cet arrêt est caractéristique des ovocytes de vertébrés et est très important. Chez la souris par exemple, les ovocytes qui dépassent cet arrêt

s'activent parthénogénétiquement et prolifèrent anarchiquement, induisant des carcinomes ovariens. Ce blocage est dû à une activité CSF (CytoStatic Factor) dont la composition moléculaire n'est pas totalement connue à ce jour. La voie de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) contrôle de nombreux évènements de la maturation méiotique et est requise pour l'arrêt en métaphase II. Si les rôles des MAPK sont connus dans l'ovocyte, peu de substrats capables de médier ces rôles le sont. Au début de notre étude, seul un substrat des MAPK était connu dans l'ovocyte de souris : p90^{RSK}. p90^{RSK} avait été mise en évidence chez le xénope comme intervenant dans l'arrêt en métaphase de seconde division méiotique. Etant donné l'importance des MAPK lors de la maturation méiotique de l'ovocyte de souris, il nous paraissait important de découvrir de nouveaux substrats des MAPK dans l'ovocyte de souris. Pour cela, notre laboratoire a effectué un crible double-hybrid avec la MAPK comme appât. Un des clones positifs isolés était DOC1R (Deleted in Oral Cancer 1 Related). J'ai montré que DOC1R est régulée par phosphorylation au cours de la maturation méiotique et que ces phosphorylations sont dues en partie à la voie des MAPK. DOC1R se localise sur les fuseaux de division en première et seconde divisions de méiose et l'extinction de l'expression de la protéine par ARN interférence conduit à un phénotype drastique dans les ovocytes arrêtés en métaphase de seconde division de méiose: des asters de microtubules se forment partout dans le cytoplasme et aux pôles des fuseaux. La localisation et les phénotypes obtenus suggèrent que DOC1R contrôle l'organisation des microtubules au cours de l'arrêt CSF.

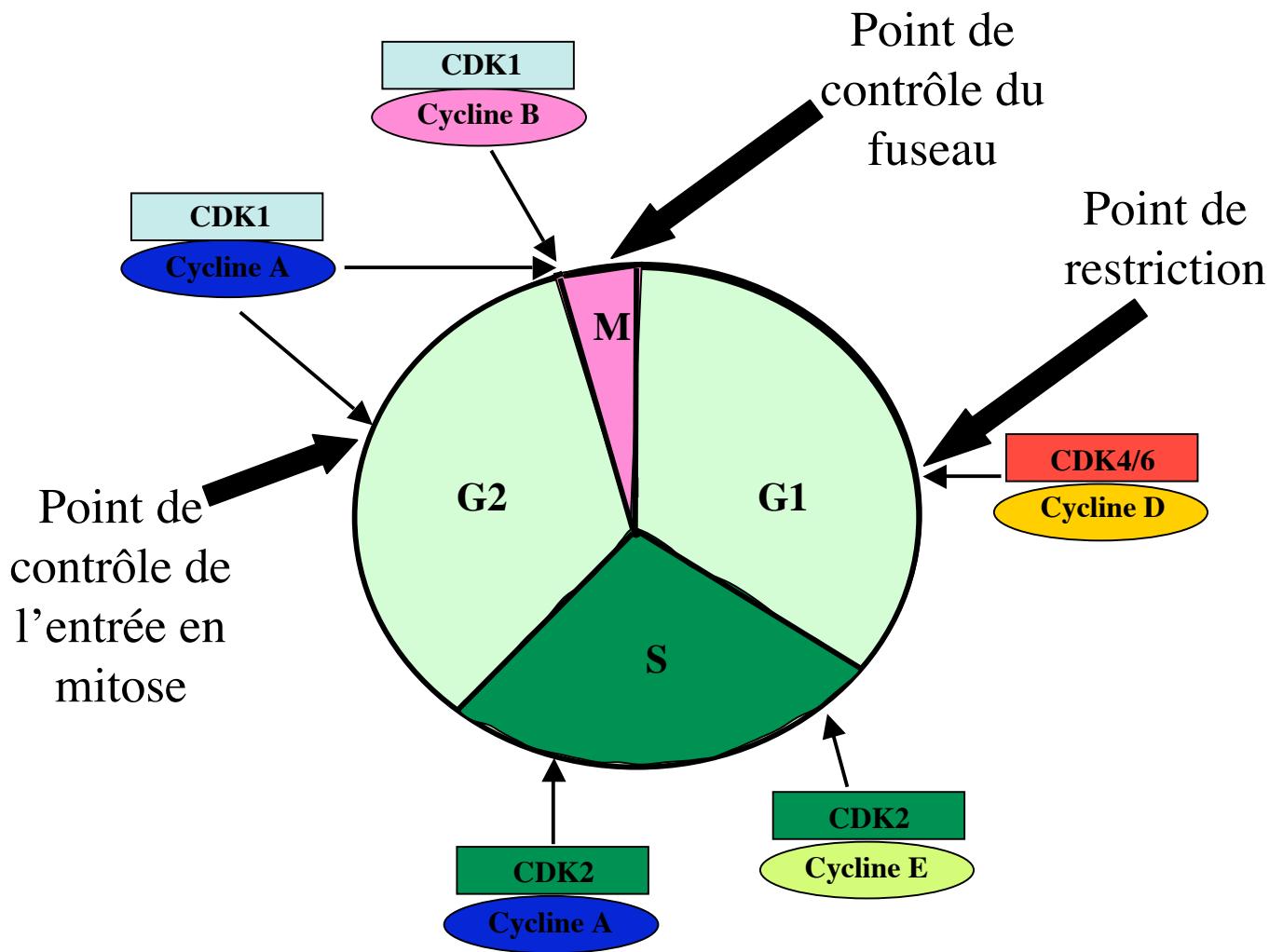
DIVISIONS CELLULAIRES ET MATURATION MEIOTIQUE

I. GENERALITES

Le cycle cellulaire eucaryote est l'ensemble des processus qui permet aux cellules de se multiplier de façon clonale. Ainsi un organisme humain adulte est constitué de milliards de cellules, provenant toutes d'une même cellule: l'ovule fécondé. Avant qu'une cellule puisse se diviser, elle doit atteindre une taille critique et dupliquer son matériel génétique. Puis elle sépare ses chromosomes de manière équivalente entre les deux cellules filles. Tous ces processus sont coordonnés durant le cycle cellulaire. La mitose vise à répartir dans les cellules somatiques le patrimoine génétique, doublé lors de la phase de réplication, de manière équivalente dans chaque cellule fille. La méiose est une forme de division très particulière qui concerne les cellules germinales. Elle a pour but de répartir une version haploïde du génome

Figure 1: le cycle cellulaire

Mitose: M



Interphase: G1, S, G2

dans les quatre cellules filles issues de deux séries de divisions méiotiques sans synthèse d'ADN intermédiaire. Elle permet le brassage génétique essentiel à diversité de l'espèce. La compréhension des mécanismes régulant la mitose et la méiose est donc fondamentale.

Tout au long de ma thèse, j'utiliserai des termes abrégés qui sont explicités à la page « liste des abréviations ».

II. LE CYCLE CELLULAIRE

Le mode de division cellulaire historiquement le plus étudié est la mitose, qui s'inscrit dans le cadre plus général du cycle cellulaire. Afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre la mitose et la méiose, je vais brièvement introduire les événements composant le cycle cellulaire, qui comporte deux phases principales: l'interphase et la mitose (figure 1).

1. L'interphase

L'interphase est la phase de croissance de la cellule. Elle est subdivisée en trois phases, la phase G1 (G pour Gap), S (phase de synthèse de l'ADN) et G2 (figure 1). Durant la phase G1, la cellule croît. La synthèse d'ARNm et de protéines est très élevée. Lorsque la cellule atteint une taille critique, elle entre en phase S, phase réplicative.

Lors de la phase réplicative, les deux brins d'ADN complémentaire se séparent et leur séquence est recopiée, donnant naissance à deux chromatides identiques, formant un chromosome. Au fur et à mesure de leur formation, les chromatides sœurs restent physiquement liées grâce à l'assemblage de complexes protéiques nommés cohésines. Cela permet aux chromatides de ne pas se mélanger, afin que chaque cellule fille hérite d'une chromatide soeur. Ces complexes contiennent au moins quatre protéines: Smc1, Smc3, Scc1 et Scc3. Ces cohésines sont retrouvées chez tous les eucaryotes (dont le génome a été séquencé), indiquant que le mécanisme de liaison des chromatides sœurs entre elles est très conservé. A l'issue de la phase S, chaque chromosome est donc formé de deux chromatides sœurs identiques liées par les complexes de cohésines. Parallèlement à la réPLICATION de l'ADN, s'effectue la réPLICATION du centrosome. Le centrosome est formé de deux centrioles et de matériel péricentriolaire; il constitue le centre de nucléation des microtubules (MTOC, MicroTubule Organizing Center). Les MTOCs organisent le réseau microtubulaire au cours des phases du cycle.

Durant la phase G2, la réPLICATION de l'ADN est vérifiée afin de réparer les erreurs éventuelles survenues lors de la synthèse.

2. La mitose

La mitose ou phase M est une division clonale qui concerne les cellules somatiques et les cellules germinales pré-méiotiques. En phase M, l'ADN est sous forme condensée et les chromosomes s'individualisent et s'alignent sur la plaque équatoriale du fuseau de division. Ce fuseau est bipolaire et formé de deux centrosomes ou de deux MTOCs, un à chaque pôle et les microtubules qui le constituent sont dans un état métaphasique: courts et extrêmement dynamiques. Les chromatides sœurs constituant un chromosome sont ensuite séparées conduisant à la formation de deux cellules filles ayant le même contenu en ADN que la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G1 et le cycle cellulaire est bouclé. Je détaillerai les évènements morphologiques de la mitose ultérieurement.

3. Coordination des différentes phases du cycle cellulaire

La durée globale du cycle cellulaire ainsi que la durée respective de chaque phase du cycle varient suivant les types cellulaires. Les cellules en phase G1 ne poursuivent pas toujours le cycle cellulaire. Elles peuvent en effet quitter le cycle cellulaire et entrer en phase de quiescence (phase G0) si les conditions extérieures ne sont pas propices à leur multiplication. Les différentes phases du cycle cellulaire sont donc précisément coordonnées. La succession des phases doit être respectée et une phase doit être achevée avant l'enclenchement de la phase suivante. Des erreurs de coordination peuvent conduire à une instabilité génomique observée dans les cellules cancéreuses. Pour coordonner le cycle cellulaire, il existe des points de contrôle ou « checkpoints » qui surveillent le bon déroulement du cycle. Ces points de surveillance assurent le contrôle de qualité du cycle cellulaire. En cas d'anomalies, ces mécanismes de surveillance stoppent la progression du cycle et activent soit des processus de réparation, soit de mort cellulaire par apoptose. Schématiquement, ce système de régulation est organisé en trois niveaux, avec des détecteurs (qui sont sensibles aux anomalies de l'ADN, aux défauts du cytosquelette ou aux perturbations métaboliques), des transmetteurs (qui sont généralement des protéines kinases et des molécules régulatrices fonctionnant comme des adaptateurs) et enfin des effecteurs, qui modifient directement les molécules impliquées dans

le déroulement du cycle cellulaire, la réPLICATION et la réPARATION de l'ADN, ou l'apoptose (pour revue voir Pommier and Kohn, 2003).

Trois points de contrôle du cycle cellulaire ont été pour l'instant mis en évidence (figure 1). Le premier intervient avant la transition G1/S, c'est le point « START » chez la levure, appelé point de restriction chez les eucaryotes supérieurs. Il dépend de la compétence de la cellule à entrer en phase S, donc de sa taille, de la qualité de l'ADN et de facteurs externes. Le second intervient à la transition G2/M et surveille si l'ADN a été endommagé au cours de la réPLICATION. Le troisième se situe en mitose et vérifie que les cellules filles reçoivent la même quantité d'ADN en vérifiant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique du fuseau de division. Je détaillerai ce dernier point de contrôle plus tard.

4. Contrôle moléculaire du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est contrôlé par l'activité des complexes CDK/Cyclines. La CDK (Cyclin Dependent Kinase) est la sous-unité catalytique possèdant l'activité kinasique et la Cycline est la sous-unité régulatrice. Ces kinases vont phosphoryler des substrats spécifiques en des phases précises du cycle. La concentration intracellulaire des protéines CDK ne variant pas au cours du cycle cellulaire, l'activité des complexes CDK/Cyclines est modulée par quatre types de régulations:

41. Régulation par phosphorylation

Il existe deux niveaux de régulation par phosphorylation les complexes CDK/Cyclines: une phosphorylation inhibitrice (sur les résidus Tyrosine et/ou Thréonine) ou activatrice (sur les résidus Thréonine ou Sérine) directe sur les CDK, ou bien une régulation indirecte via la phosphorylation inhibitrice ou activatrice du complexe CDK/Cycline.

42. Régulation par association aux Cyclines et par la stabilité des Cyclines

Les Cyclines sont caractérisées par leur apparition périodique à des moments précis du cycle. Ces variations sont fonction des niveaux de transcription des ARNm codant pour les Cyclines et de la dégradation de ces protéines. D'une manière générale, les Cyclines favorisent l'expression des Cyclines de la phase suivante et répriment l'expression ou favorisent la dégradation des Cyclines de la phase précédente (Murray, 2004). Des mécanismes de dégradation de ces protéines sont mis en place afin d'assurer la progression de la cellule dans

le cycle. La dégradation des Cyclines permet l'inactivation du complexe CDK/Cycline correspondant (je détaillerai ce mécanisme de dégradation plus loin).

L'activité des CDK est régulée par leur liaison aux Cyclines. Cette liaison induit des changements conformationnels de la CDK permettant l'accès au site catalytique et aux sites de phosphorylation activateurs ou inhibiteurs pour certaines CDK.

43. Régulation par les CKI

Les inhibiteurs de CDK, les CKI, assurent un autre niveau de régulation des complexes CDK/Cyclines. Ces CKI exercent leur activité inhibitrice en interagissant avec les CDK ou le complexe CDK/Cycline. Ils peuvent bloquer l'engagement d'une phase, mais peuvent également agir au cours d'une phase du cycle cellulaire.

44. Régulation par localisations différentielles

La localisation intracellulaire des complexes CDK/Cycline dépend de la Cycline elle-même. Lors de certaines phases du cycle, les partenaires étant situés dans des compartiments différents de la cellule, ils ne peuvent pas interagir. Je détaillerai ce mode de régulation plus loin.

III. LA MATURATION MEIOTIQUE

Les mécanismes et acteurs moléculaires de la mitose sont globalement conservés en méiose, mais sont utilisés de façon différente ou avec des partenaires spécifiques. Tous ces processus étant bien connus et étudiés en mitose, la comparaison mitose/méiose est fondamentale pour la compréhension des mécanismes en jeu lors de la méiose. J'effectuerai donc des comparaisons entre ces deux types de divisions très fréquemment.

1. L'ovogénèse et les différents arrêts du cycle

La méiose femelle permet l'obtention de gamètes haploïdes. Elle fait partie de l'ovogénèse. L'ovogénèse est l'ensemble des processus qui conduisent une cellule germinale primordiale femelle à devenir apte à la fécondation. L'ovogénèse commence au cours de la vie embryonnaire. Les cellules germinales primordiales colonisent les gonades embryonnaires et prolifèrent par divisions mitotiques. Après cette phase de prolifération, les ovogonies

Figure 2: l'ovogénèse chez les vertébrés

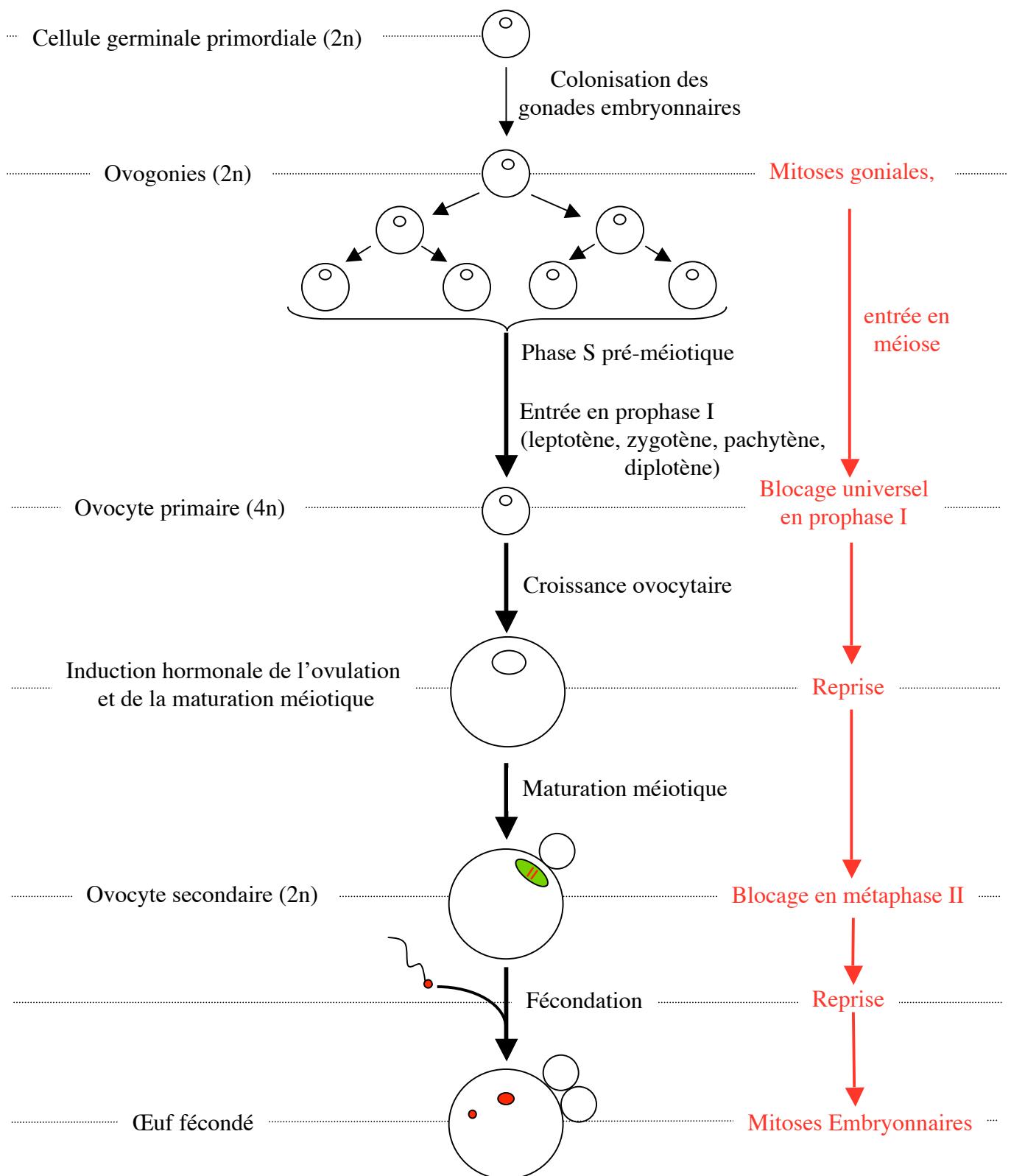
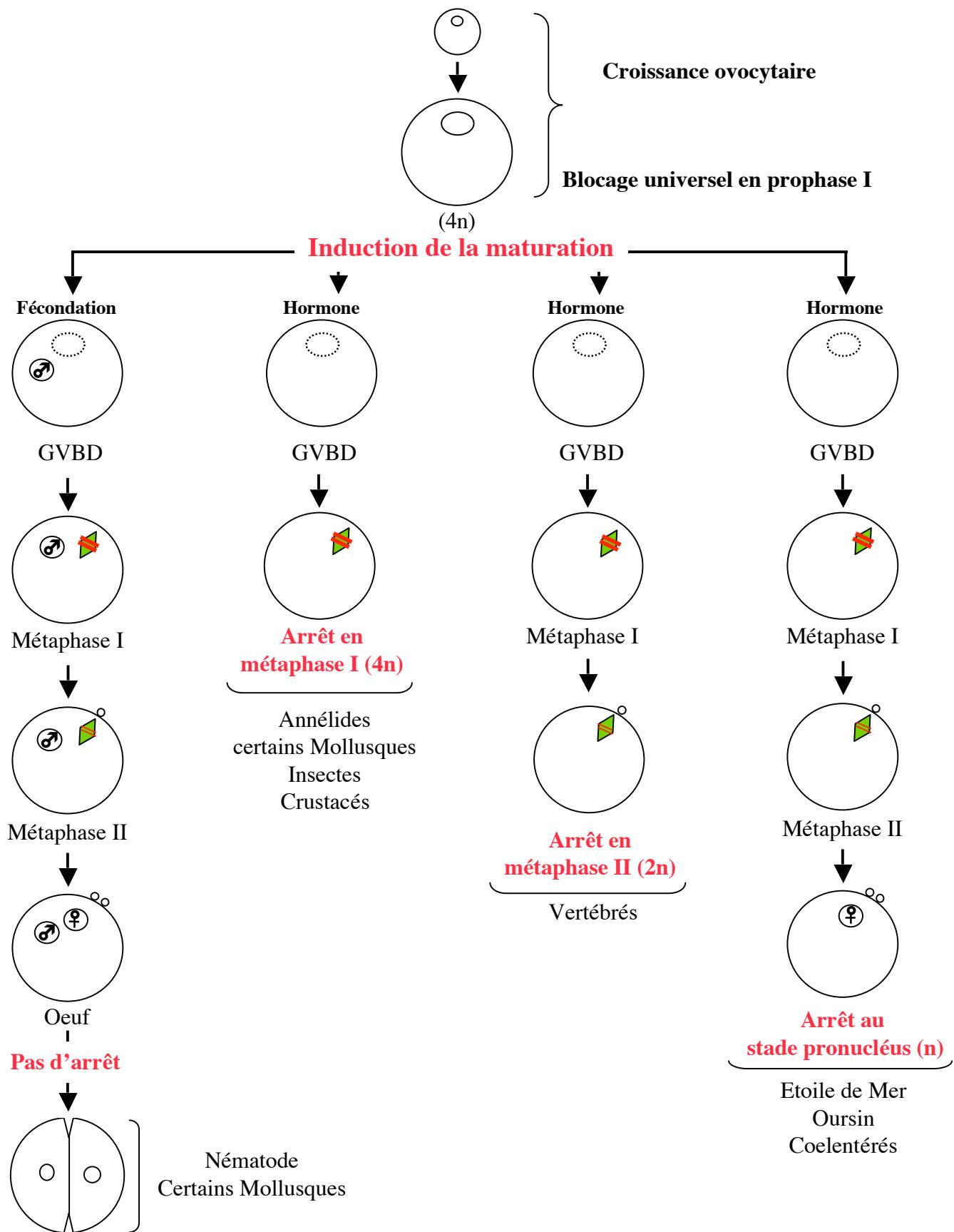


Figure 3: les différents arrêts



effectuent leur dernière phase S dite pré-méiotique et entrent en prophase de première division de méiose (figure 2). La prophase de l'ovocyte peut être subdivisée en quatre phases. En phase **leptotène**, les chromosomes homologues commencent à se condenser, en **zygotène** ils s'apparent sur toute leur longueur formant une structure appelée « bivalent » et en **pachytène** ils échangent par recombinaison homologue des fragments de chromatides issues des chromosomes maternels et paternels. Ces cellules se bloquent au stade **diplotène** de prophase I de première division de méiose et sont appelées ovocytes primaires ou ovocytes I. Ce blocage est universel dans le règne animal et peut être très long (jusqu'à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Il permet l'accumulation d'ARNm maternels et de protéines (et de vitellus comme c'est le cas chez le xénope) requises pour le développement futur de l'embryon après fécondation. L'ovocyte est alors compétent pour reprendre sa méiose (figure 2).

L'hormone de l'ovulation, la LH (hormone luténisante) chez les vertébrés, induit simultanément la maturation méiotique et l'ovulation en agissant sur les cellules folliculaires. Ces cellules répondent à ce signal hormonal par un « signal secondaire » qui agit sur l'ovocyte et déclenche la maturation méiotique. Chez les mammifères par exemple, la reprise de la méiose peut être induite *in vitro* simplement en séparant l'ovocyte des cellules folliculaires, suggérant l'existence d'un signal inhibiteur issu de ces cellules. Les cellules folliculaires émettent en effet des prolongements cytoplasmiques qui entourent l'ovocyte établissant des jonctions communicantes avec l'ovocyte. Chez d'autres espèces comme le xénope, ce signal secondaire est de type hormonal, les cellules folliculaires sécrétant de la progestérone.

Après la reprise de la méiose, l'ovocyte se bloque une seconde fois. Le stade de ce second arrêt est variable selon les espèces: en métaphase de première division méiotique chez de nombreux invertébrés (certaines annélides, certains mollusques, des arthropodes), en métaphase de seconde division de méiose chez les vertébrés et au stade pronoyau chez les coelenthérés et les échinodermes (figure 3). La progression de l'ovocyte du premier blocage en prophase I de méiose au second est appelée « maturation méiotique ».

2. Généralités sur la maturation méiotique chez la souris

Pour permettre d'apprécier les différences entre mitose et méiose, je décrirai tout d'abord les différentes phases de la mitose, puis les différents événements de la maturation méiotique chez la souris.

Figure 4: la mitose

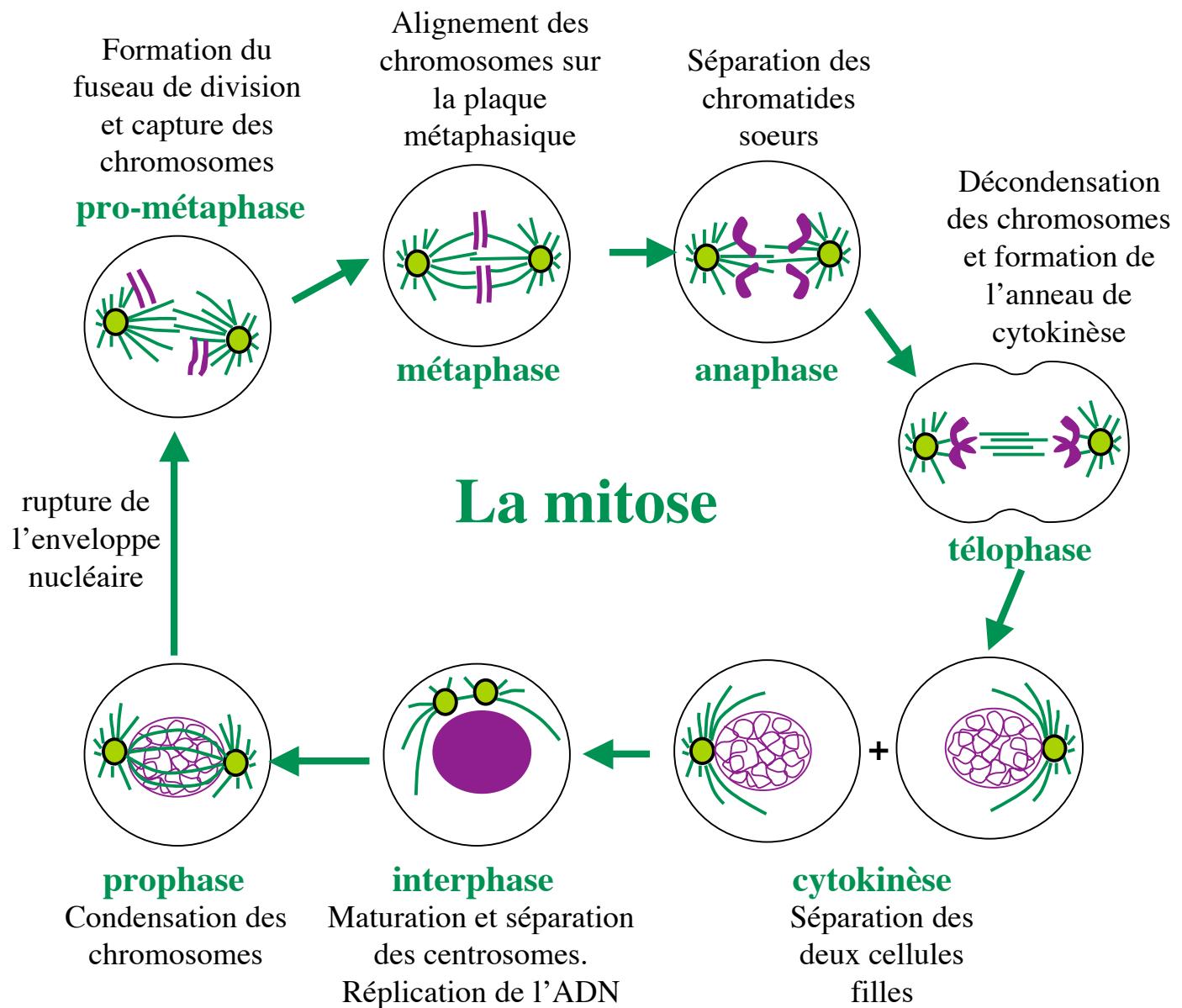
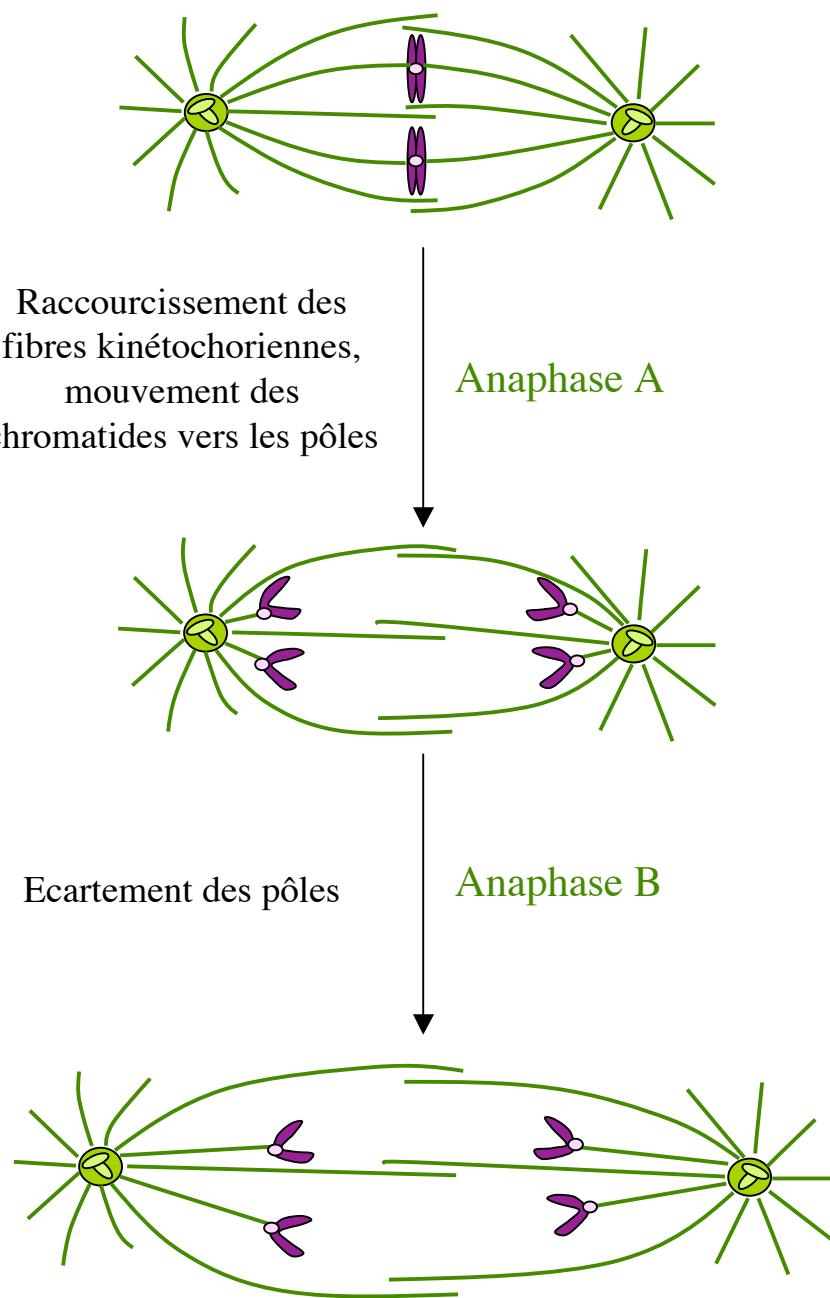


Figure 5: l'anaphase



21. Les différentes phases de la mitose

La mitose se découpe en cinq phases: la prophase, la pro-métaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (figure 4).

En **prophase**, l'ADN se condense, suite à la phosphorylation de protéines associées à l'ADN comme l'Histone H3 et grâce à l'intervention des condensines (Losada and Hirano, 2001). Les centrosomes se séparent et migrent aux pôles opposés du noyau pour former les futurs pôles du fuseau de division, leur activité de polymérisation des microtubules augmente et les microtubules interphasiques deviennent plus labiles (Wittmann et al., 2001) (figure 4).

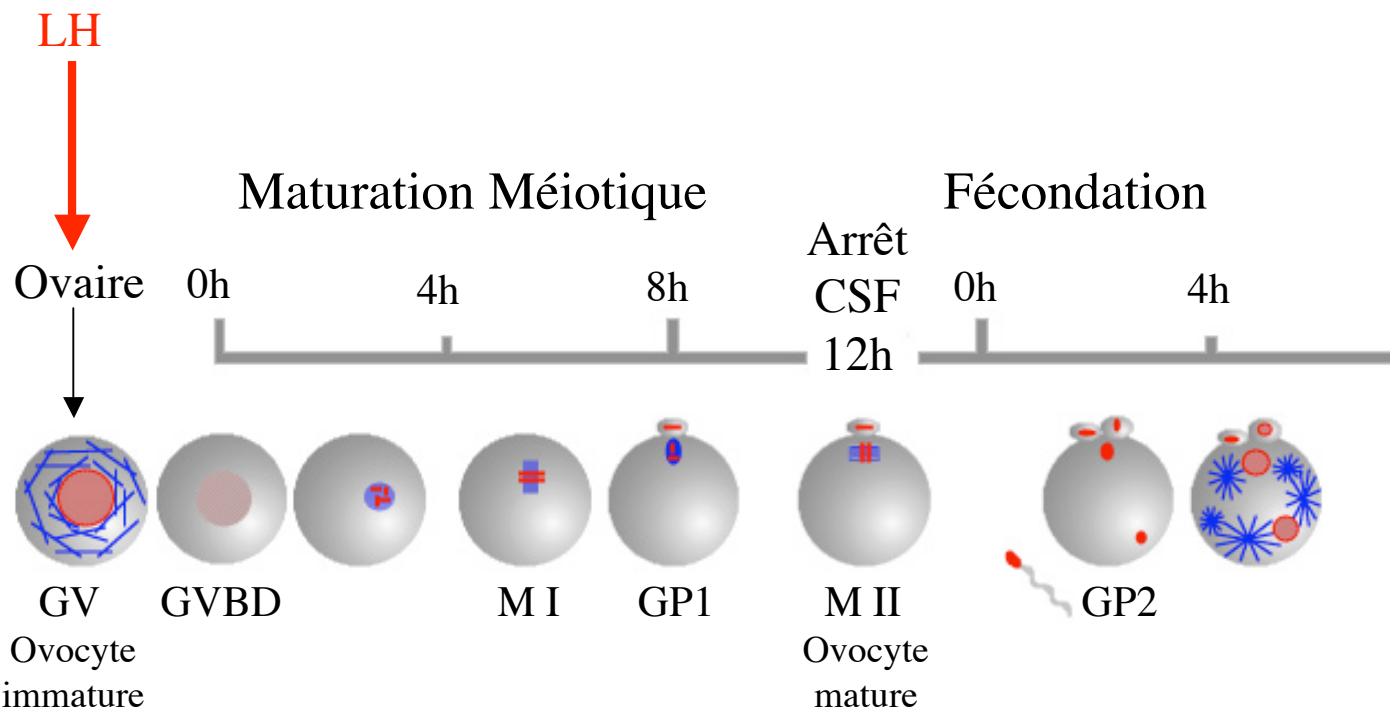
En **pro-métaphase**, les lamines nucléaires sont phosphorylées par le complexe CDK1/Cycline B (Nigg, 1995) et solubilisées ce qui est corrélé à la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les autres composants des membranes cellulaires internes (Golgi, Reticulum endoplasmique) sont eux aussi fragmentés et vésicularisés; les mitochondries se regroupent autour du fuseau. Les centrosomes nucléent des microtubules et forment des asters de part et d'autre du noyau, reliés par des microtubules interpolaires, aidant au maintien de la bipolarité du fuseau. Les chromosomes condensés commencent à s'attacher aux microtubules du fuseau, débutant le mouvement de congression (figure 4). Les chromosomes attachés de façon bipolaire oscillent dans le plan médian du fuseau alors que les chromosomes attachés monopolairement attendent d'être contactés par un microtubule issu du pôle opposé pour migrer vers l'équateur du fuseau (Kapoor and Compton, 2002). Les mécanismes de mise en place du fuseau de division ainsi que ceux concernant l'alignement des chromosomes seront détaillés ultérieurement.

En **métaphase**, les chromosomes sont attachés de façon bipolaire et oscillent dans le plan médian du fuseau. A l'issue de la congression, les chromosomes sont donc tous alignés sur la plaque métaphasique du fuseau de division (figure 4).

A l'**anaphase** les chromatides sœurs formant le chromosome se séparent, donnant lieu à une division équationnelle. Les chromatides sœurs migrent vers l'un des pôles du fuseau (anaphase A), puis les pôles du fuseau s'éloignent l'un de l'autre suite à l'allongement des microtubules interpolaires (anaphase B) (figure 5). La cellule commence à s'allonger. La membrane plasmique s'invagine au niveau équatorial, formant le sillon de division (figure 4).

La **télophase** correspond à la séparation physique de la cellule. L'ADN se décondense et les enveloppes nucléaires se reforment par fusion des vésicules membranaires. En fin de télophase, la cellule se sépare en deux cellules filles par contraction du sillon de division.

Figure 6: la maturation méiotique chez la souris



GV: Vésicule Germinative
LH: Hormone Luténisante
GVBD: Germinal Vesicle BreakDown
MI: Métaphase de première division méiotique
GP1: globule polaire 1
MII: Métaphase de seconde division méiotique
GP2: globule polaire 2
CSF: CytoStatic Factor

- Microtubules
- Chromatine

C'est la cytokinèse. Un anneau contractile formé de microfilaments d'actine effectue la constriction de la cellule, permettant la séparation physique des deux cellules filles (figure 4).

Trois différences essentielles existent entre la maturation méiotique et la mitose (pour revue voir annexe 1, Verlhac et al., 2001). Lors de la première division méiotique, les chromosomes homologues paternels et maternels sont ségrégés, alors qu'en mitose, les chromatides sœurs formant un chromosome sont séparées. Il n'y a pas de synthèse d'ADN entre les deux divisions méiotiques alors qu'une mitose est toujours suivie d'une phase S. Enfin à l'issue de la maturation méiotique, l'ovocyte reste bloqué physiologiquement en attendant la fécondation, alors que la mitose s'achève toujours, sauf si une erreur est survenue lors de la métaphase, le blocage étant alors induit par des mécanismes de contrôle.

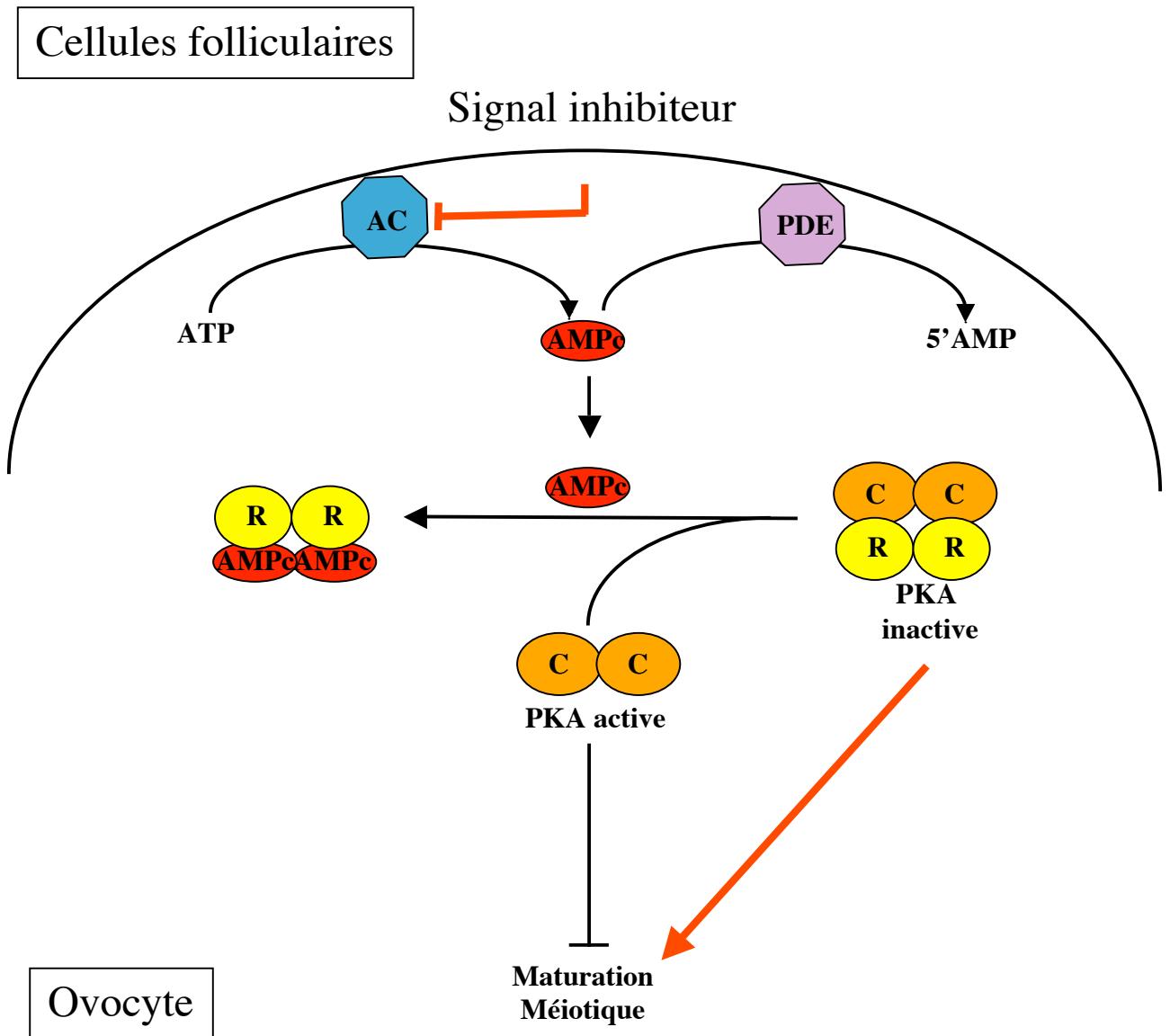
22. Les différents événements de la maturation méiotique chez la souris.

En prophase, les chromosomes échangent du matériel génétique, en réparant les cassures de l'ADN double-brin. Ce processus est appelé recombinaison méiotique. Les chromosomes forment des chiasmas et échangent du matériel entre les chromatides issues des chromosomes paternels et maternels. Le brassage génétique qui a lieu lors de la recombinaison homologue contribue au maintien de la diversité génétique au sein d'une espèce.

Dans les ovaires, les ovocytes sont bloqués en **prophase I** de méiose au stade diplotène (figure 6). Les ovocytes sont morphologiquement caractérisés à ce stade par la présence d'une vésicule germinative (GV, le noyau de l'ovocyte) et par un réseau de microtubules interphasiques.

Chez la souris, la reprise de la méiose s'effectue après stimulation hormonale par la LH *in vivo* à chaque oestrus (qui dure quatre jours) et simplement en isolant l'ovocyte des cellules folliculaires *in vitro*. L'ovocyte entre en **première phase M** de méiose. Le premier événement morphologique visible est la rupture de l'enveloppe nucléaire ou GVBD (Germinal Vesicle BreakDown). La première division est très longue et comporte une **pro-métaphase** durant 6 à 7 heures. Au cours de la pro-métaphase, la chromatine s'individualise en chromosomes condensés et le fuseau de division se forme en position centrale. A l'issue de la pro-métaphase, les fibres kinétochoriennes se mettent en place, permettant l'alignement et donc la bonne ségrégation des chromosomes homologues (Brunet et al., 1999). La durée particulièrement longue de cette pro-métaphase en l'absence de fibres kinétochoriennes pourrait être un moyen d'éviter la cassure des bras des chromosomes avant leur séparation en

Figure 7: la levée du bloc en prophase



AC: adénylate cyclase
PDE: phosphodiestérase
PKA: protéine kinase A
R: sous-unité régulatrice
C: sous-unité catalytique

anaphase, leur condensation étant très lente. Puis le fuseau de division migre au cortex de l'ovocyte. Une **métaphase** (métaphase I, MI) de 1 heure environ suit la pro-métaphase, puis le premier globule polaire est expulsé à la suite d'une division asymétrique séparant les chromosomes homologues en **anaphase**, constituant une première division réductionnelle.

Cette division asymétrique donne lieu à une grosse cellule, l'ovocyte et à une petite cellule, le globule polaire. L'ovocyte passe ensuite par une **phase G** sans synthèse d'ADN, les chromosomes restant dans un état condensé non compatible avec la réPLICATION de l'ADN.

L'ovocyte entre enfin en **seconde phase M** de méiose, reforme son fuseau de division en position sous-corticale et reste bloqué en **métaphase** (métaphase II, MII). Ce blocage est levé par la fécondation, qui induit la reprise de la méiose et aboutit à l'expulsion du second globule polaire après séparation des chromatides sœurs en **anaphase** selon une division équationnelle, comme en mitose. L'ovocyte fécondé entre en phase G1 de première division zygotique (figure 6).

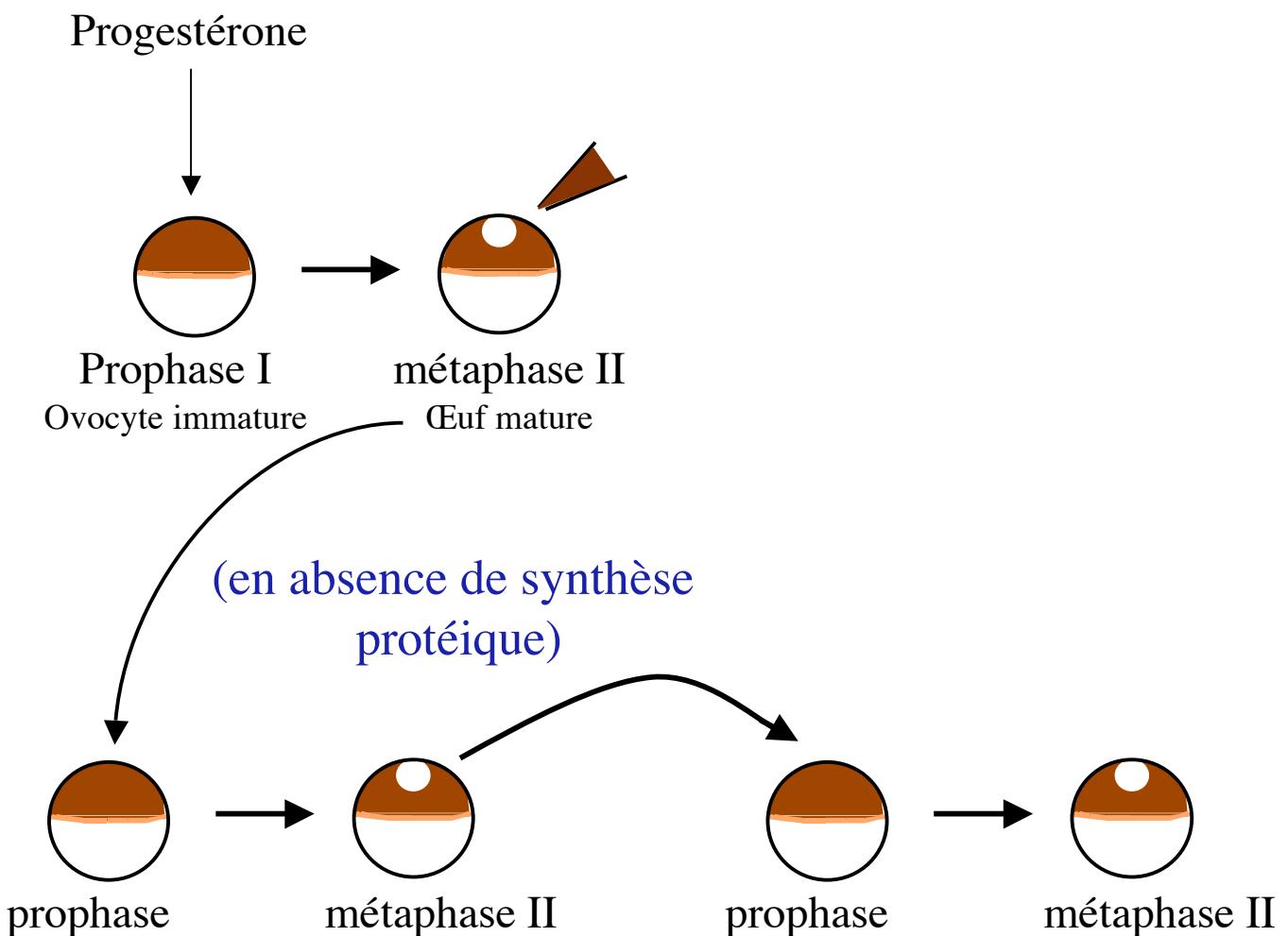
3. Reprise de la méiose

3.1. La levée du blocage en prophase: diminution de l'AMPc et de l'activité PKA

Suite au signal secondaire émis par les cellules folliculaires, la concentration intra-ovocytaire en AMPc diminue. La concentration en AMPc dépend de l'équilibre entre deux activités enzymatiques: la famille des adénylates cyclases qui permet la synthèse d'AMPc à partir d'ATP et la famille des phosphodiésterases qui permet la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP. Chez le xénope, le signal secondaire émis par les cellules folliculaires induit l'inhibition d'une adénylate cyclase membranaire (Finidori-Lepicard et al., 1981; Mulner et al., 1979; Sadler and Maller, 1981) et entraîne la diminution de l'activité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'AMPc, la PKA (figure 7). La PKA est constituée de quatre sous-unités: deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. L'assemblage des quatre sous-unités rend l'enzyme inactive. La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices entraîne la dissociation du complexe et la libération des sous-unités catalytiques actives. Lorsque la concentration en AMPc chute dans l'ovocyte, l'association des sous-unités catalytiques et régulatrices est favorisée, entraînant la réduction de l'activité PKA. Cette chute d'activité de la PKA induit l'activation du MPF et la reprise de la méiose (figure 7).

Des traitements permettant de maintenir un fort taux d'AMPc ou d'augmenter l'activité PKA empêchent la reprise de la méiose et l'activation du MPF. Ainsi chez la souris, l'incubation

Figure 8: mise en évidence de l'activité MPF chez l'amphibiens par transfert de cytoplasme



des ovocytes dissociés des cellules folliculaires *in vitro* dans un milieu contenant du dbcAMP (un analogue diffusible de l'AMPc) permet de les maintenir bloqués en prophase I. Le transfert de ces ovocytes bloqués dans un milieu exempt de dbcAMP induit la reprise synchrone de la maturation méiotique. Au contraire, la diminution artificielle de la concentration en AMPc ou l'inhibition de l'activité PKA suffisent pour entraîner la reprise de la méiose. On ne connaît pas bien les effecteurs régulés positivement ou négativement par la PKA faisant le lien entre la baisse de l'activité PKA et l'activation du MPF. La PKA pourrait phosphoryler directement CDC25 (enzyme permettant l'activation du MPF) sur un résidu Sérine 287, connu comme étant inhibiteur pour CDC25 (Duckworth et al., 2002; Kumagai et al., 1998).

32. Activation et régulations du MPF en réponse à la baisse d'activité PKA

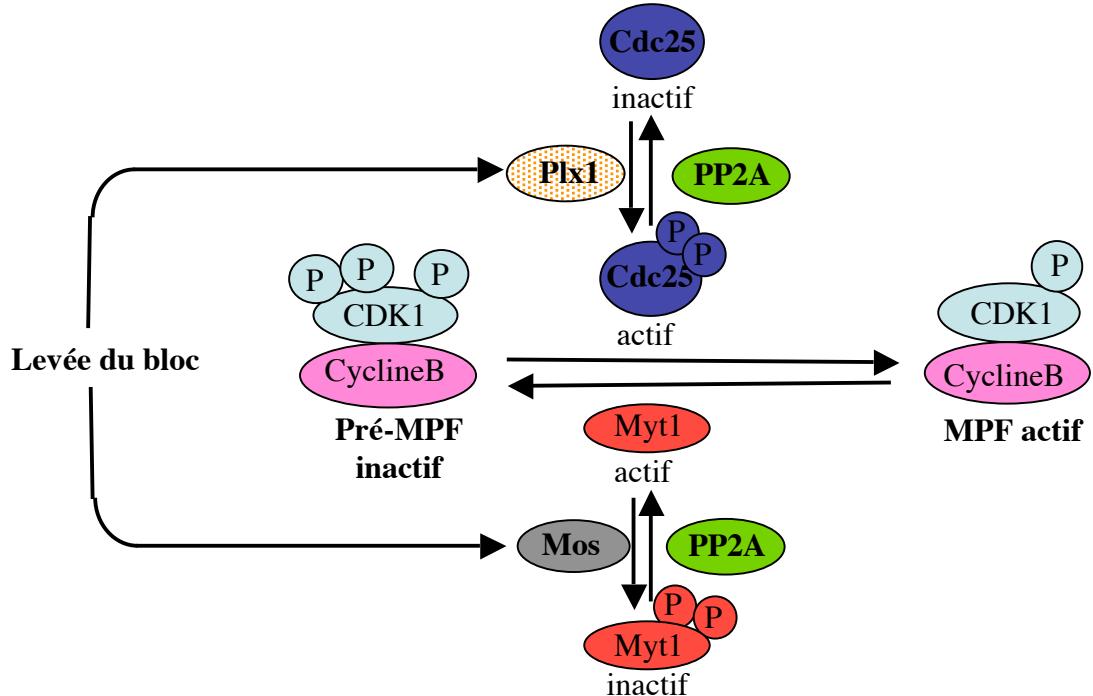
a) Le MPF

La reprise de la méiose est sous le contrôle du MPF (M-phase promoting factor), facteur essentiel aux deux divisions de méiose. L'activité MPF a été mise en évidence pour la première fois en 1971 dans les ovocytes de *Rana pipiens* (Masui and Markert, 1971). Masui et Markert ont montré que l'injection de cytoplasme d'ovocytes bloqués en métaphase II dans des ovocytes bloqués en prophase I entraîne la reprise de la méiose chez ces derniers. Ils mettaient ainsi en évidence l'existence d'un facteur cytoplasmique capable d'induire la maturation méiotique de l'ovocyte. Ce facteur a été baptisé MPF pour Maturation Promoting Factor. Dans ces expériences, le cytoplasme receveur acquiert les mêmes propriétés que le cytoplasme donneur et devient à son tour capable d'entraîner la maturation méiotique d'ovocytes bloqués en prophase (figure 8). Ce transfert de cytoplasme peut s'effectuer indéfiniment et conduit toujours à la reprise de la méiose de l'ovocyte receveur même en l'absence de synthèses protéiques (après traitement à la cycloheximide; Wasserman and Masui, 1975).

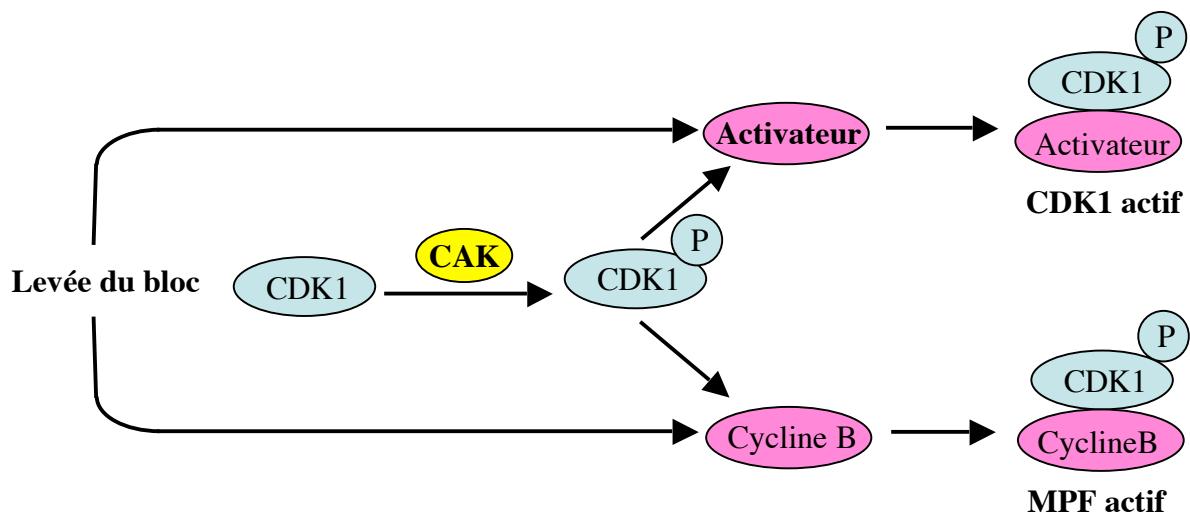
Ces observations ont établi la capacité d'auto-amplification du MPF et ont montré qu'en prophase, l'ovocyte contient du pré-MPF inactif directement activable par un faible apport de MPF actif, sans synthèses protéiques. La conversion de ce pré-MPF en MPF suffit à déclencher la reprise de la méiose et la progression de l'ovocyte depuis la prophase I jusqu'à la métaphase II. Ce facteur est conservé entre les cellules méiotiques et mitotiques, il

Figure 9: activation initiale du MPF décrite chez le xénope

A partir du pré-MPF



A partir du CDK1 monomérique



représente le facteur universel de l'entrée en phase M des cellules eucaryotes (Doree, 1990). Pour cela il a été rebaptisé M-phase Promoting Factor.

b) Formation de l'amorce de MPF

Le MPF est formé de deux sous-unités: une sous-unité possèdant l'activité catalytique kinasique CDK1 (autrement appelée CDC2) et une sous-unité régulatrice la Cycline B. Dans les ovocytes de xénophage bloqués en prophase, le MPF est sous forme inactive appelée pré-MPF. Ce pré-MPF est formé de l'association de la kinase CDK1 et d'une Cycline B. CDK1 du pré-MPF est phosphorylée sur trois résidus: une phosphorylation activatrice sur la thréonine 161 catalysée par la kinase CAK (Fesquet et al., 1993; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993) et deux phosphorylations inhibitrices sur la thréonine 14 et la tyrosine 15, catalysées par la kinase Myt1 (Mueller et al., 1995a). Ces deux phosphorylations inhibitrices maintiennent le MPF sous forme de pré-MPF inactif. Wee1 est capable de phosphoryler les deux résidus inhibiteurs de CDK1 en mitose comme Myt1, mais elle est absente des ovocytes de xénophage en prophase et s'accumule après GVBD (Murakami and Vande Woude, 1998; Nakajo et al., 2000). Ces phosphorylations sont dites activatrices ou inhibitrices car elles changent la conformation de CDK1 permettant ou non sa liaison à ses substrats. Cependant la majorité (80 à 90%) des molécules de CDK1 contenues dans l'ovocyte est sous forme monomérique non complexée à la Cycline, avec une sous-fraction (10%) phosphorylée sur thréonine 161 (De Smedt et al., 2002; Kobayashi et al., 1991a). CDK1 phosphorylée sur thréonine 161 mais non liée à la Cycline est inactive.

Sous l'influence des signaux de reprise de la méiose, le MPF est activé. Cette activation initiale peut résulter d'une part d'une déphosphorylation des résidus inhibiteurs Thréonine 14 et Tyrosine 15 du pré-MPF par la phosphatase CDC25 et d'autre part de l'association du CDK1 monomérique phosphorylé sur Thréonine 161 à une Cycline ou à un activateur (figure 9). Ces deux processus non exclusifs conduisent à la formation d'une amorce de MPF actif qui par un mécanisme d'auto-amplification entraîne la conversion rapide du pré-MPF en MPF.

Tous ces mécanismes sont bien connus chez le xénophage, mais sont relativement peu décrits chez la souris, les expériences biochimiques étant difficilement réalisables dans ce modèle (un ovocyte contenant 23ng de protéines totales).

i. Formation d'une amorce de MPF à partir du pré-MPF

La conversion du pré-MPF en MPF dépend de l'activité de la kinase inhibitrice Myt1 et de la phosphatase activatrice CDC25. Dans l'ovocyte de xénope en prophase, CDC25 n'est pas fonctionnelle et le pré-MPF est maintenu inactif par la kinase Myt1 qui phosphoryle les résidus inhibiteurs Thr 14 et Tyr 15 de CDK1 (Gautier et al., 1989; Izumi et al., 1992; Jessus et al., 1991; Kumagai and Dunphy, 1992; Mueller et al., 1995a; Murakami and Vande Woude, 1998). Sous l'influence de la progestérone chez le xénope, Myt1 et CDC25 sont hyperphosphorylées, ce qui inhibe Myt1 et active CDC25 (Izumi et al., 1992; Jessus et al., 1991; Kumagai and Dunphy, 1992; Mueller et al., 1995a; Murakami and Vande Woude, 1998). CDC25 active déphosphoryle les résidus inhibiteurs Thr 14 et Tyr 15 du CDK1 composant le pré-MPF et pourrait former l'amorce de MPF requise pour la reprise de la méiose (figure 9). Chez la souris, l'invalidation du gène Cdc25b rend les femelles stériles (Lincoln et al., 2002). Les ovocytes prélevés sur ces souris restent arrêtés en prophase I avec une activité de MPF basse. La microinjection d'ARNm codant pour CDC25b dans ces ovocytes active le MPF et induit la reprise de la méiose. CDC25 est donc nécessaire chez la souris pour l'activation du MPF (Lincoln et al., 2002).

L'activation de CDC25 dépend de la déphosphorylation d'un unique résidu inhibiteur, la Ser 287 et de la phosphorylation de multiples résidus activateurs. Dans l'ovocyte en prophase, la Ser 287 est phosphorylée par la PKA. La chute de la PKA permettrait donc la déphosphorylation de la Ser 287 de CDC25 (Duckworth et al., 2002).

La phosphorylation des résidus activateurs de CDC25 résulte de l'inhibition de la phosphatase PP2A et de l'activation des kinases Polo et CDK1 (Karaïskou et al., 1998; Kumagai and Dunphy, 1996; Qian et al., 2001). Polo est activée à GVBD durant la maturation méiotique, au même moment que CDC25 et CDK1 (Qian et al., 1998b). L'injection d'une forme constitutivement active de Polo dans des ovocytes de xénope bloqués en prophase permet l'activation de CDC25 et de CDK1 en absence de progestérone (Qian et al., 1999) indiquant que Polo pourrait être à l'origine de l'activation initiale du MPF via l'activation de CDC25. Cependant des données suggèrent aussi que l'activité de Polo et de CDC25 dépend d'un niveau minimal de CDK1 actif (Abrieu et al., 1998; Frank-Vaillant et al., 1999; Karaïskou et al., 1999; Pahlavan et al., 2000; Qian et al., 2001). De plus l'inhibition de Polo endogène par injection d'une forme dominante négative ou d'un anticorps bloquant ralentit mais ne bloque pas la reprise de la méiose en réponse à la progestérone (Qian et al., 1998a). Polo n'est donc pas nécessaire à l'activation initiale du MPF, mais est plutôt impliquée dans la boucle d'auto-amplification.

PP2A déphosphoryle CDC25 et Myt1, ce qui inactive CDC25 et active Myt1 (Brassac et al., 2000; Izumi et al., 1992; Karaïskou et al., 1999; Kumagai and Dunphy, 1992; Mueller et al., 1995a) (figure 9). L'injection d'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases dont PP2A, est suffisante pour permettre l'activation du MPF en absence de progestérone (Goris et al., 1989; Jessus et al., 1991; Rime et al., 1990). En réponse à la progestérone, l'inhibition de PP2A pourrait être responsable de la formation d'une amorce de MPF actif via l'inactivation de Myt1 et l'activation de CDC25. Une telle régulation de l'activité de PP2A n'a cependant jamais été décrite.

Mos et p90^{RSK} (un substrat de la voie Mos/.../MAPK) seraient capables d'inhiber Myt1 par phosphorylation (Palmer et al., 1998 ; Peter et al., 2002a). Cependant, en réponse à la progestérone, Myt1 est inhibée même en absence de Mos et de MAPK active, remettant en question ce type de contrôle (Dupre et al., 2002; Fisher et al., 1999; Gross et al., 2000). Je reparlerai de la voie Mos/.../MAPK plus loin.

En conclusion, les mécanismes de formation de l'amorce de MPF actif paraissent plus complexes que la seule conversion d'une fraction de pré-MPF en MPF.

ii. Formation d'une amorce de MPF à partir de CDK1 monomérique

Ce second processus n'est pas exclusif par rapport au premier et met en jeu l'association de molécules de CDK1 monomérique (80 à 90 % du CDK1 total) aux Cyclines ou autres protéines néo-synthétisées (figure 9). De plus une sous-fraction de CDK1 monomérique est déjà phosphorylée sur le résidu activateur Thr 161 (De Smedt et al., 2002). Son association à une Cycline ou à une autre protéine pourrait permettre la formation d'une amorce de MPF actif capable de réguler négativement Myt1 et positivement Polo et CDC25 afin d'entraîner l'auto-amplification du MPF. Ces complexes, pour être actifs, doivent échapper à Myt1. Une étude de la localisation sub-cellulaire de ces différents acteurs pourrait confirmer ou non l'hypothèse selon laquelle Myt1 et l'amorce ne seraient pas dans le même compartiment cellulaire.

Le mécanisme responsable de l'activation initiale du MPF n'est donc toujours pas élucidé. Plusieurs voies de transduction semblent être activées en parallèle et l'activation initiale du MPF pourrait résulter de l'intégration de plusieurs signaux convergents.

Figure 10: l'auto-amplification du MPF

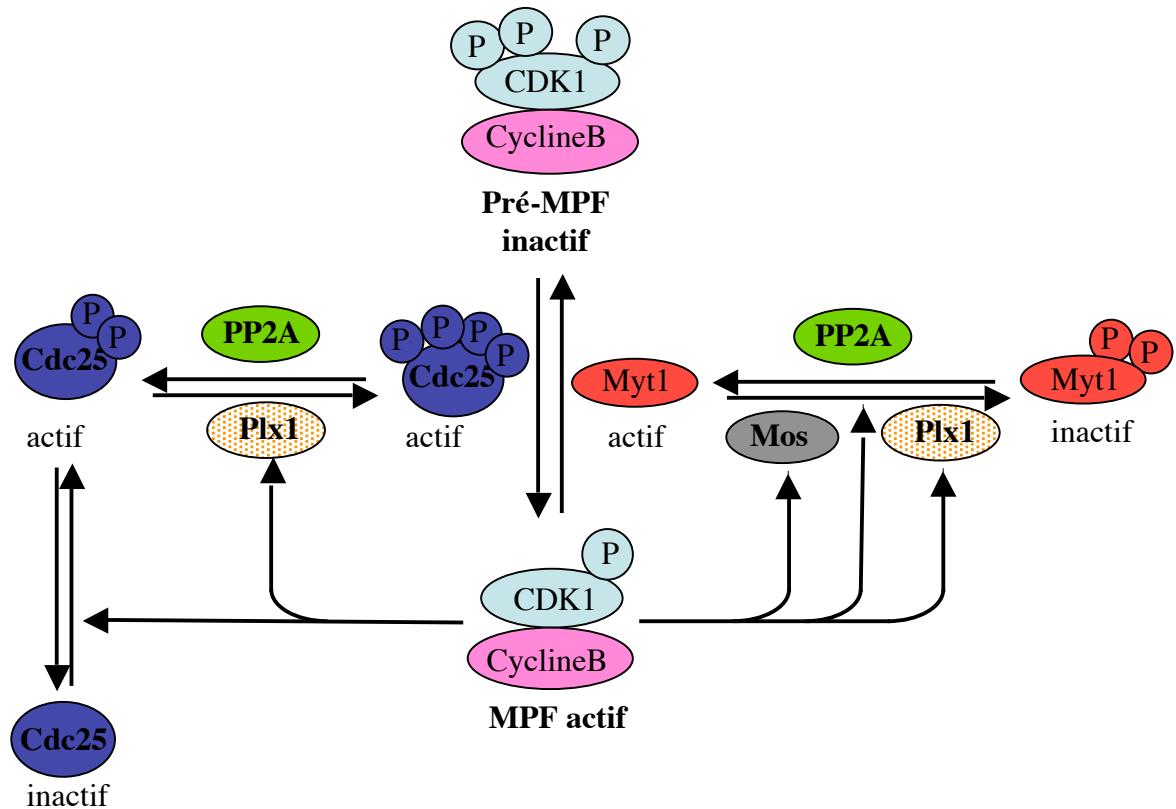


Figure 11: l'activation du MPF chez le xénope et la souris

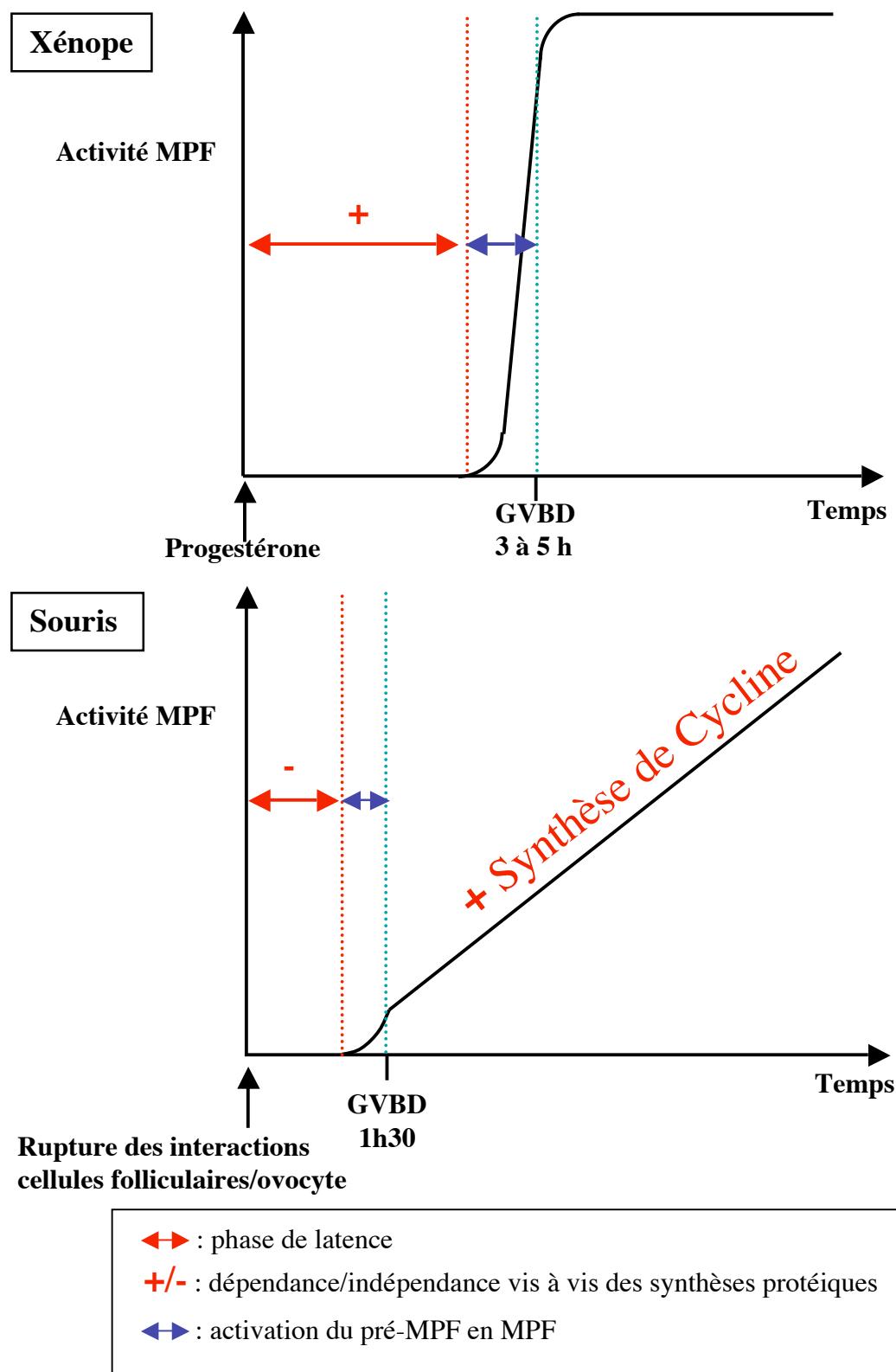
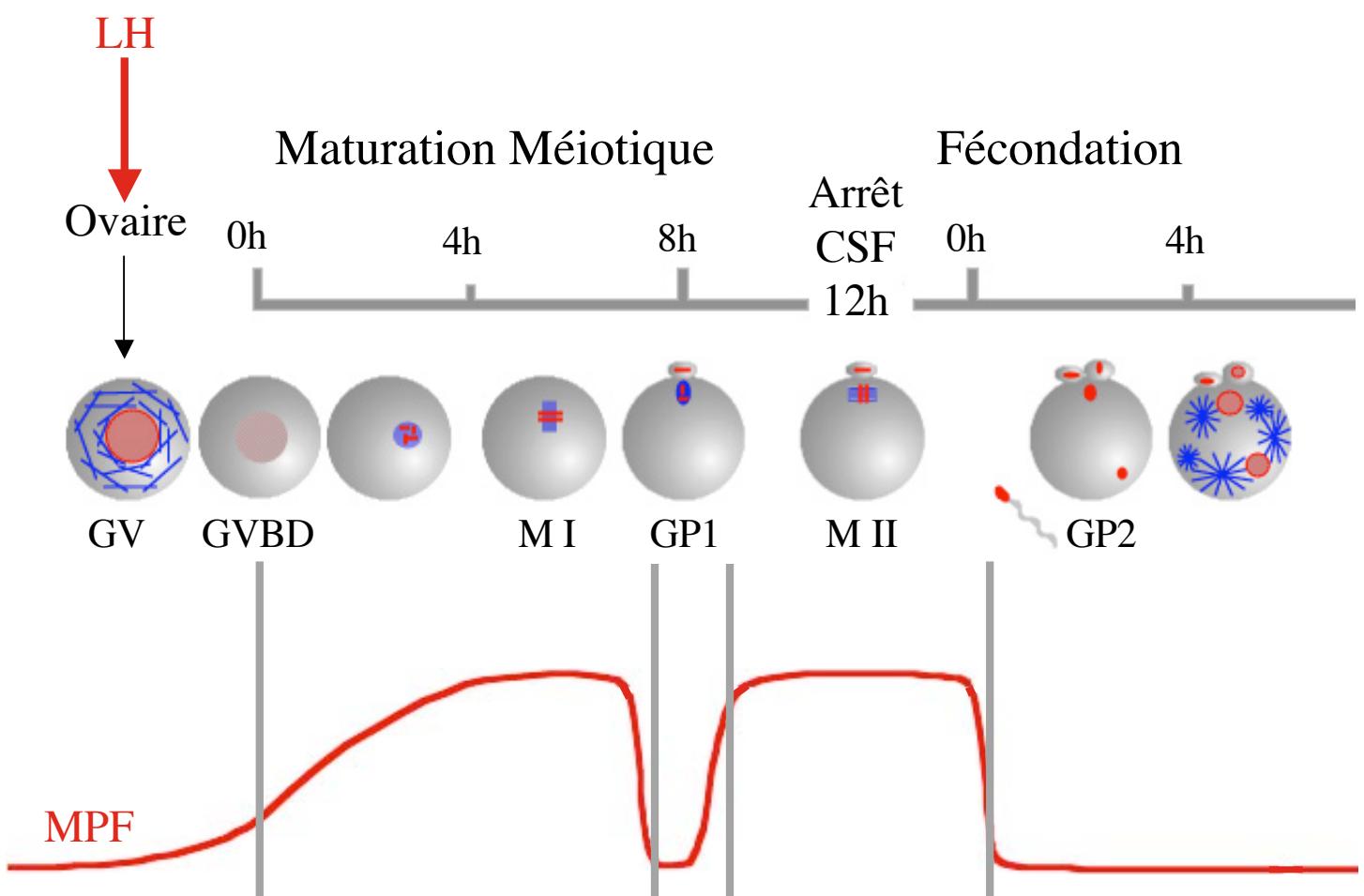


Figure 12: l'activité MPF au cours de la maturation méiotique chez la souris



MPF: M-phase Promoting Factor, complexe formé de l'association CDK1/Cycline B

c) boucle d'auto-amplification

En réponse à la chute d'activité de la PKA, une amorce de CDK1 active est formée, nécessaire au processus d'auto-amplification du MPF. Ce processus d'auto-amplification ne dépend pas des synthèses protéiques (Masui and Markert, 1971). L'amorce de CDK1 active conduit à l'activation de Polo. Ces deux kinases permettent la phosphorylation et l'activation de CDC25 (Karaïskou et al., 1998; Kumagai and Dunphy, 1996; Qian et al., 2001). En retour CDC25 déphosphoryle les résidus inhibiteurs Tyr15 et Thr14 de CDK1 et entraîne la conversion du pré-MPF en MPF actif. CDK1 et Polo participeraient à l'activation de CDC25 et à l'inhibition de Myt1 (Bartholomew et al., 2001; Booher et al., 1997) (figure 10). Mos est aussi capable d'inhiber Myt1 directement (Peter et al., 2002a) ou via l'activation de p90^{RSK} (Palmer et al., 1998). Mos pourrait donc participer au processus d'auto-amplification du MPF et à la reprise de la méiose (figure 10).

Selon le principe des boucles de rétro-action positives, plus les molécules de CDK1 actives s'accumulent, plus elles activent Polo et CDC25 et plus rapidement se déroule la conversion du pré-MPF en MPF. Dans l'ovocyte de xénope, cette auto-amplification confère un caractère brutal et irréversible à l'activation du MPF.

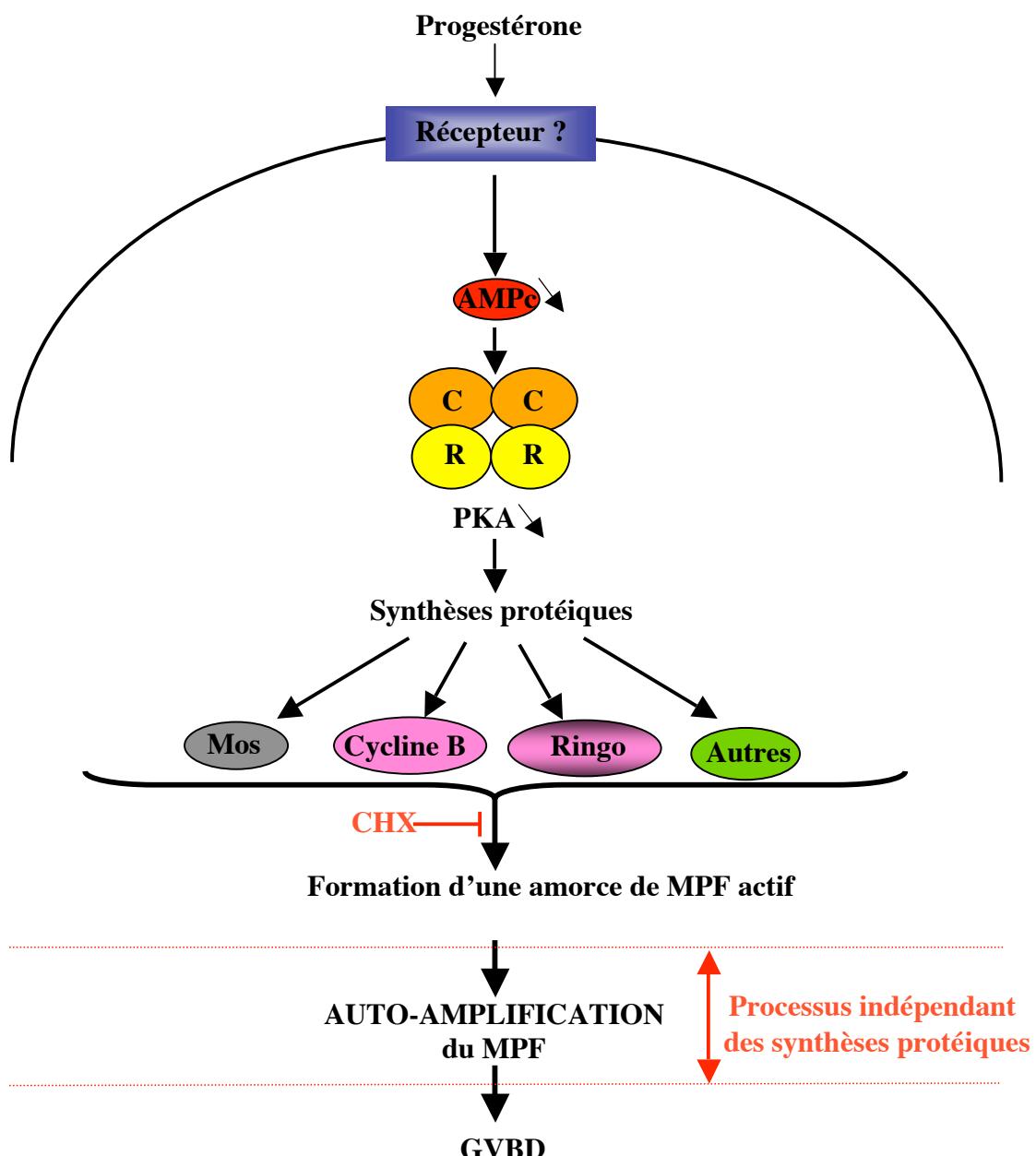
d) Différences xénope/souris

Chez la souris, le MPF est activé à GVBD, permettant l'entrée en première phase M de méiose. Son activité augmente de façon lente et progressive au cours de la pro-métaphase, pour atteindre un plateau en fin de première division (à GVBD l'activité du MPF atteint 20 à 30% de l'activité maximale qui est atteinte en métaphase I; Hampl and Eppig, 1995). Chez le xénope au contraire, l'activation du MPF est brutale et se fait à GVBD (figure 11). Chez ces espèces, la dégradation de la Cycline B induit la chute d'activité du MPF (CDK1 étant par conséquence inactivée), permettant la sortie de phase M et l'entrée en phase G. L'activité du MPF est rapidement restaurée grâce à une néo-synthèse de Cycline B, entraînant l'entrée en seconde phase M de méiose. Cette activité reste élevée jusqu'à la fécondation, où l'activité MPF chute alors, induisant la sortie de la seconde phase M de méiose (figure 12).

i. Les néo-synthèses protéiques

Chez la souris et le xénope, la transcription chute à GVBD. Cet arrêt transcriptionnel persiste jusqu'à la reprise de la transcription zygotique au stade 2-cellules (chez le xénope, au stade

Figure 13: candidats pour les néo-synthèses protéiques chez le xénope



mi-blastula). L'ovocyte n'est donc actif qu'en traduction. En inhibant la traduction de manière générale avec des inhibiteurs traductionnels comme la cycloheximide et la puromycine, il a été montré que l'ovocyte de souris, comme celui d'étoile de mer, peut reprendre sa maturation méiotique sans synthèses protéiques (Chesnel and Eppig, 1995; Choi et al., 1991; de Vant'ery et al., 1996). Les synthèses protéiques sont nécessaires plus tard pour atteindre un niveau maximal de MPF en métaphase I (Hampl and Eppig, 1995; Kubiak et al., 1992; Ledan et al., 2001). En mitose en général et en première phase M de méiose chez le xénope, l'activité du MPF augmente brutalement avec une pente forte. Chez la souris au contraire, l'activité du MPF augmente très progressivement en première phase M de méiose. Cela peut être dû à la présence d'une faible quantité de pré-MPF dans l'ovocyte immature, formant une petite quantité de MPF actif et à la nécessité d'une synthèse progressive de Cycline B (Winston, 1997). Ceci pourrait expliquer la durée très longue de la première phase M de méiose chez la souris (figure 12).

Chez le xénope, la synthèse protéique est nécessaire à l'activation du MPF. En effet, les ovocytes traités à la puromycine sont incapables d'effectuer la reprise de la maturation méiotique après action de la progestérone. Il existe au moins trois candidats dont la synthèse serait requise pour permettre la formation de l'amorce de MPF actif: Mos, les Cyclines et Ringo/Speedy (figure 13).

ii. Candidats pour les néo-synthèses protéiques chez le xénope

Mos: Mos est une Ser/Thr kinase de 39 kDa qui n'est exprimée que dans les cellules de la lignée germinale mâle et femelle. Cette protéine est codée par l'homologue cellulaire c-mos du gène *v-mos* du virus murin de Moloney (Sagata et al., 1988). Longtemps décrite comme présente uniquement chez les vertébrés, Mos a depuis été caractérisée chez certains invertébrés comme l'étoile de mer (Tachibana et al., 2000) et la drosophile (Ivanovska et al., 2004). Mos n'est pas présente dans les ovocytes arrêtés en prophase. Elle est synthétisée à GVBD ou après GVBD suite à la polyadénylation et la méthylation de son ARNm (Kuge et al., 1998; Sheets et al., 1995). La chute d'activité PKA induit la synthèse de Mos (Lazar et al., 2002; Matten et al., 1994). Chez le xénope, Mos est stabilisée par phosphorylation de la Ser3 par CDK1 et peut ainsi s'accumuler (Ballantyne et al., 1997; Castro et al., 2001; Frank-Vaillant et al., 1999). Mos est exprimée tout au long de la maturation méiotique et est dégradée après fécondation (Watanabe et al., 1989).

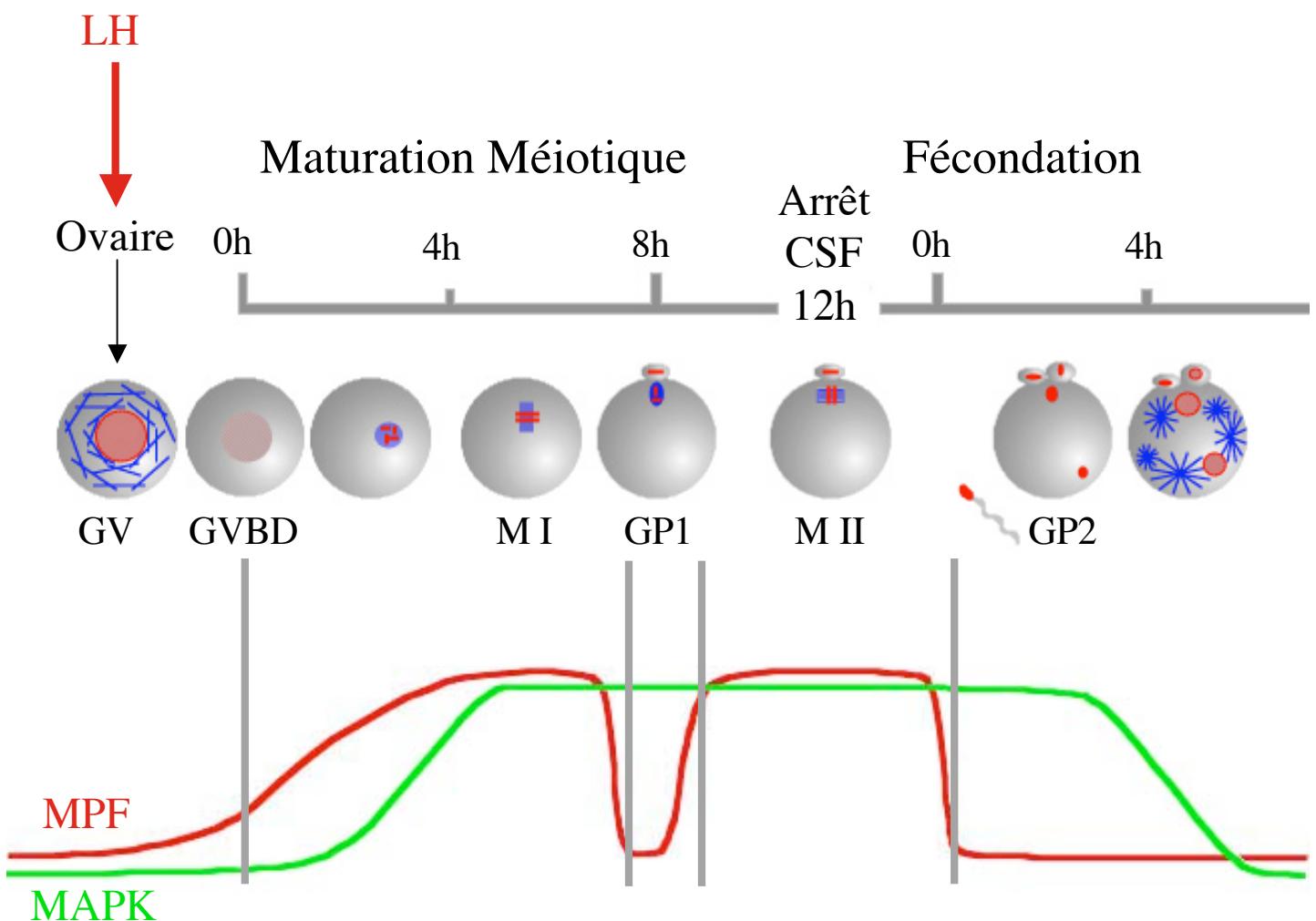
L'injection d'oligonucléotides antisens Mos dans des ovocytes bloqués en prophase bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone chez le xénope (Sagata et al., 1988), suggérant

que la protéine Mos est requise pour l'activation du MPF en réponse à une stimulation hormonale. De plus l'injection de l'ARNm Mos en absence de progestérone (Sagata et al., 1989a) est suffisante pour induire la reprise de la méiose et l'activation du MPF. La synthèse de Mos semble donc requise pour conduire à l'amorce de MPF actif. Son action passe-t-elle par la voie classique Mos/MEK/MAPK ?

La voie Mos/.../MAPK/p90^{RSK}. Mos est une MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK). Mos phosphoryle MEK qui phosphoryle à son tour les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) sur deux résidus conservés pour les activer : la thréonine 183 et la tyrosine 185 (Payne et al., 1991; Posada and Cooper, 1992). La séquence Thr183-X-Tyr185 est localisée dans la boucle d'activation de la MAPK ou T-loop. La MAPK phosphorylée sur ces deux résidus est alors active. Selon les MAPK, la nature du résidu X ainsi que la longueur de la T-loop varient. Ces variations pourraient moduler l'efficacité de la catalyse ainsi que la spécificité des MAPK vis à vis de leurs substrats. L'activité des MAPK est aussi régulée par l'action de phosphatases, sur un ou deux des résidus phosphorylés. Les MAPK sont exprimées de manière très ubiquitaire dans les cellules somatiques et sont impliquées dans de nombreuses voies de transduction de signaux extra-cellulaires où elles phosphorylent des facteurs de transcription permettant l'activation de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la différentiation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. La voie de transduction conduisant à l'activation des MAPKs est très conservée et consiste en une cascade de trois protéines: une MAPKKK (MEKK), une MAPKK (MEK) et la MAPK. Cinq groupes de MAPKs ont été caractérisés: ERK1/2, JNK1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, ERK3/4 et ERK5. Les MAPK les plus étudiées dans les ovocytes sont de type ERK (Extracellular Regulated Kinases) (Boulton et al., 1991; Nebreda and Hunt, 1993; Posada et al., 1993; Sagata et al., 1989a). Elles ont une cinétique d'activation différente de celle du MPF dans l'ovocyte. Chez la souris, Mos active directement par phosphorylation les protéines MEK1 et 2, qui phosphorylent et activent à leur tour ERK1 et 2 (les ERK étant les substrats uniques connus des MEK). Dans les ovocytes de xénope, seules MEK2 et ERK2 sont présentes. Le site consensus de phosphorylation par les MAPK est commun à CDK1 et est composé de quatre acides aminés: L/P-X-S/T-P (Alvarez et al., 1991). Un seul substrat des MAPK était connu dans l'ovocyte de xénope il y a cinq ans: p90^{RSK} (Palmer et al., 1998).

ERK1/2 sont activées plus tardivement que le MPF en première phase M chez la souris (ERK2 est activée à GVBD chez le xénope et ERK1/2 sont activées après GVBD chez la

Figure 14: l'activité MAPK au cours de la maturation méiotique chez la souris



MPF: M-phase Promoting Factor CDK1/Cycline B

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases

souris). La MAPK atteint un plateau d'activité maximale tout au long de la méiose et ce jusqu'à plusieurs heures après la fécondation (figure 14) (Verlhac et al., 1994). Chez la souris, l'activation de la MAPK ne dépend pas uniquement de la voie classique Mos/MEK/MAPK mais dépend aussi de l'inhibition par Mos d'une phosphatase sensible à l'acide okadaïque (Verlhac et al., 2000b). Du fait de leur activation après le MPF chez la souris, les MAPK ne participent pas à son activation. Chez le xénope, les MAPK sont activées plus tôt et pourraient participer à l'activation du MPF. En effet chez le xénope, l'injection de Mos, d'une forme constitutivement active de MEK, de MAPK ou de p90^{RSK} est capable d'induire la maturation méiotique en absence de progestérone (Gross et al., 2001; Haccard et al., 1995; Huang et al., 1995). A l'inverse, l'inhibition de la MAPK par l'injection d'un anticorps anti-MEK ou de la phosphatase CL 100 (une phosphatase plus ou moins spécifique des MAPK) bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone (Gotoh et al., 1995; Kosako et al., 1994a; Kosako et al., 1994b). Enfin l'action de la protéine Mos injectée dans l'ovocyte est bloquée par l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126 (Gross et al., 2000) indiquant que Mos active le MPF via une cible unique, la MAPK.

Tous ces résultats suggèrent que la synthèse de la protéine Mos est nécessaire et suffisante pour induire l'activation du MPF et la reprise de la méiose via la voie Mos/.../MAPK chez le xénope. La connexion entre cette voie et le MPF s'exercerait via l'inhibition de la kinase Myt1, substrat direct de Mos et de p90^{RSK} (Palmer et al., 1998; Peter et al., 2002b).

Des arguments sont aussi en défaveur d'un rôle de la voie Mos/.../MAPK dans l'activation du MPF. L'accumulation de Mos à GVBD est bloquée par l'injection d'une forme dominante négative de CDK1, d'un anticorps monoclonal dirigé contre CDK1 ou encore de la CKI p21^{cip1} (Ballantyne et al., 1997; Frank-Vaillant et al., 1999; Nebreda et al., 1995). Ces résultats suggèrent que l'accumulation de la protéine Mos dépend de l'activation du MPF et pas l'inverse. CDK1 phosphoryle directement la Sérine 3 de la protéine Mos et permettrait sa stabilisation au moment de GVBD (Castro et al., 2001; Nishizawa et al., 1992). L'utilisation de morpholinos oligonucléotides (des oligonucléotides modifiés) montre que l'activation du MPF ne nécessite pas la synthèse de Mos (Dupre et al., 2002). Les morpholinos oligonucléotides se lient au codon initiateur de l'ARNm cible et inhibent sa traduction sans provoquer, comme les oligonucléotides antisens classiques, la dégradation de l'ARN endogène par la RNase H (Summerton, 1999; Summerton and Weller, 1997). L'activité RNase H est très forte chez le xénope, les oligonucléotides antisens induisent donc souvent

des dégradations d'ARNm non spécifiques, ce qui n'est pas le cas avec les morpholinos oligonucléotides. Lorsque des morpholinos oligonucléotides anti-Mos sont injectés dans des ovocytes de xénope bloqués en prophase, la synthèse de la protéine Mos est inhibée et la MAPK n'est pas activée. Dans ce cas, la progestérone reste capable d'induire l'activation du MPF et la reprise de la méiose avec un délai.

Ces expériences montrent que la voie Mos/.../MAPK n'est pas requise pour l'activation du MPF et la reprise de la méiose. Cela rapproche le xénope de la souris et de l'étoile de mer où ni la synthèse de la protéine Mos ni l'activité MAPK ne sont requises pour l'activation de CDK1 et la reprise de la méiose (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Tachibana et al., 2000; Verlhac et al., 1996).

Mos n'est donc pas la protéine dont la synthèse est requise pour initier l'activation du MPF chez le xénope. Néanmoins, il existe bien un rétrocontrôle positif de la voie Mos/.../MAPK sur le MPF chez cette espèce puisque les ovocytes de xénope injectés avec des morpholinos oligonucléotides anti-Mos et traités à la progestérone sont plus longs à passer GVBD que les ovocytes contrôles (Dupre et al., 2002).

Les Cyclines. En prophase, la majorité des molécules de CDK1 est sous forme libre. En réponse à la progestérone, les Cyclines B1 et B4 sont synthétisées (Hochegger et al., 2001; Kobayashi et al., 1991b; Rime et al., 1994). De plus la Cycline B1 s'accumule en réponse à la progestérone même lorsque l'activité MPF est bloquée par la CKI p21^{Cip1} (Frank-Vaillant et al., 1999). Les Cyclines néo-synthétisées pourraient s'associer à CDK1 monomérique pour former l'amorce de MPF actif (De Smedt et al., 2002; Kobayashi et al., 1991b; Taieb et al., 1997). Cependant l'injection d'oligonucléotides antisens ciblant les ARNm codant les Cyclines B1, B2, B4 et B5 ne bloque pas l'activation du MPF et la reprise de la méiose (Hochegger et al., 2001; Ledan et al., 2001; Minshull et al., 1991). La synthèse de Cyclines ne paraît donc pas nécessaire à l'activation initiale de CDK1.

Cependant, sous l'influence de la progestérone, la reprise de la méiose peut être bloquée par l'injection de mutants de CDK1 inactifs ou d'anticorps inhibant CDK1 monomérique (Nebreda et al., 1995) indiquant que les formes inactives de CDK1 libre ainsi formées sont capables de lier et de titrer une protéine néo-synthétisée nécessaire à la méiose. D'autres protéines que les Cyclines, capables d'interagir avec CDK1 et de l'activer, seraient synthétisées en réponse à la progestérone permettant la reprise de la méiose. La protéine Ringo/Speedy est un bon candidat.

Ringo/Speedy. Ringo/Speedy a été identifiée simultanément par deux équipes différentes (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). Ringo a été identifiée comme une nouvelle protéine capable d'induire la reprise de la méiose en l'absence de progestérone et Speedy a été identifiée comme une nouvelle protéine impliquée dans le blocage G2/M du cycle cellulaire chez la levure. Les ARN codant pour Speedy induisent rapidement la maturation ovocytaire chez le xénope en absence de progestérone. Cette protéine se comporte comme une Cycline car elle peut se lier et activer les kinases CDK1 et CDK2 (Ferby et al., 1999; Karaïskou et al., 2001; Lenormand et al., 1999). L'activation des complexes Ringo/CDK1 ne requiert pas la phosphorylation activatrice du résidu Thr 161 de CDK1 et ces complexes sont moins sensibles à l'inhibition exercée par la phosphorylation des résidus Tyr15 et Thr14 de CDK1 (Karaïskou et al., 2001). La seule association de Ringo/Speedy à CDK1 devrait donc en théorie suffire à la formation de complexes actifs, indépendamment des kinases régulatrices de CDK1. Dans l'ovocyte de xénope, l'injection d'ARN codant pour Ringo/Speedy induit rapidement l'activation du MPF et la reprise de la méiose même en absence de synthèses protéiques (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). Chez la souris, l'injection d'ARN codant pour Ringo/Speedy déclenche la maturation méiotique dans un milieu contenant du dbcAMP (Terret et al., 2001, annexe 3). Inversement, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre Ringo/Speedy chez le xénope bloque la reprise de la méiose induite par la progestérone (Ferby et al., 1999). La synthèse de la protéine Ringo/Speedy pourrait donc être nécessaire et suffisante pour permettre l'activation du MPF et la maturation de l'ovocyte. Cependant, le profil d'expression de la protéine Ringo est peu décrit et sa synthèse en réponse à la progestérone ainsi que sa liaison à CDK1 *in vivo* restent à confirmer.

33. L'entrée en mitose

Comme pour la reprise de la méiose, l'entrée en mitose est régulée par le MPF et le complexe CDK1/Cycline A. La régulation de l'activité de ces complexes est importante pour préparer et permettre une mitose correcte.

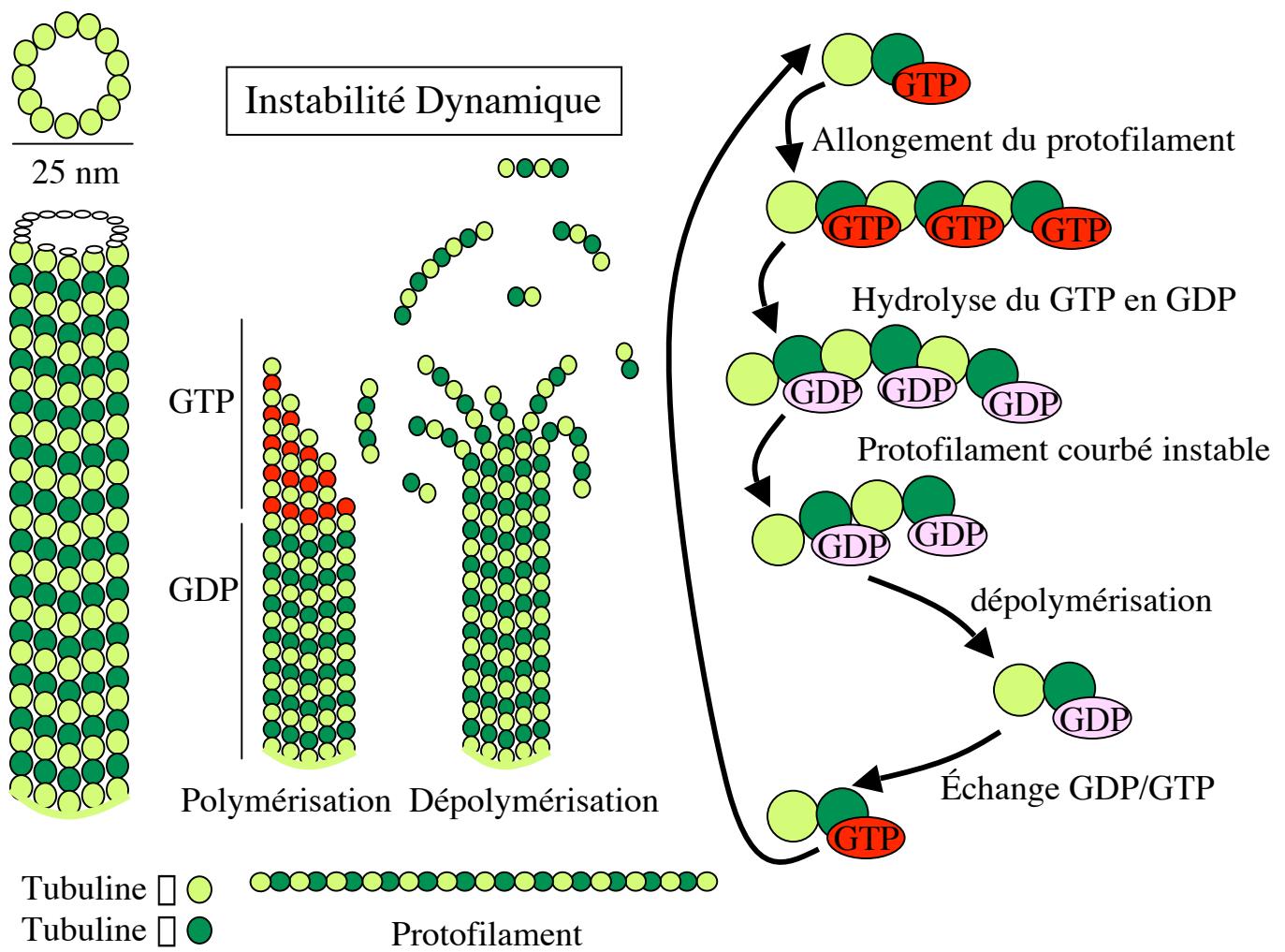
- CDK1 est régulée d'abord par son association aux Cyclines A et B. Ces Cyclines sont synthétisées au cours de l'interphase et dégradées en anaphase, permettant de restreindre l'activité de CDK1 à la phase de division cellulaire.
- CDK1 est régulée directement par phosphorylation. Les kinases Wee1 et Myt1 phosphorylent CDK1 sur ses résidus Tyr 15 chez la levure et les résidus Thr 14 et Tyr 15 chez les eucaryotes supérieurs. Ces phosphorylations sont inhibitrices. Les complexes CDK1/

Cyclines A-B qui s'accumulent en interphase sont ainsi inactivés systématiquement. La kinase CAK est capable de phosphoryler de façon activatrice CDK1 sur la Thr 161 chez la levure et les eucaryotes supérieurs. Cette phosphorylation activatrice se met en place en même temps que les deux phosphorylations inhibitrices. CDK1 liée à la Cycline B avec ces 3 sites phosphorylés constitue le pré-MPF. Ce pré-MPF s'accumule au cours de l'interphase. Les kinases Wee1 et Myt1 sont inhibées par hyperphosphorylation en début de mitose, ce qui empêche leur activité inhibitrice de CDK1 en mitose. Les résidus Tyr 15 et Thr 14 vont être déphosphorylés par la protéine phosphatase CDC25 afin de rendre CDK1 actif. C'est donc CDC25 qui déclenche l'entrée en mitose (pour revue voir Dorée, 2003). Un niveau de régulation supérieur existe: Wee1, Myt1 et CDC25 sont elles-même régulées par phosphorylation et dégradation. Les régulations par phosphorylation du MPF sont donc globalement les mêmes qu'en méiose.

- Le complexe CDK1/Cycline B peut également être régulé par des CKI. Ces protéines sont capables d'inhiber l'activité des complexes CDK/Cycline par simple liaison. p21^{Cip1} serait capable de bloquer l'accès à la CAK et donc d'inhiber les complexes CDK1/Cycline au cours de la transition G2/M (Smits et al., 2000).
- Enfin un autre moyen de réguler l'entrée en mitose est la localisation des différents partenaires de ces cascades d'activation. La Cycline B1 est localisée au centrosome et sur les microtubules interphasique en phases S et G2, alors qu'en prophase les complexes CDK1/Cycline B1 sont transloqués dans le noyau en corrélation avec la rupture de l'enveloppe nucléaire (Pines and Hunter, 1991). Cette localisation de la Cycline B1 est due à la présence d'une séquence de rétention cytoplasmique CRS (Pines and Hunter, 1994) et d'une séquence d'export nucléaire NES contenue dans la CRS (Hagting et al., 1999). La localisation de CDC25 suit celle de la Cycline B: cytoplasmique en interphase et nucléaire en début de mitose suite à son activation (Takizawa and Morgan, 2000). CDC25 comporte dans sa séquence une NES et un signal de localisation nucléaire NLS. Enfin Myt1 est cytoplasmique tout au long du cycle cellulaire. La localisation différentielle de tous les acteurs de l'entrée en phase M pourrait être un mécanisme de sécurité visant à renforcer les mécanismes d'activation de CDK1/Cycline B uniquement en mitose. Cette localisation sub-cellulaire des différents acteurs en méiose est peu étudiée, le mode de régulation par localisation étant encore peu approfondi dans ce système.

Le MPF une fois activé phosphoryle de nombreuses cibles et participe à la mise en place de processus essentiels tels que la rupture de l'enveloppe nucléaire et la mise en place du fuseau

Figure 15: microtubules et instabilité dynamique



de division. La membrane nucléaire est solubilisée, les microtubules se réorganisent et les chromosomes se condensent. Cela implique que la membrane nucléaire, les microtubules, les chromosomes et l'appareil de Golgi sont des cibles directes ou indirectes des complexes CDK/Cycline B. De nombreux substrats des complexes CDK/Cycline B ont été identifiés, incluant lamines, condensines, certains moteurs moléculaires, permettant d'expliquer comment le MPF initie les évènements structuraux de la mitose et de la méiose. Il existe cependant beaucoup de substrats à découvrir pour le MPF en mitose et en méiose, afin d'expliquer toutes ses fonctions.

4. Première phase M de méiose

41. Cas général de la formation des fuseaux de division et de l'alignement des chromosomes

La ségrégation correcte des chromatides sœurs en mitose et des chromosomes homologues en méiose est fondamentale à la vie. Cette ségrégation requiert une structure complexe appelée fuseau de division. Ce fuseau est formé de microtubules et de nombreuses protéines associées.

a) Les microtubules et les protéines associées

i. Les microtubules.

Les microtubules sont essentiels au bon déroulement du cycle cellulaire. En interphase, ils organisent le cytoplasme et positionnent le noyau et les organelles. Au cours de la division cellulaire ils s'organisent en fuseau de division afin de permettre une ségrégation égale du matériel génétique entre les deux cellules filles.

Chaque microtubule est un cylindre composé par une association parallèle de protofilaments. Pour revue voir (Desai and Mitchison, 1997; Nogales, 2000). Les protofilaments sont des polymères linéaires composés d'hétérodimères de tubuline α et β (figure 15). Les tubulines α et β sont identiques à 50% au niveau de leur séquence protéique (Burns, 1991). En section, un microtubule est composé de 13 protofilaments et mesure 25 nm de diamètre (figure 15).

Les microtubules sont très dynamiques et peuvent passer rapidement d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation. Cet état est appelé instabilité dynamique (Desai and Mitchison, 1997) et est basé sur la liaison et l'hydrolyse du GTP par les sous-unités de tubuline. Chaque monomère de tubuline peut lier une molécule de GTP. La liaison à la tubuline α est irréversible, alors que la liaison à la tubuline β est réversible. L'ajout

Figure 16: centrosome et polarité des microtubules

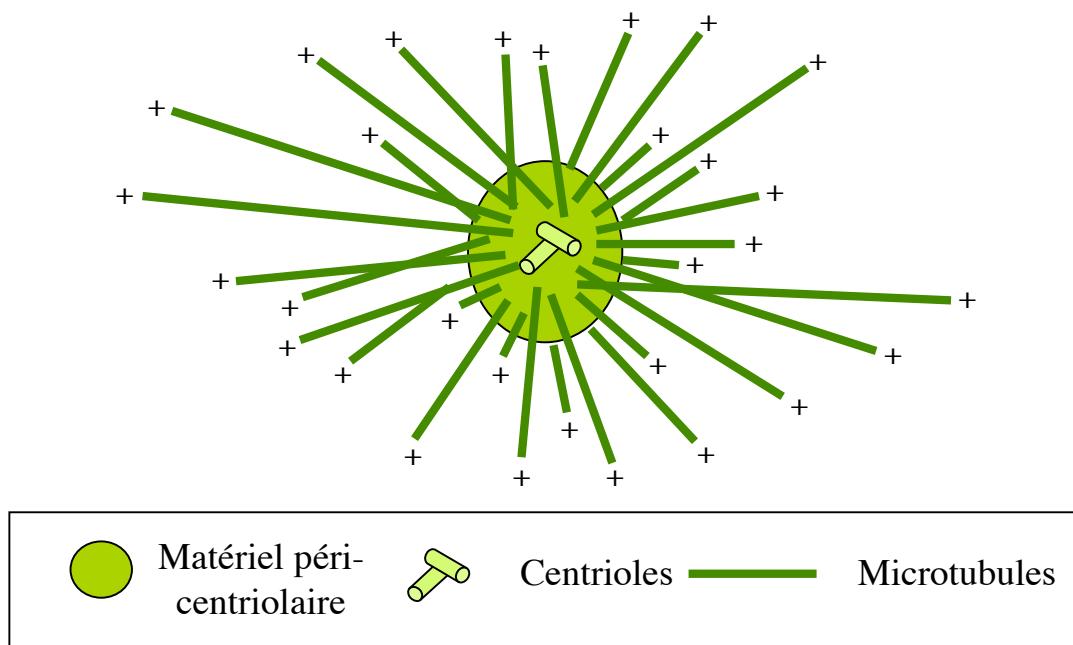
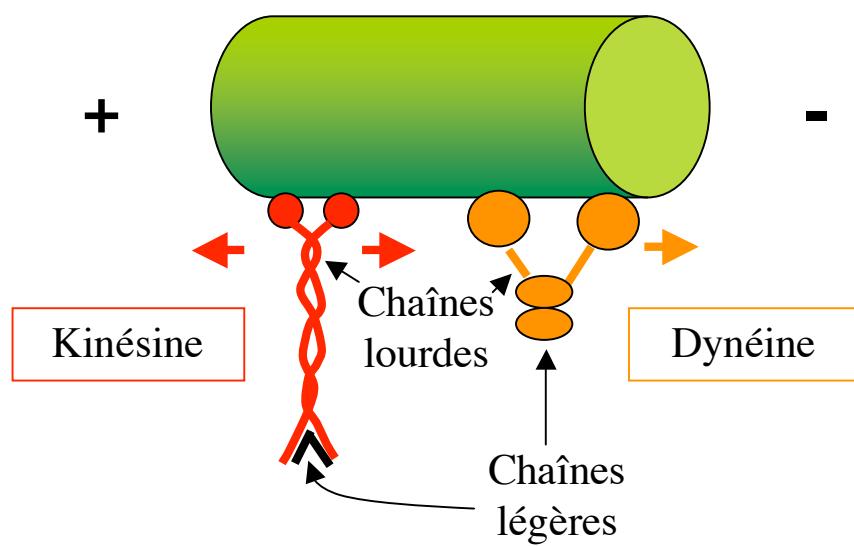


Figure 17: les moteurs



d'hétérodimères formés de tubuline α et β chargés en GTP au bout du protofilament le fait grandir, ajoutant le dimère au cylindre: le microtubule s'allonge (figure 15). L'hydrolyse du GTP en GDP va changer la conformation des sous-unités de tubuline formant les protofilaments, rendant le protofilament incapable de s'intégrer au cylindre préexistant. Les microtubules formés de tels protofilaments vont se désagrégner et les protofilaments se dissocier (figure 15).

Les microtubules ont une polarité définie par le bout où le microtubule croît le plus rapidement: l'extrémité moins des microtubules est celle qui pousse la moins vite, alors que l'extrémité plus est celle où la croissance est la plus rapide. L'extrémité moins des microtubules est proche d'un centre organisateur des microtubules (MTOC), qui nucléé les microtubules (figure 16). Le plus souvent, le centre organisateur des microtubules est un centrosome composé de deux centrioles et de matériel péri-centriolaire (PCM).

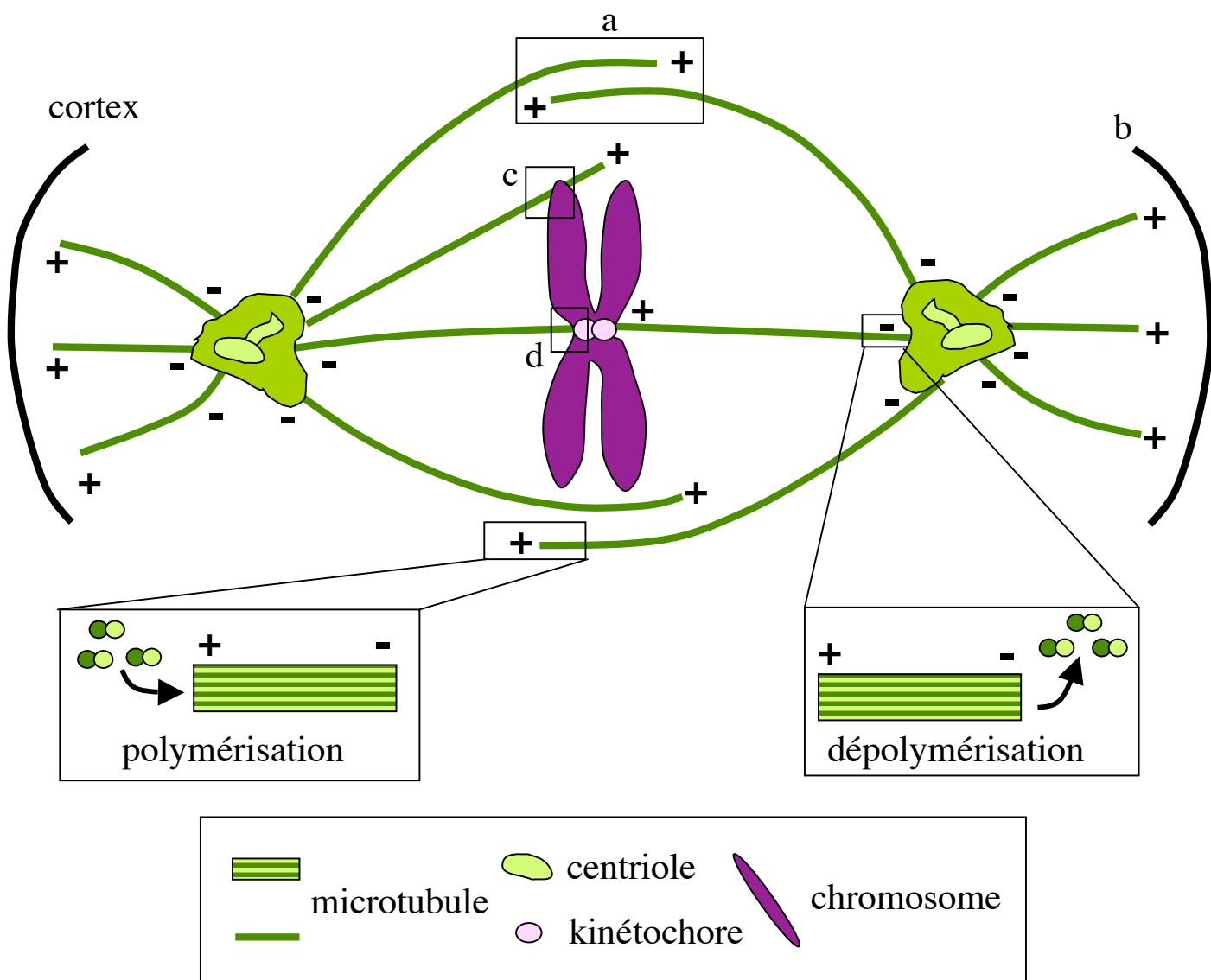
La régulation de la formation des microtubules passe par la transcription de différents isotypes de tubuline, par la conformation appropriée des hétérodimères de tubuline, par les modifications post-traductionnelles de la tubuline et par l'interaction avec de nombreuses protéines associées aux microtubules

ii. Facteurs stabilisants et déstabilisants.

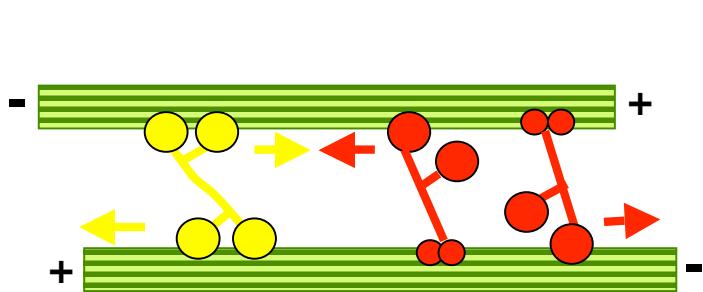
Des protéines se lient aux microtubules, les stabilisant ou au contraire les déstabilisant. Les MAPs (Microtubule Associated Proteins) sont des facteurs stabilisant des microtubules. XMAP215 chez le xénope promeut la croissance rapide des microtubules aux extrémités plus (Gard and Kirschner, 1987). Des MAPs structurales comme tau, MAP2 et MAP4 réduisent le taux de catastrophes, stabilisant donc les microtubules.

A l'inverse, il existe des agents déstabilisants des microtubules qui favorisent les catastrophes. Par exemple Op18/stathmine (Belmont and Mitchison, 1996) induit le désassemblage des microtubules en séquestrant la tubuline libre. La katanine, une ATPase, coupe les microtubules, les désassemblant en dimères de tubuline. La katanine, localisée aux pôles du fuseau, pourrait promouvoir le turnover des microtubules du fuseau. Elle pourrait également promouvoir le désassemblage des microtubules interphasiques au début de la mitose (McNally, 1996). La kinésine XKCM1 se lie aux bouts plus des microtubules et favorise la dépolymérisation des microtubules en stimulant de 7 à 10 fois les évènements de catastrophes. Cette protéine joue un rôle direct dans la formation du fuseau et à l'anaphase (Maney et al., 1998; Walczak et al., 1996).

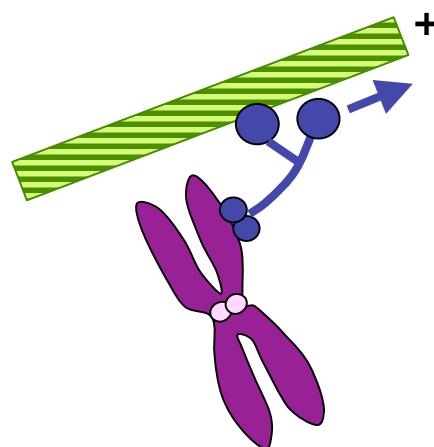
Figure 18: protéines responsables des différents mouvements existant dans le fuseau



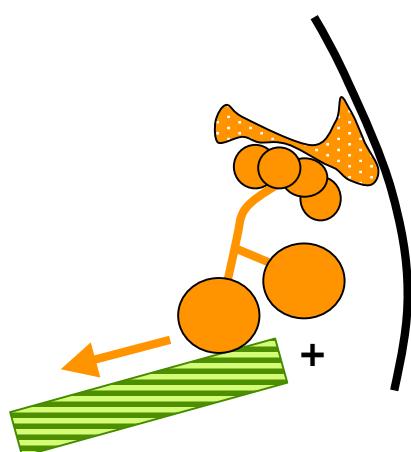
a Zone médiane



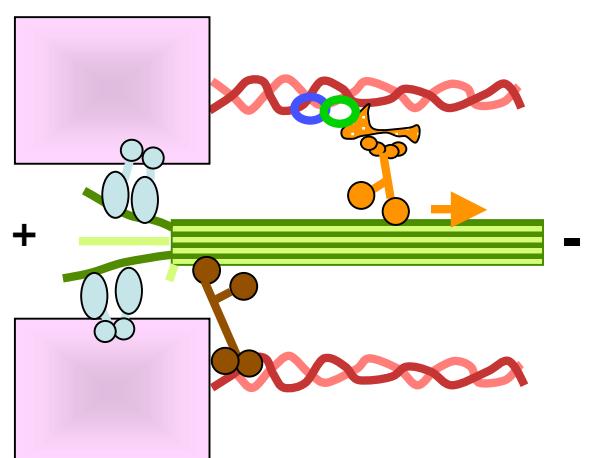
c bras des chromosomes



b cortex



d kinétochore



■ microtubule	○ dynéine cytoplasmique	● chromokinésine
● XCTK2	○ dynactine	○ ROD/ZW10
○ BimC	○ kinétochore	● CENP-E
☒ «fibrous corona☒	○ chromosome	○ MCAK
		↖ cortex

Table 1: les moteurs microtubulaires

Nom et famille	type	localisation	rôle
Eg5 (Kinésine de la famille <u>bimC</u>).	Moteur plus.	sur le fuseau de division et aux pôles.	séparation des centrosomes et la focalisation des pôles. Rôle dans la bipolarité du fuseau.
XKLP2.	Moteur plus.	sur le fuseau de division et aux pôles.	Séparation des centrosomes. Bipolarité.
MKLP1 (kinésine de la famille MKLP/CHO1).	Moteur plus.	mid-body.	Anaphase B.
XCTK2 (Kinésine de la famille <u>C-terminal</u>).	Moteur moins.	sur le fuseau de division et aux pôles.	Focalisation des pôles. Séparation des chromatides sœurs.
Dynéine cytoplasmique.	Moteur moins.	Sur le fuseau de division, aux pôles, aux kinétochores.	Focalisation des pôles, séparation des centrosomes, orientation du fuseau, mouvement de traction des chromosomes

Table 2: les moteurs chromosomiques

Nom et famille	type	localisation	rôle
CENP-E.	Moteur plus.	Aux kinétochères.	Formation des fibres kinétochoriennes et congression. Anaphase.
XKLP1 <u>(chromokinésine).</u>	Moteur plus.	sur les chromosomes.	Congression des chromosomes.
Xkid (<u>chromokinésine</u>). Nod (homologue drosophile)	Moteur plus.	Sur les chromosomes.	Congression des chromosomes. Anaphase.
MCAK/XKCM1 (kinésine de la famille MCAK/Kif2).	Moteur plus.	Sur les kinétochères.	Réparation de l'attachement des kinétochères. Anaphase.

iii. Les moteurs associés.

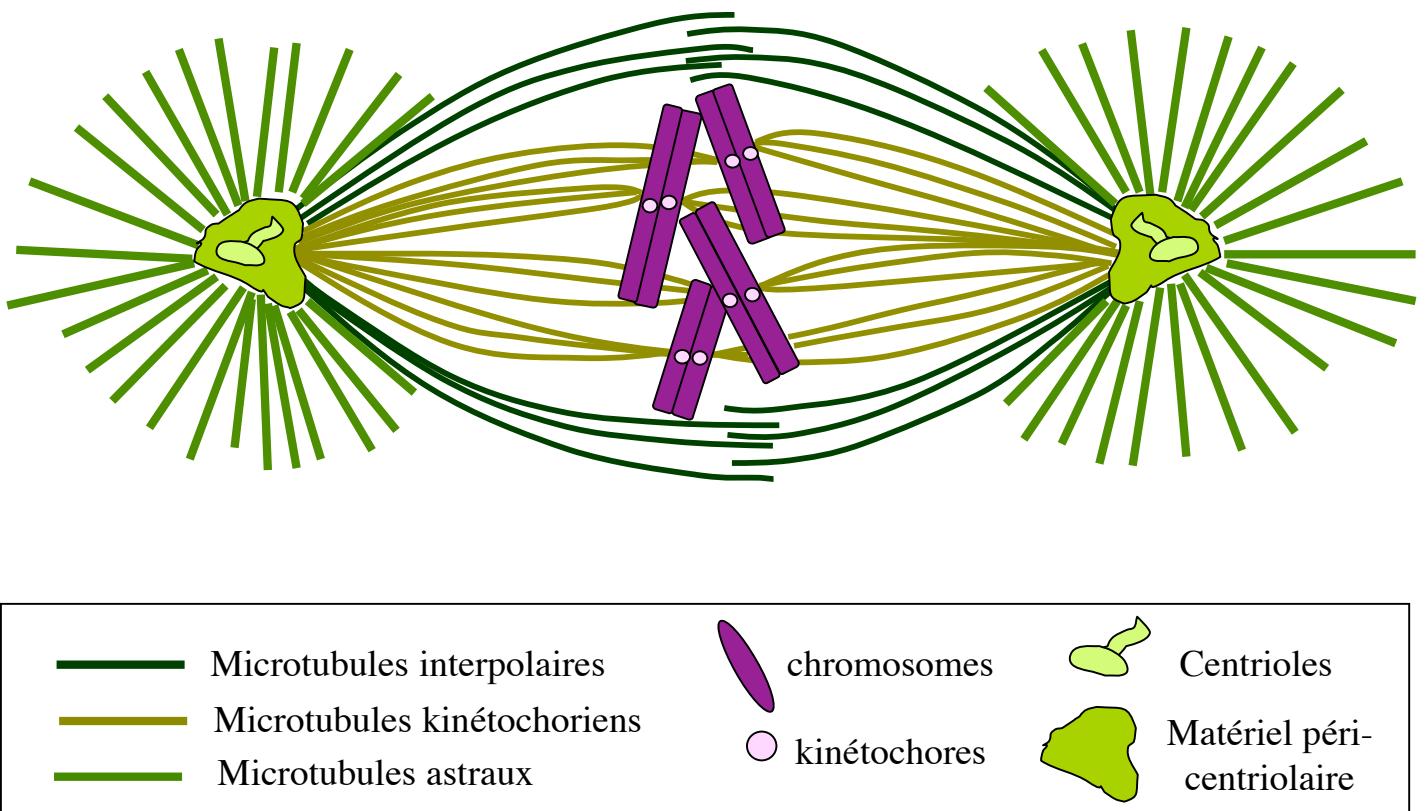
Des protéines appelées moteurs sont capables de parcourir les microtubules dans un sens (vers l'extrémité plus ou moins) et peuvent transporter des protéines ou organelles de façon dirigée. Ces moteurs sont composées de deux chaînes lourdes identiques et de plusieurs chaînes légères variables leur conférant leur spécificité. Chaque chaîne lourde forme une tête globulaire qui attache la protéine au microtubule de manière ATP dépendante. Parmi ces moteurs, les kinésines vont vers l'extrémité plus ou moins du microtubule, alors que la dynéine cytoplasmique va vers l'extrémité moins (figure 17). Dans chaque famille, il existe différentes sortes de moteurs, qui peuvent transporter des cargos différents.

Goshima et Vale ont réalisé une étude exhaustive du rôle des dynéines et kinésines de drosophile (au nombre de 25) en mitose (Goshima and Vale, 2003). Pour cela, ils ont inhibé par RNAi l'expression de toutes ces protéines, en effectuant également des combinaisons de RNAi (Goshima and Vale, 2003). Cette étude a montré que ces protéines ont des fonctions potentiellement redondantes et sont impliquées dans tous les processus visant à assurer la fonction du fuseau de division: la séparation des centrosomes, la formation d'un fuseau bipolaire, la congression des chromosomes, la séparation des chromatides sœurs à l'anaphase. Ces moteurs médient leurs fonctions par trois mécanismes différents (figure 18 a,c,d, Sharp et al., 2000):

- Ils établissent des liens parallèles ou anti-parallèles entre microtubules, permettant d'aider à la mise en place et au maintien de la bipolarité du fuseau. La mise en place de la bipolarité est liée à la séparation des centrosomes dupliqués (dans le cas des cellules avec centrosomes) puis à la focalisation des deux pôles ainsi obtenus. Le maintien de la bipolarité passe par la mise en place de fibres kinétochoriennes et par le renforcement des liens anti-parallèles entre microtubules du fuseau. Dans cette catégorie, on peut citer Eg5, MKLP1, XCK2 et le complexe dynéine/dynactine (table 1, figure 18a).

- Ils peuvent effectuer le transport de protéines cargo le long du microtubule, par exemple le transport des chromosomes le long des microtubules vers la plaque métaphasique lors de la congression (pour les moteurs plus) ou vers le pôle en anaphase (pour les moteurs moins). CENP-E et la dynéine cytoplasmique médient ces rôles (table 1 et 2). D'autres types de moteurs comme les chromokinésines dont Xkid (table 2) génèrent également les forces d'éjection polaires exercées sur les bras des chromosomes, permettant l'alignement des

Figure 19: les différentes sortes de microtubules du fuseau



chromosomes sur la plaque métaphasique (figure 18c et d).

- Enfin certains moteurs, comme par exemple XKCM1 (table 2) régulent la dynamique des microtubules en induisant la polymérisation ou dépolymérisation du microtubule. Ces moteurs assurent la réparation des erreurs d'attachement des chromosomes au fuseau et jouent un rôle important à l'anaphase (figure 18d).

b) Les différents types de microtubules dans un fuseau de division

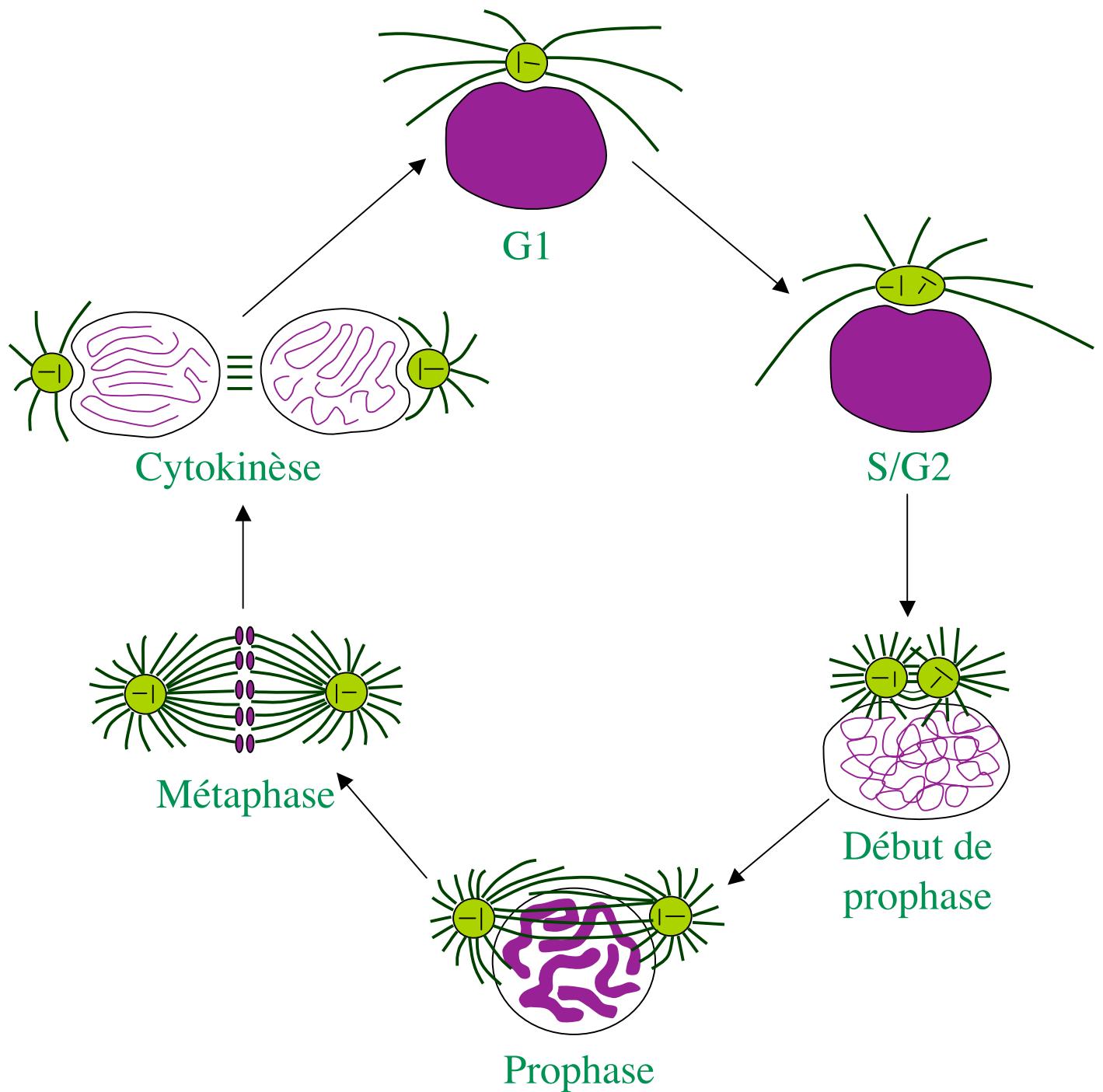
Le fuseau est formé de microtubules arrangés de façon symétrique et fusiforme. Un fuseau de mammifère « type » contient plus de 3000 microtubules divisés entre les deux moitiés du fuseau. Les microtubules dans le fuseau ont une polarité uniforme: les extrémités moins sont orientées vers les pôles et les extrémités plus sont près du cortex de la cellule ou près des chromosomes.

Il existe trois classes de microtubules formant le fuseau, qui sont définies par la position de l'extrémité plus du microtubule (figures 18 et 19). La première classe constitue les microtubules kinétochoriens. Ces microtubules vont du pôle du fuseau aux kinétochores des chromosomes. Tous les microtubules associés à un kinétochore vont former un câble de microtubules appelé fibre kinétochorienne.

La seconde classe constitue les microtubules astraux. Ils émanent du pôle du fuseau et s'étendent vers le cortex de la cellule par leur extrémité plus jusqu'à interagir avec le cortex (figure 18b). Cette interaction joue un rôle important dans le positionnement du fuseau dans la cellule et dans la localisation du plan de clivage durant la cytokinèse. Ces microtubules astraux n'existent pas dans tous les systèmes, notamment dans les systèmes acentriolaires comme les ovocytes.

La troisième classe est constituée par les microtubules interpolaires, qui s'étendent d'un pôle du fuseau jusqu'à l'autre pôle. Ces microtubules forment des câbles de microtubules durant la métaphase, avec une préférence pour les interactions anti-parallèles (un microtubule d'un pôle interagissant avec un microtubule de l'autre pôle). Ces interactions pourraient jouer un rôle en métaphase dans le maintien de la structure bipolaire du fuseau, en s'opposant aux forces générées par les kinétochores et jouer un rôle en anaphase pour pousser les pôles de façon opposée (anaphase B).

Figure 20: le cycle du centrosome



La mise en place des fuseaux implique une grande diversité de protéines et d'activités enzymatiques qui influencent l'organisation et la dynamique des microtubules, de façon directe ou indirecte. La formation des fuseaux de division varie également selon que la cellule possède des centrioles ou non, les deux mécanismes coexistant dans une cellule avec centrioles (pour revue voir Compton, 2000).

c) Changement d'état des microtubules en début de division cellulaire.

La dynamique des microtubules change dramatiquement au début de la mitose et de la méiose. En interphase, les microtubules forment un réseau étendu à travers le cytoplasme. Les microtubules interphasiques sont longs et stables avec une demi-vie de plus de 10 minutes. Quand les cellules entrent en mitose, le taux de catastrophe augmente de 7 à 10 fois, ayant pour conséquence un changement de stabilité des microtubules qui deviennent courts et très instables, avec une demi-vie de moins de 60 secondes (Cassimeris, 1999; Inoue and Salmon, 1995; McNally, 1996).

d) Mise en place du fuseau

i. cas des cellules avec centrosomes pourvus de centrioles.

Le centrosome est classiquement composé d'une paire de centrioles entourés de matériel dense aux électrons, appelé matériel péri-centriolaire. Les centrioles sont des cylindres de 0,25 µm de diamètre, composés de neuf triplets de microtubules. Les microtubules sont nucléés à partir du matériel péri-centriolaire. La γ tubuline joue un rôle important dans la nucléation des microtubules. Elle forme des structures en forme d'anneau qui vont servir d'amorce à la croissance des microtubules (Moritz et al., 1995).

En phase G1, chaque cellule contient un centrosome. Au cours de la phase S, en même temps que la synthèse de l'ADN, se produit la duplication des centrioles. Les cellules en phase G2 et M ont donc deux centrosomes fonctionnels. En prophase, les centrosomes se séparent et se positionnent de part et d'autre de la membrane nucléaire, générant deux asters de microtubules à l'opposé dans la cellule (figure 20). Plusieurs facteurs importants pour la séparation des centrosomes en prophase ont été mis en évidence: la dynéine cytoplasmique, XKLP2, Eg5 et XCKT2 (table 1) (Blangy et al., 1997; Blangy et al., 1995; Gaglio et al., 1996; Heck et al., 1993; Mountain et al., 1999; O'Connell et al., 1993; Pidoux et al., 1996; Saunders

et al., 1997; Saunders and Hoyt, 1992; Sawin et al., 1992; Sharp et al., 1999a; Sharp et al., 1999b; Wilson et al., 1997; Wittmann et al., 1998). La perturbation de ces protéines entraîne l'absence de séparation du centrosome et la perte de la bipolarité. Chaque pôle du fuseau contient un centrosome, responsable de la nucléation des microtubules.

Après leur duplication, les centrosomes subissent un phénomène de maturation augmentant leur capacité nucléatrice de microtubules (Khodjakov and Rieder, 1999; Palazzo et al., 2000). Les kinases Polo (Lane and Nigg, 1996) et Aurora A (Berdnik and Knoblich, 2002; Hannak et al., 2001) sont impliquées dans cette maturation, Aurora A via la phosphorylation de Eg5 (table 1) (Giet et al., 1999).

Une fois la bipolarité établie suite à la séparation des centrosomes, il est nécessaire de focaliser les deux pôles obtenus. Deux protéines impliquées dans la focalisation des extrémités moins des microtubules aux pôles du fuseau sont des moteurs moins: la dynéine cytoplasmique et XCKT2 (table 1) (Gaglio et al., 1996; Mountain et al., 1999; Walczak et al., 1998).

Des expériences d'ablation des centrosomes dans divers systèmes ont montré que les centrosomes sont nécessaires pour la formation du fuseau (Maniotis and Schliwa, 1991; Sluder et al., 1985; Zhang and Nicklas, 1995). Par contre, quand le fuseau bipolaire est formé, les centrosomes ne sont pas indispensables à l'organisation et à la fonction du fuseau. Il est possible en effet d'enlever les centrosomes des pôles par micromanipulation et cela ne produit aucun effet sur la fonctionnalité du fuseau à l'anaphase (Nicklas, 1989). De plus, 75% des microtubules interpolaires et 50% des microtubules kinétochoriens ne sont pas directement ancrés aux centrosomes en métaphase (Mastronarde et al., 1993). Enfin, des travaux récents en cellules de mammifères montrent des microtubules périphériques non associés au centrosome sont utilisés dans la formation du fuseau (Tulu et al., 2003).

Le centrosome est donc essentiel aux évènements précoce de formation du fuseau en tant que centre organisateur des microtubules, puis facultatif quand le fuseau est déjà formé avec des pôles bien individualisés.

ii. Sans centrioles: quelles cellules?

Certaines cellules effectuent leur division cellulaire sans centrosomes conventionnels en utilisant une voie dépendante de la chromatine permettant de mettre en place le fuseau de division. Leurs centres organisateurs de microtubules sont des structures composées uniquement de matériel péri-centriolaire (Gueth-Hallonet et al., 1993). Cela inclut les cellules

des plantes au cours de leur mitose (Smirnova and Bajer, 1992) et les ovocytes de nombreuses espèces (de Saint Phalle and Sullivan, 1998; Maro et al., 1985; McKim and Hawley, 1995; Theurkauf and Hawley, 1992). En pro-métaphase de méiose I dans beaucoup d'espèces, les microtubules sont présents dans le cytoplasme de la cellule et comme pour les cellules avec centrosomes conventionnels en pro-métaphase, ces microtubules sont courts et instables. Ces microtubules sont nucléés à partir d'anneaux de γ -tubuline libres dans le cytoplasme, les γ -TuRC (Zheng et al., 1995). Ces TuRC sont associés aux centrosomes conventionnels dans les cellules somatiques (Moritz et al., 1995), mais dans les ovocytes ces complexes sont actifs pour nucléer des microtubules sans être associés à des centrioles.

iii. Un système dépendant de la chromatine.

Des données provenant de divers systèmes démontrent que la chromatine stimule la polymérisation des microtubules en phase M.

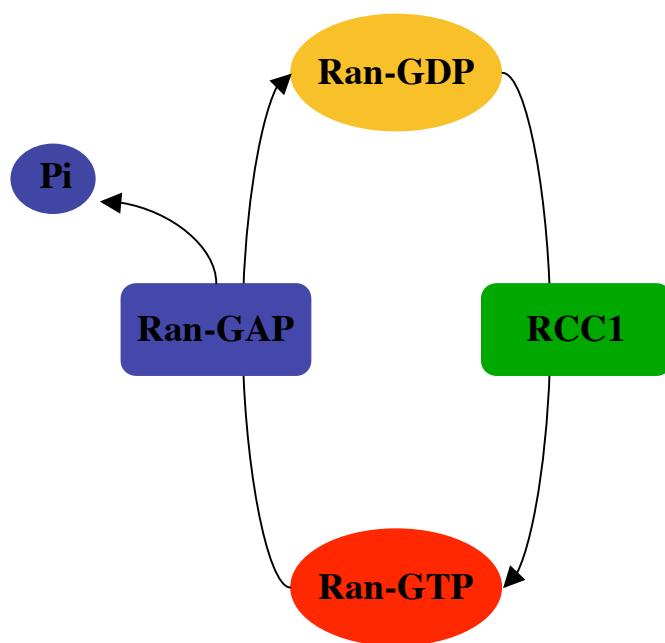
Des expériences réalisées dans des spermatocytes de sauterelle *Melanoplus differentialis* ont montré l'importance des chromosomes dans l'assemblage des microtubules du fuseau: l'ablation partielle des chromosomes provoque une réduction de la quantité totale des microtubules du fuseau. Cette réduction n'est pas proportionnelle au nombre de kinétochères absents mais à la masse de chromatine éliminée (Nicklas and Gordon, 1985).

Ce rôle de la chromatine a été confirmé par des expériences réalisées dans des extraits d'œufs de xénope (Sawin and Mitchison, 1991). Par exemple la fréquence de catastrophes des microtubules provenant de centrosomes mis en contact avec de la chromatine diminue (Dogterom et al., 1996). La chromatine inverse donc localement la déstabilisation globale des microtubules en phase M.

Dans des systèmes acentriolaires, les mêmes résultats ont été obtenus. La microinjection de noyaux issus de karyoplastes, ou l'injection d'ADN de phage dans des œufs de xénope non fécondés bloqués en métaphase (et dépourvus de centrioles), provoque la formation de réseaux bipolaires de microtubules autour de la chromatine (Karsenti et al., 1984b). Des billes recouvertes d'ADN induisent la formation d'un fuseau bipolaire autour d'elles (Heald et al., 1996; Karsenti et al., 1984a; Karsenti et al., 1984b; Karsenti et al., 1984c). Enfin, un fuseau bipolaire peut s'assembler dans des cellules somatiques de mammifère après ablation de leurs centrosomes (Khodjakov et al., 2000).

Dans tous ces systèmes, la chromatine seule est donc capable d'induire l'assemblage de microtubules dans un cytoplasme déstabilisant, indépendamment de sources prédéfinies de

Figure 21: régulation de la RAN GTPase



microtubules.

Ce mode de formation du fuseau dépendant de la chromatine existe dans les cellules sans et avec centrosomes conventionnels, ajoutant un niveau plus complexe de régulation de la formation du fuseau que le simple modèle de recherche et capture des microtubules (Carazo-Salas and Karsenti, 2003). Dans les cellules avec centrioles, les chromosomes ne seraient pas requis pour la morphogénèse initiale du fuseau, mais pour sa stabilisation.

iii. effet chromatine et la voie Ran.

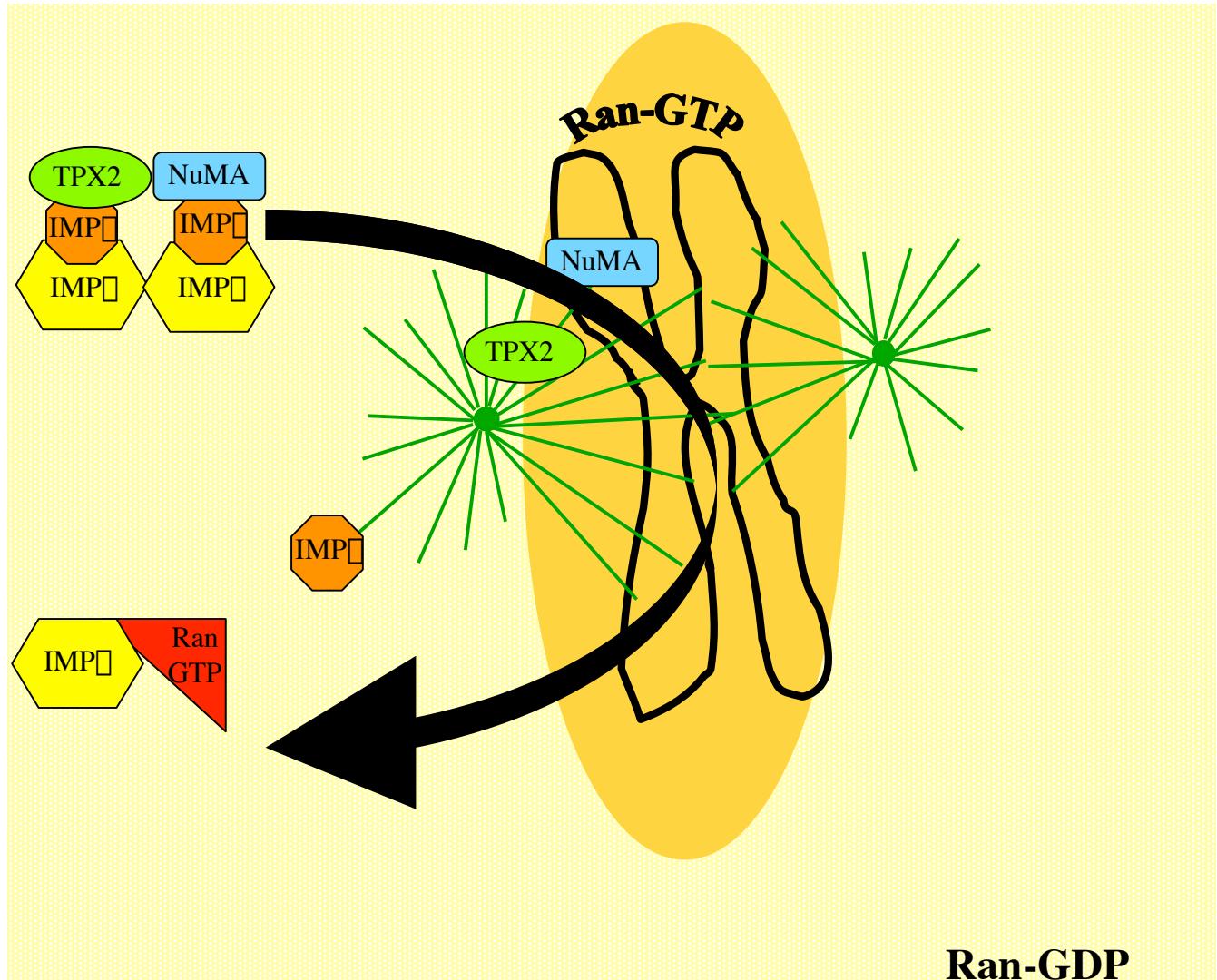
L'effet chromatine est médié principalement par la protéine Ran, une petite GTPase de la famille des Ras (Mattaj and Englmeier, 1998). Pour revue voir (Dasso, 2002). Ran est un élément majeur du contrôle du transport nucléo-cytoplasmique en interphase. Ran est impliquée également dans l'inhibition de la re-réplication en phase S (Yamaguchi and Newport, 2003). Enfin Ran est impliquée dans la formation des fuseaux de division dans des extraits d'œufs de xénope: Ran, associée au GTP, déclenche l'assemblage de microtubules et leur organisation en fuseau en l'absence de centrosomes, voir même de chromosomes (Carazo-Salas et al., 2001).

Ran peut se trouver sous deux formes: une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Le passage d'une forme à l'autre s'effectue par des facteurs d'échange (figure 21). RCC1, le facteur d'échange permettant l'accumulation de Ran-GTP, est localisée au niveau des chromosomes via les histones H2A et H2B (Bischoff and Ponstingl, 1991; Mattaj and Englmeier, 1998; Nemergut et al., 2001), permettant la concentration de Ran-GTP autour des chromosomes et l'obtention d'un gradient (Joseph et al., 2002; Kalab et al., 2002). RCC1 est phosphorylée par CDK1 dans des cellules de mammifères et cette phosphorylation est requise pour assurer la fonction de RCC1 (Li and Zheng, 2004). Ran seule peut également se localiser aux chromosomes de manière indépendante de RCC1, via des interactions avec les histones H3 et H4 (Bilbao-Cortes et al., 2002). Ran se localise sur les chromosomes en méiose chez le xénope et la souris (Hinkle et al., 2002).

Ran-GAP (Bischoff et al., 1995), qui permet l'hydrolyse du GTP en GDP et donc la concentration de Ran-GDP, se localise dans le cytoplasme, sur les fuseaux mitotiques et aux kinétochores en mitose, alors qu'elle est cytoplasmique en interphase (Joseph et al., 2002).

Sous sa forme active liée au GTP, Ran dissocie des complexes formés des importines α et β et de protéines cargo importantes dans la formation des fuseaux de division (Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001). Ran-GTP étant concentrée dans la région des

Figure 22: l'effet chromatine



chromosomes, elle permet l'activation des protéines cargo seulement autour de la chromatine, restreignant la mise en place du fuseau autour des chromosomes. Ailleurs, Ran étant sous sa forme inactive liée au GDP, les protéines cargo sont inhibées par leur association aux importines α et β , rendant le cytoplasme non permisif à la nucléation de microtubules (figure 22).

Cependant il a été montré récemment dans des cellules de mammifère en culture que Ran-GTP se localise aussi aux centrosomes et pas seulement sur les chromosomes, ce qui va à l'encontre d'un gradient de Ran-GTP restreint uniquement aux chromosomes (Keryer et al., 2003).

iiii. les cibles de la voie Ran.

Les protéines cargo, cibles de la voie Ran, comportent dans leur séquence une NLS qui assure l'interaction avec les importines.

NuMA est une MAP, cible mototique de la voie Ran. NuMA interagit avec l'importine β via sa NLS et cette liaison peut être abolie par l'ajout de Ran-GTP, montrant que NuMA est une cible de Ran (Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001). NuMA est une protéine nucléaire qui s'associe au fuseau de division (Compton and Cleveland, 1994). En extraits d'œuf de xénophage, la dynéine cytoplasmique, la dynactine et NuMA forment un complexe qui est essentiel à l'organisation des pôles du fuseau (Merdes et al., 1996). NuMA est transportée sur les microtubules par le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine afin d'assurer son rôle aux pôles (Merdes et al., 2000; Merdes et al., 1996). Ces protéines interagissent uniquement en mitose, la dynéine et dynactine étant cytoplasmiques et NuMA étant nucléaire en interphase. La perturbation de l'une d'entre elles entraîne des défauts similaires dans la structure du fuseau (Echeverri et al., 1996 ; Gaglio et al., 1997; Gaglio et al., 1996; Gaglio et al., 1995): le centrosome se détache du pôle du fuseau. NuMA organise et stabilise donc les extrémités moins des microtubules aux pôles des fuseaux.

TPX2, une MAP, est une autre cible de Ran. Elle interagit avec l'importine α via sa NLS (Gruss et al., 2001). TPX2 est capable d'ancrer XKLP2 aux pôles du fuseau (Merdes et al., 1996; Wittmann et al., 1998; Wittmann et al., 2000) et joue un rôle dans l'organisation et la focalisation des pôles du fuseau (Wittmann et al., 2000). TPX2 est localisée aux pôles via la dynéine cytoplasmique. TPX2 est capable de créer des liens entre les microtubules, permettant l'organisation de ces microtubules en asters. Cette propriété n'est pas régulée par l'importine α . L'activité principale de TPX2 est de nucléer des microtubules; cette activité est

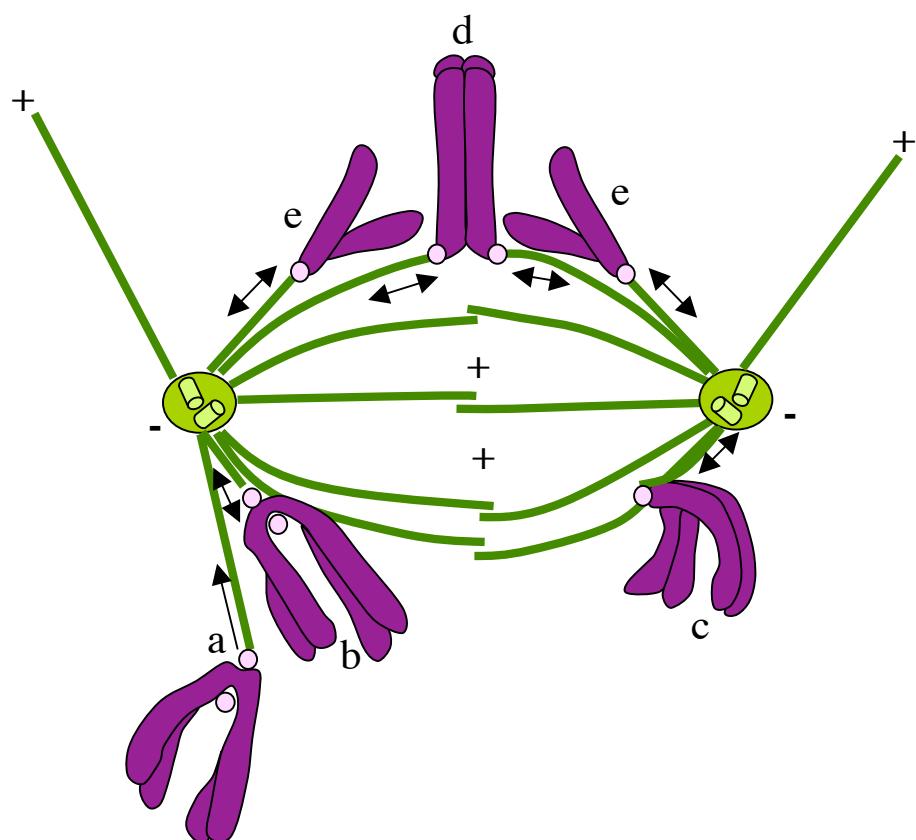
dépendante de la voie Ran (Gruss et al., 2001; Schatz et al., 2003). TPX2 est capable de localiser Aurora A (Bayliss et al., 2003; Giet et al., 1999) aux microtubules du fuseau. La localisation d'Aurora A aux pôles en revanche est indépendante de TPX2 (Eyers and Maller, 2004; Kufer et al., 2002; Tsai et al., 2003). Ran-GTP stimule l'interaction entre TPX2 et Aurora A, interaction qui est réalisée sur les microtubules du fuseau et pas uniquement sur les chromosomes, suggérant l'existence de Ran-GTP ailleurs que sur les chromosomes. TPX2 stimule alors la phosphorylation et l'activité kinase de Aurora A de façon dépendante des microtubules en inhibant l'activité PPI qui déphosphoryle Aurora A (Biggins et al., 1999; Hsu et al., 2000; Katayama et al., 2001; Sasoon et al., 1999). Aurora A phosphorylée et donc kinasiquement active (Walter et al., 2000) est requise pour établir et/ou maintenir le fuseau bipolaire dans des systèmes variés comme la drosophile ou les cellules en culture de tissus (Giet et al., 2002; Giet and Prigent, 2000; Glover et al., 1995; Hannak et al., 2001; Katayama et al., 2001 ; Roghi et al., 1998; Schumacher et al., 1998). Son rôle sur le maintien du fuseau pourrait passer par sa liaison à Eg5 (Giet et al., 1999). Par ailleurs Ran semble également activer Eg5 dans des extraits d'œufs de xénophage (Wittmann et al., 2001).

En conclusion, les importines α et β se lient et inhibent TPX2 et NuMA, des protéines requises dans la mise en place du fuseau. Ran-GTP près des chromosomes déstabilise ces complexes, permettant l'activation des facteurs requis dans la mise en place du fuseau près des chromosomes. Loin des chromosomes, Ran-GTP serait convertie en Ran-GDP, permettant la réassociation des complexes inhibiteurs de la formation du fuseau (figure 22). Au cours de l'interphase, les importines α et β séquestrent TPX2 et NuMA dans le noyau, empêchant leur activation ectopique dans le cytoplasme.

e) Les kinétochores et les mouvements des chromosomes dans le fuseau

En mitose ou méiose, les chromosomes sont constitués de paires de chromatides sœurs liées entre elles par leur centromère. Les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique et sont attachés aux microtubules par leurs kinétochores. Les kinétochores sont des structures associées au centromère des chromosomes. Pour revue voir (Cleveland et al., 2003). Chaque chromosome possède une paire de kinétochores, chaque chromatide sœur ayant un kinétochore qui peut lier 1 à 40 microtubules (selon les espèces). Le kinétochore est le lieu d'attachement des microtubules sur le chromosome. Le kinétochore contient des protéines structurales comme CENP-A, B et C, des moteurs comme la dynéine cytoplasmique (Pfarr et al., 1990; Steuer et al., 1990) et CENP-E (Yen et al., 1991), des protéines modulant la stabilité

Figure 23: mouvements des chromosomes sur le fuseau de division



- a: un microtubule contacte un kinétochore au hasard et tire le chromosome vers le pôle le plus proche.
- b: mono-orientation et mise en place de la fibre kinétochorienne.
- c: oscillations autour du pôle puis capture de l'autre kinétochore par un microtubule. Le chromosome va vers la plaque équatoriale. C'est la congression.
- d: bi-orientation et oscillations autour de la plaque métaphasique.
- e: séparation des chromatides sœurs à l'anaphase.

des microtubules comme XKCM1 (Desai and Hyman, 1999; Maney et al., 1998), d'autres protéines comme CENP-F, ZW10, CLIP170, des protéines passagères les INCENPs et des protéines du point de contrôle du fuseau comme Mad2 et Bub1.

Toutes ces protéines médient les fonctions des kinétochores: permettre la capture, le mouvement et l'alignement des chromosomes sur le fuseau de division (figure 23). Cela passe par l'attachement d'un premier microtubule à un kinétochore, à la mono-orientation dûe à la mise en place d'une fibre kinétochorienne, à l'attachement du second kinétochore au fuseau, à la bi-orientation du chromosome et à son alignement sur la plaque métaphasique ou congression et à la séparation des chromatides sœurs en anaphase. Ces protéines médient ces effets grâce à la modulation de la dynamique des microtubules lors du mouvement des chromosomes, aux forces exercées par les moteurs et à l'activation du point de contrôle du fuseau si un kinétochore n'est pas attaché au fuseau (Rieder and Salmon, 1998; Yen and Schaar, 1996) pour revue voir (Biggins and Walczak, 2003).

En mitose, les chromosomes sont attachés de façon bipolaire, chaque chromatide sœur étant reliée par son kinétochore à un pôle du fuseau. En méiose I, les chromosomes sont attachés de façon monopolaire, les deux chromatides sœurs formant un chromosome étant attachées par leurs kinétochères au même pôle du fuseau. Cela permet de séparer les chromosomes homologues en méiose I sans séparer les chromatides soeurs.

i. Congression.

L'acquisition de l'attachement bipolaire est favorisé par les forces d'éjection polaires qui poussent les chromosomes mono-orientés à l'équateur de la cellule vers l'autre pôle, permettant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique ou congression (Rieder et al., 1994). Ces forces sont générées par les microtubules qui émanent des deux asters centrosomiques. Acquérir un attachement bipolaire prend un certain temps, ce qui est corrélé à la longueur de la pro-métaphase qui est en général la phase la plus longue de la mitose et de la méiose. Là encore différents moteurs sont requis pour l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique.

Xkid (table 2), une kinésine localisée sur les bras des chromosomes, est nécessaire à l'alignement des chromosomes et à son maintien. Xkid serait responsable des forces d'éjection polaires sur les bras des chromosomes (Antonio et al., 2000; Funabiki and Murray, 2000; Levesque and Compton, 2001), leur permettant de se rapprocher de la plaque équatoriale.

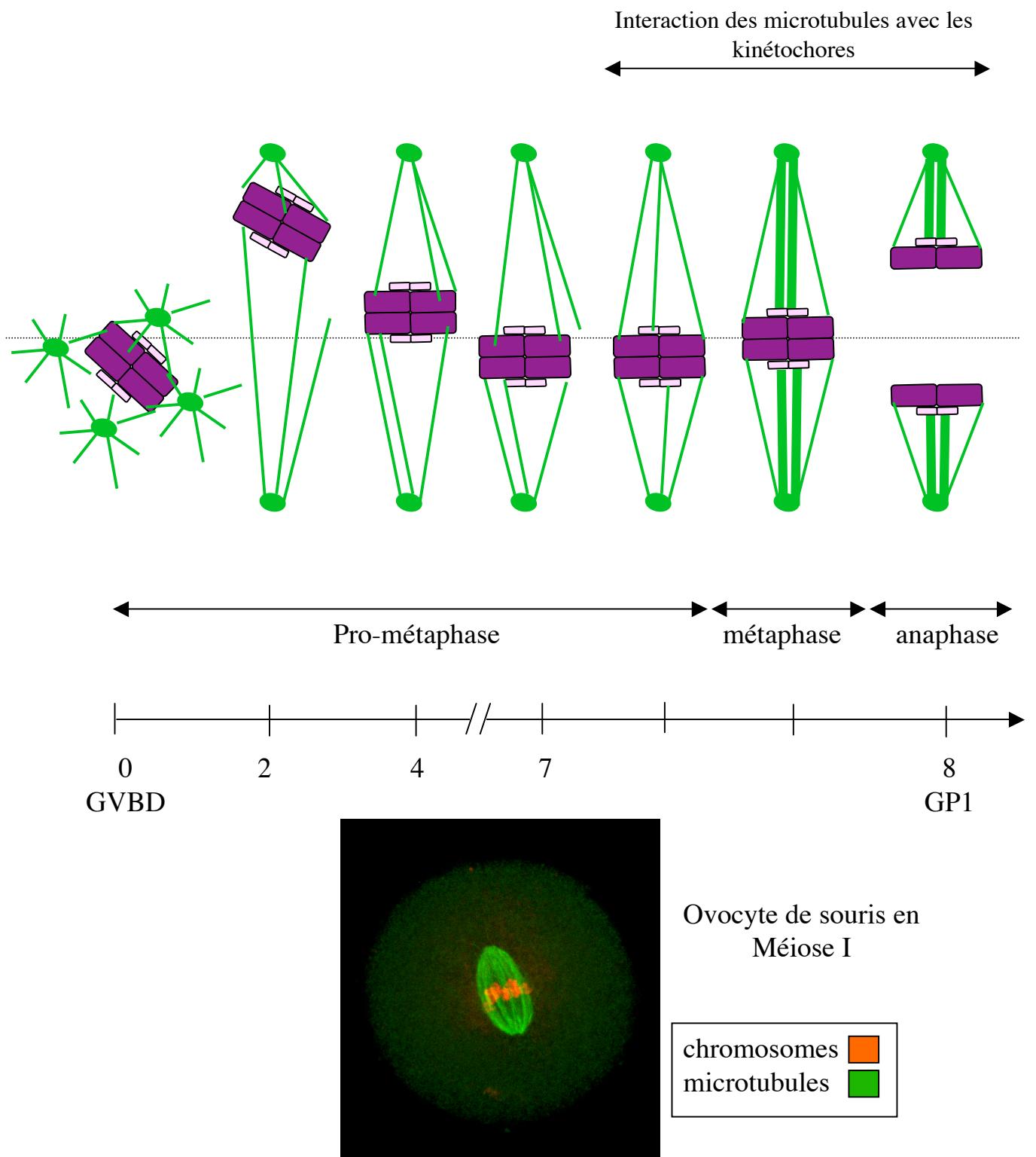
Des expériences en extraits d'ovocytes de xénope et dans des cellules en culture indiquent que CENP-E (table 2), essentielle à la formation des fibres kinétochoriennes, est impliquée dans la congression des chromosomes (Schaar et al., 1997; Wood et al., 1997). La perturbation de la fonction de CENP-E empêche les chromosomes de s'aligner efficacement sur la plaque métaphasique (Schaar et al., 1997). L'ancrage et le maintien des extrémités plus des microtubules dans le kinétochore nécessitent aussi l'action de CENP-E (Yao et al., 2000) (figure 18d). CENP-E est donc essentielle au positionnement des chromosomes sur le fuseau et au maintien de l'attachement des chromosomes. L'étude de souris invalidées pour CENP-E a montré que cette protéine est indispensable au maintien de la stabilité chromosomique, grâce à la stabilisation de la capture des kinétochores par les microtubules (Putkey et al., 2002).

Les chromosomes une fois alignés sur la plaque métaphasique oscillent de part et d'autre de celle-ci.

f) Fuseaux et MAP Kinase.

Les MAPK induisent *in vitro* la réorganisation des microtubules interphasiques vers une organisation métaphasique dans des extraits d'ovocytes de xénope (Gotoh et al., 1991). Depuis, Horne MM *et al* ont montré que la MAPK pourrait être impliquée dans la formation des fuseaux. L'inhibition ou la déplétion de la MAPK dans des extraits d'œufs de xénope entraîne des défauts d'organisation des fuseaux qui ressemblent à des asters ou à des hémi-fuseaux. Une augmentation de la longueur et de la polymérisation des microtubules a pu être mise en évidence dans de tels extraits, suggérant que la MAPK régule la dynamique des microtubules. L'inhibition de la MAPK après la formation des fuseaux entraîne le désassemblage de ces fuseaux en gros asters (Horne and Guadagno, 2003). De plus, les formes actives de ERK1/2 se localisent de la prophase à l'anaphase aux pôles du fuseau, aux microtubules du fuseau, aux kinétochores et au mid-body pendant la cytokinèse, suggérant que la voie MAPK pourrait réguler l'assemblage et/ou les fonctions du fuseau mitotique (Shapiro et al., 1998; Zecevic et al., 1998). On ne sait pas encore si l'action de la MAPK est directe ou non. Horne MM *et al* ont démontré que p90^{RSK} n'est pas l'effecteur des MAPK dans ce rôle, indiquant que la voie MAPK peut bifurquer avant p90^{RSK} et phosphoryler des partenaires importants dans la mise en place et la stabilisation du fuseau mitotique (Horne and Guadagno, 2003).

Figure 24: formation des fuseaux de méiose I



42- Cas particulier de l'ovocyte de souris: formation, migration du fuseau de méiose I et division asymétrique

a) Formation du fuseau de méiose I chez la souris

Les ovocytes de souris sont dépourvus de centrioles. Les pôles des fuseaux sont constitués de centres organisateurs de microtubules multiples, qui vont se rassembler à GVBD en asters. Après GVBD, les microtubules sont nucléés autour de l'ensemble des chromosomes et forment une masse plus ou moins compacte. Le fuseau bipolaire se met en place à partir de l'interaction d'asters de microtubules et de la chromatine (figure 24). Les pôles des fuseaux sont aplatis et larges, conférant une morphologie dite « en tonneau » au fuseau (Brunet et al., 1998) (figure 24). Ce fuseau méiotique est dépourvu de microtubules astraux reliant généralement les fuseaux au cortex de la cellule. Le fuseau se forme au cours de la pro-métaphase en l'absence de fibres kinétochoriennes, par interactions latérales entre les microtubules et les kinétochores et par des interactions directes entre les microtubules et la chromatine. La pro-métaphase I est très longue chez la souris (GVBD + 7h) et les fibres kinétochoriennes se mettent en place très tardivement environ une heure avant expulsion du globule polaire en début de métaphase (soit GVBD + 7h, Brunet et al., 1999) (figure 24).

b) Migration du fuseau

La vésicule germinative est centrale mais légèrement excentrée dans les ovocytes. Le fuseau de métaphase I se forme initialement dans la zone de la vésicule germinative après sa rupture et se met donc naturellement en place de manière légèrement excentrée dans l'ovocyte. A GVBD+6/7h, environ 1h avant l'expulsion du globule polaire, le fuseau de division va migrer selon son grand axe vers le cortex, selon le chemin le plus court, amplifiant la légère asymétrie de départ. Il n'existe pas de site prédéfini dans le cortex attirant le fuseau lors de sa migration (Verlhac et al., 2000a). Cette migration au cortex est indépendante des microtubules, mais dépendante de l'actine. En effet si l'on dépolymérise les microtubules avant la migration du fuseau de division (avec du nocodazole), le fuseau est dépolymérisé, mais les chromosomes migrent en masse au cortex de l'ovocyte. Si l'on dépolymérise le réseau d'actine (avec de la Cytochalasine D), le fuseau et les chromosomes sont incapables de migrer au cortex (Longo and Chen, 1985; Van Blerkom and Bell, 1986). Le fuseau ne subit pas de rotation avant l'expulsion du globule polaire dans 2/3 des cas; le plus souvent le fuseau n'est donc pas parallèle à la surface du cortex mais perpendiculaire. Cela constitue une

Figure 25: rôles des MAPK au cours de la maturation méiotique chez la souris

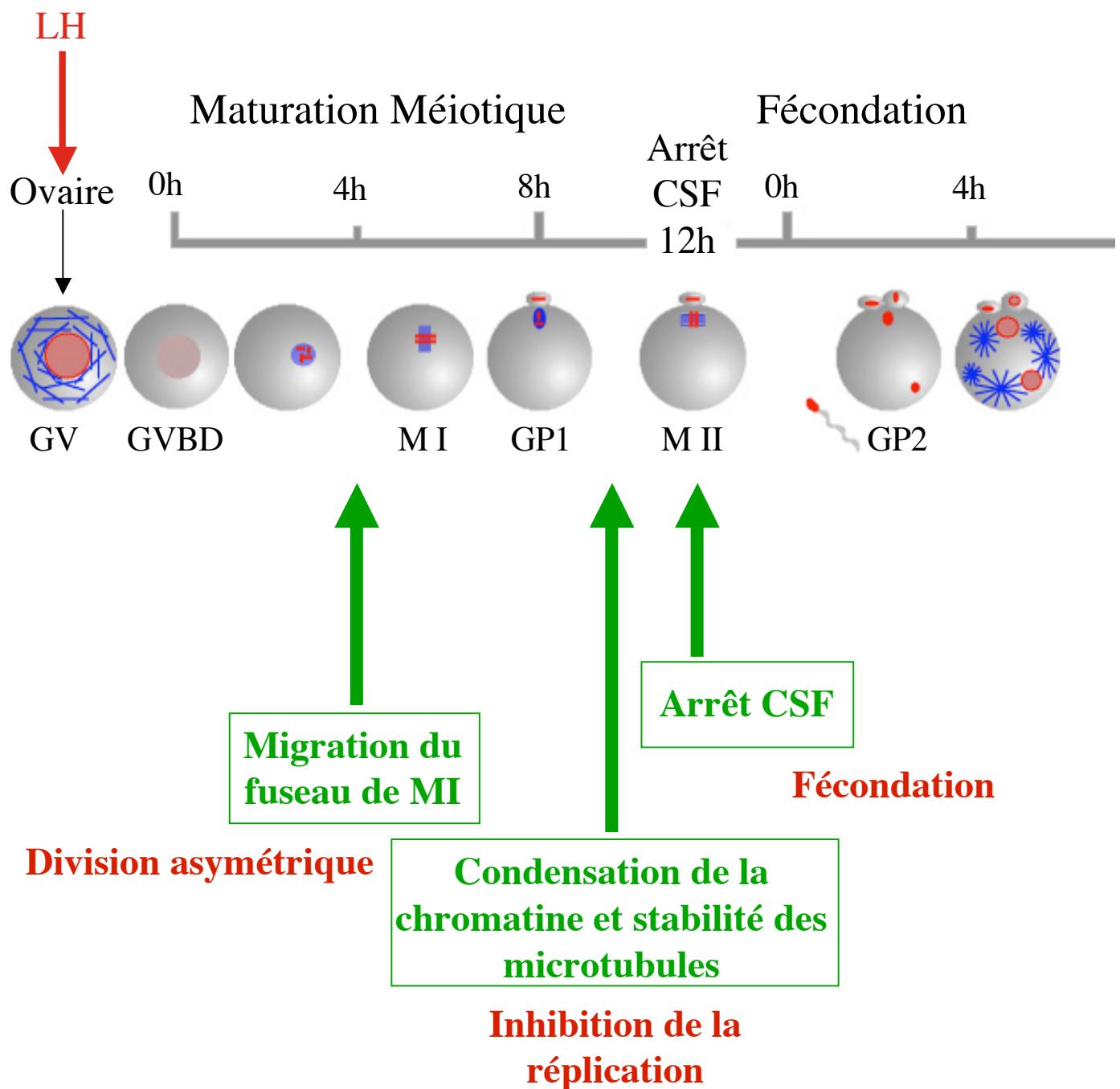
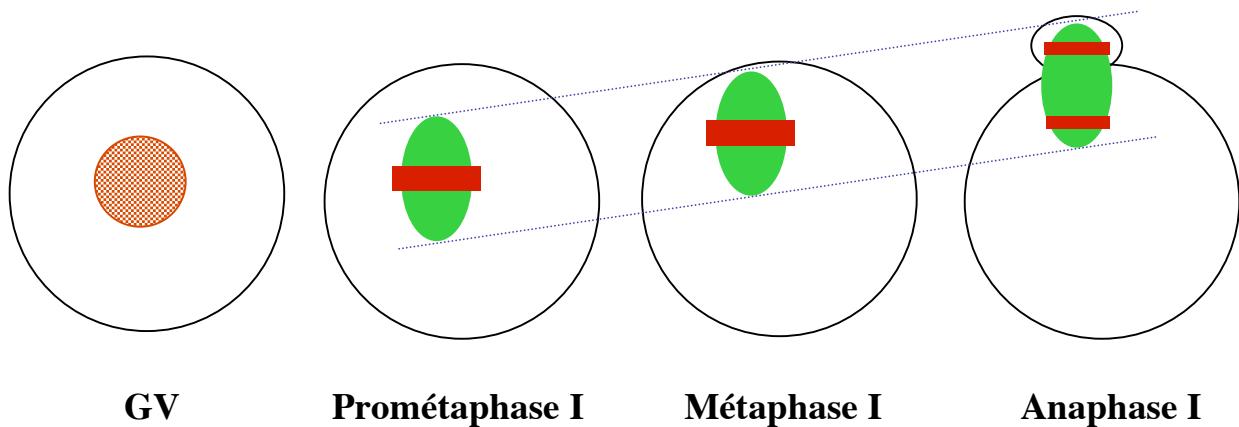
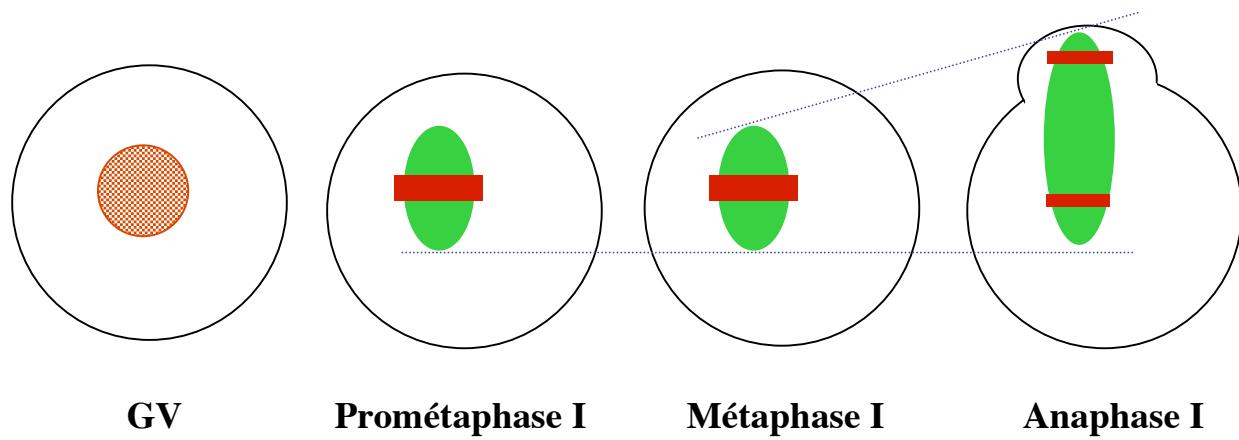


Figure 26: rôle de la voie Mos/.../MAPK dans la migration du fuseau de MI

ovocytes de souris Mos +/−



ovocytes de souris Mos -/-



différence importante par rapport à la position du fuseau de métaphase II qui est parallèle au cortex (Verlhac et al., 2000a). La migration du fuseau au cortex en métaphase I permet à l'ovocyte d'effectuer une division asymétrique, donnant lieu à une grosse cellule contenant la majeure partie du cytoplasme et des réserves, l'ovocyte et une petite cellule qui dégénérera, le globule polaire.

i. Migration du fuseau et voie Mos/.../MAPK

L'étude de la maturation méiotique des ovocytes issus des souris invalidées pour le gène c-mos et qui n'activent pas la MAPK en méiose a permis de comprendre les rôles de la voie Mos/.../MAPK. La voie est impliquée dans trois grands phénomènes (figure 25): la migration du fuseau de métaphase I au cortex de l'ovocyte en première phase M de méiose (Verlhac et al., 2000a), le maintien de l'état pseudo-métaphasique des microtubules et des chromosomes en phase G permettant peut-être d'éviter la réPLICATION de l'ADN (Furuno et al., 1994; Verlhac et al., 1993; Verlhac et al., 1996) et l'arrêt en métaphase II de seconde phase M (Colledge et al., 1994; Haccard et al., 1993; Hashimoto et al., 1994). Pour revue sur le rôle des MAPK au cours de la maturation méiotique, voir (Fan and Sun, 2004). Je reviendrai sur les deux derniers rôles ultérieurement.

La migration du fuseau de métaphase I est donc dépendante de la voie Mos/.../MAPK. Dans les ovocytes issus de souris Mos-/-, le fuseau de métaphase I ne migre pas au cortex et les ovocytes expulsent de très gros globules polaires, rendant la division plus symétrique (Choi et al., 1996; Verlhac et al., 2000a). A l'anaphase, le fuseau s'allonge, un seul des deux pôles se rapprochant du cortex (figure 26). Cette élongation du fuseau au cours de l'anaphase permet de restaurer un peu d'asymétrie à cette première division dans les souris Mos-/. La migration étant dépendante du réseau d'actine, cela suggère qu'il existe des cibles de la voie Mos/.../MAPK pouvant contrôler la migration du fuseau de métaphase I via les microfilaments d'actine.

Parallèlement à la migration du fuseau au cortex se différentie un domaine cortical juste au dessus du fuseau de méiose I. Ce domaine est dépourvu de microvillosités et est enrichi en microfilaments d'actine; il déterminera la position de l'anneau de clivage, le premier globule polaire étant formé à partir de cette région. La différentiation de ce domaine est induite par les chromosomes. En effet si l'on disperse artificiellement les chromosomes méiotiques, chaque lot de chromosome va induire une différenciation corticale de ce type dans la région du cortex la plus proche (Maro et al., 1986; Sawin, 2002). Une région dépourvue de microvillosités et

enrichie en microfilaments d'actine est présente au cortex au-dessus du fuseau de méiose II et détermine également l'anneau de clivage.

Un article récent a mis en évidence le rôle de la formine 2, une protéine se liant aux microfilaments d'actine, dans la migration du fuseau de méiose I (Leader et al., 2002).

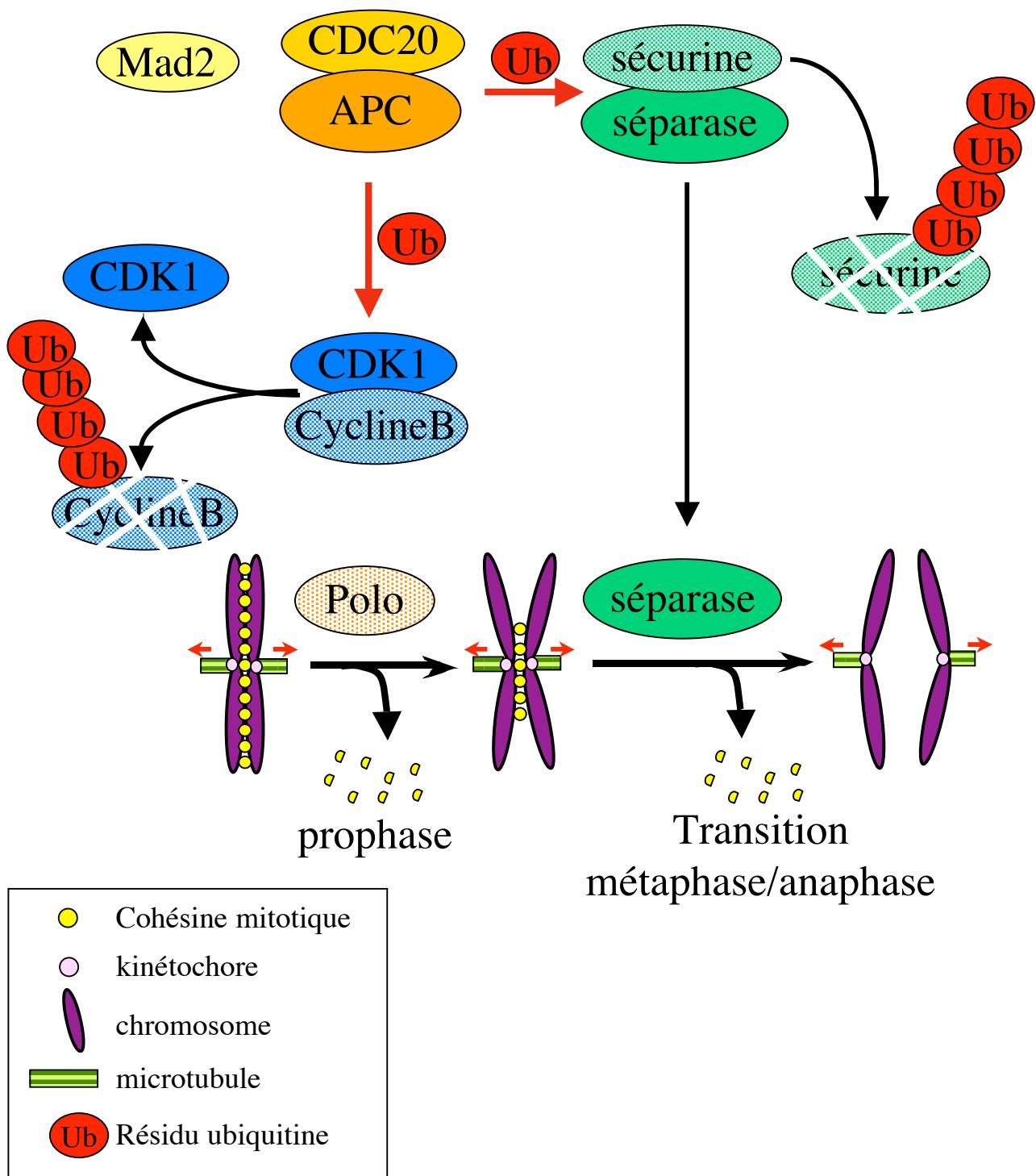
ii. Migration du fuseau et Formine

Les Formines composent une famille de protéines définie par la présence d'un domaine formine d'homologie de type FH2. Ce domaine est nécessaire et suffisant pour nucléer *in vitro* des filaments d'actine. Les formines nucléent des filaments d'actine non branchés, induisant des réorganisations du cytosquelettes nécessaires à divers processus cellulaires tels que la formation des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales, la formation des fillopodes, la migration des cellules, la formation de l'anneau de clivage (Lew, 2002). La formine 2, une protéine se liant aux microfilaments d'actine, est requise pour le positionnement acentrique du fuseau méiotique en méiose I (Leader et al., 2002). Dans les ovocytes issus de souris invalidées pour le gène codant la Formine 2, le fuseau de méiose I ne migre pas au cortex et les globules polaires ne sont pas expulsés. La nucléation de filaments d'actine allant du cortex aux chromosomes via la Formine 2 pourrait donc permettre l'interaction avec des protéines se liant à l'actine associées aux chromosomes (protéines encore à identifier) et assurer la migration du fuseau de méiose I.

Récemment, un article a fait le lien entre Formine et MAPK chez la levure. Au cours de la conjugaison chez *S.cerevisiae*, la cellule réoriente sa croissance vers la concentration la plus forte en phéromones. La formine Bni1p est requise pour cette croissance polarisée en facilitant l'assemblage de câbles d'actine corticaux. Fus3p, une MAPK activée par les phéromones, est essentielle à la cascade de signalisation induite par les phéromones. Les auteurs ont montré que Fus3p phosphoryle Bni1p. Fus3p serait recrutée au cortex où elle activerait Bni1p, qui alors serait capable d'assembler les câbles d'actine et de polariser la cellule (Matheos et al., 2004).

Même si la MAPK est localisée aux chromosomes et aux pôles du fuseau dans les ovocytes de souris (et non au cortex comme pour Fus3p chez la levure), on peut imaginer que les MAPK seraient responsables de l'activation et/ou de la localisation de la formine 2 au cortex, lui permettant d'assembler des câbles d'actine capables de faire migrer le fuseau de méiose I au cortex (Verlhac et al., 1993).

Figure 27: transition métaphase/anaphase en mitose



5. Sortie de première phase M

51. Le point de contrôle du fuseau en mitose

a) Point de contrôle du fuseau et dégradation.

Le point de contrôle du fuseau permet une répartition équivalente du matériel génétique au cours de la mitose. Pour revue voir (Castro et al., 2003). Il prévient le déclenchement de l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas attachés au fuseau mitotique et alignés sur la plaque équatoriale. Sa fonction est d'empêcher l'APC/C (je noterai APC par la suite pour plus de commodité), une ubiquitine ligase, d'ubiquitinier certaines protéines dont la dégradation est nécessaire au déclenchement de l'anaphase (figure 27). L'ubiquitination par l'APC dirige les protéines ainsi étiquetées au 26S protéasome qui les dégrade. Durant la phase d'attachement et d'alignement des chromosomes, le MPF reste actif et les chromatides sœurs restent liées entre elles. Le point de contrôle du fuseau coordonne donc la phase de capture des chromosomes, l'inactivation du MPF et la séparation physique des chromatides sœurs. Chez les eucaryotes supérieurs, la perte de ce point de contrôle peut conduire à une mauvaise répartition des chromosomes et contribuer ainsi à l'instabilité génomique observée dans de nombreuses cellules tumorales (Cahill et al., 1998; Lengauer et al., 1998).

b) Les cibles du point de contrôle.

i. La Cycline B

A la transition métaphase/anaphase, la Cycline B est dégradée, induisant l'inactivation de CDK1 et la chute de l'activité MPF. L'analyse en temps réel de la dégradation de la Cycline B couplée à la GFP dans des cellules humaines a montré que sa dégradation débute au moment où le dernier chromosome est aligné sur la plaque métaphasique (Clute and Pines, 1999). La dégradation de la Cycline B nécessite son étiquetage par des molécules d'ubiquitine (Glotzer et al., 1991), assuré par l'E3 ubiquitine ligase APC, en association avec son activateur CDC20 (figure 27) (Lorca et al., 1998; Peters, 1999). La Cycline B est reconnue par le complexe APC/CDC20 grâce à la présence, dans sa séquence, d'un motif oligopeptidique appelé boîte de destruction (*D-Box*) (Glotzer et al., 1991). Ce motif D-box est suffisant pour cibler les protéines à l'APC. La Cycline B ainsi ubiquitinée est reconnue et dégradée par le protéasome 26S (figure 27).

ii. La sécurine

La sécurine est une autre cible de l'APC (Zou et al., 1999) (figure 27). Cette protéine existe chez *S.pombe* (Pds1), chez *S.cerevisiae* (Cut2), chez la drosophile (PIM) et chez les vertébrés (PTTG). Ces protéines n'ont pratiquement pas d'homologies de séquence mais ont des rôles très conservés. La sécurine joue un rôle essentiel dans la cohésion des chromatides sœurs. En effet, l'expression d'une sécurine non dégradable ou la surexpression de la sécurine bloque la séparation des chromatides sœurs (Hagting et al., 2002; Nasmyth, 2001). La délétion de la sécurine chez *S.cerevisiae* provoque la séparation des chromatides sœurs en absence d'APC actif (Ciosk et al., 1998). Des cellules humaines invalidées pour la sécurine ont des défauts d'anaphase et perdent des chromosomes au cours de la division (Jallepalli et al., 2001).

iii. La séparase, cible de la sécurine

La sécurine est liée jusqu'à la métaphase à une cystéine protéase appartenant à la famille des caspases, la séparase. Cette interaction inhibe la séparase. A la transition métaphase/anaphase, la sécurine est reconnue par l'APC et ubiquitinée, la ciblant pour être dégradée par le protéasome 26S (figure 27). La séparase libérée est active et clive la sous-unité Scc1 des complexes cohésines qui lient les chromatides sœurs entre elles, événement essentiel à leur séparation (Hirano, 2000; Uhlmann et al., 1999).

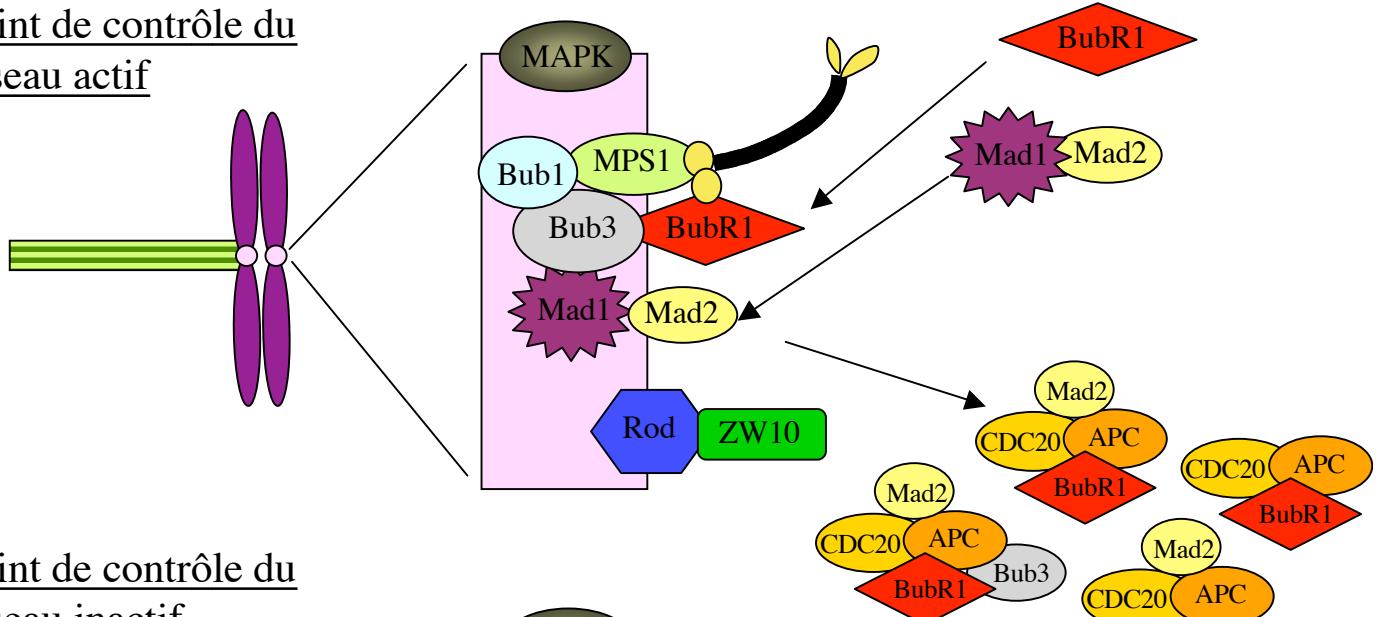
Les sécurines de *S.pombe* ou de Drosophile sont requises pour la séparation des chromatides sœurs en mitose (Funabiki et al., 1996; Jager et al., 2001; Stratmann and Lehner, 1996), alors que les sécurines de *S.cerevisiae* et des vertébrés ne sont pas essentielles ; l'invalidation du gène codant la sécurine est viable par exemple chez la souris (Jallepalli et al., 2001; Mei et al., 2001; Wang et al., 2001; Wang et al., 2003; Yamamoto et al., 1996).

Cela peut s'expliquer par la présence de sécurines redondantes. Il existe en effet deux autres gènes codant des PTTG dans le génome humain (Chen et al., 2000). Une seconde explication vient du fait que la séparase est aussi régulée négativement par CDK1 (Stemmann et al., 2001). Cette phosphorylation inhibe l'activité de la séparase en absence de sécurine, ce qui explique pourquoi des cellules humaines dépourvues de sécurine sont viables et capables de réaliser l'anaphase.

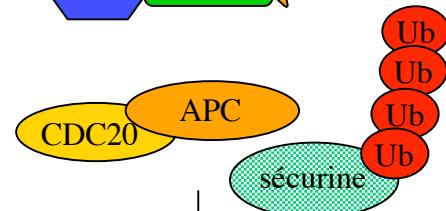
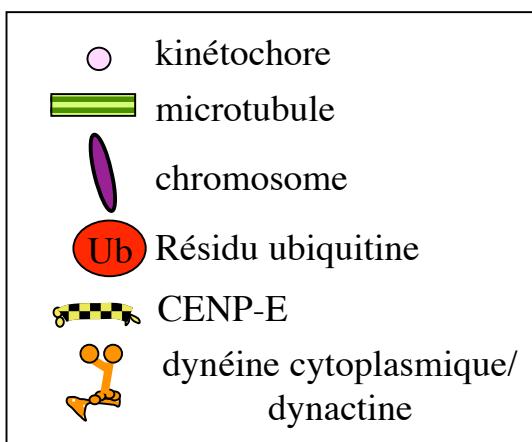
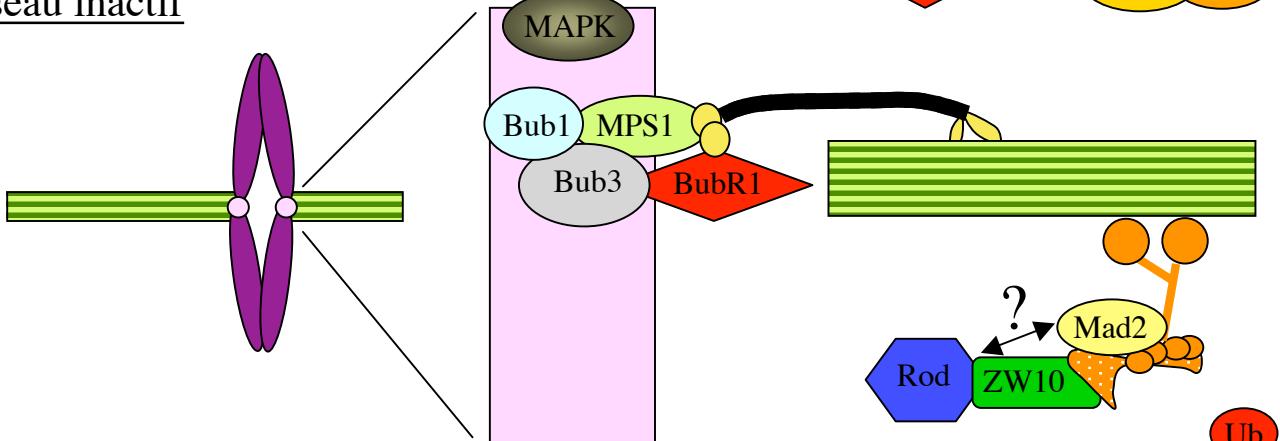
Chez les vertébrés, la dissociation des cohésines mitotiques se fait en deux étapes (Waizenegger et al., 2000). En pro-métaphase, la majorité des cohésines (95%) se dissocie des bras des chromatides sœurs selon un mécanisme qui dépend de leur phosphorylation par la kinase polo et qui est indépendant de l'activation de l'APC (Alexandru et al., 2001; Hauf et al., 2001; Sumara et al., 2002). Les cohésines localisées au niveau des centromères sont donc

Figure 28: senseurs du point de contrôle du fuseau aux kinétochores en mitose

Point de contrôle du fuseau actif



Point de contrôle du fuseau inactif



Anaphase

les seules à assurer la cohésion des chromatides sœurs en métaphase. En métaphase, la dégradation de la sécurine permet l'activation de la séparase et le clivage des cohésines centromériques. Cette perte de cohésion en deux temps pourrait faciliter la condensation des chromosomes (figure 27).

Une autre différence entre la levure et les vertébrés est que l'activation de la séparase s'accompagne de son auto-clivage (Stemmann et al., 2001; Waizenegger et al., 2000). Le rôle de cet auto-clivage serait de vérifier que la séparase est totalement inhibée après avoir réalisé sa fonction.

c) les composants du point de contrôle.

Les gènes impliqués dans la voie de signalisation de ce point de contrôle ont été tout d'abord identifiés chez la levure *S.cerevisiae*. Des mutants de levure pour ces gènes ne s'arrêtent pas en mitose en présence d'agents dépolymérisants des microtubules. Il s'agit des gènes mad1, mad2, mad3 (Li and Murray, 1991) et des gènes bub1, bub2, bub3 (figure 28) (Hoyt et al., 1991). La protéine kinase Mps1, nécessaire pour la duplication du spindle pole body, équivalent fonctionnel du centrosome chez la levure, a par la suite été identifiée comme un composant essentiel du point de contrôle mitotique (figure 28) (Weiss and Winey, 1996). Mps1 excepté, ces gènes ne sont pas essentiels chez la levure, leur délétion n'empêchant pas la multiplication des cellules. L'identification d'homologues fonctionnels de ces gènes suggère que ce point de contrôle est conservé chez les eucaryotes supérieurs, bien que d'autres protéines essentielles à son fonctionnement aient été recensées, telles que la protéine kinase BubR1 (hybride entre la protéine kinase Bub1 et Mad3) (Taylor et al., 1998), la kinésine CENP-E (Abrieu et al., 2000b), Zw10 et Rod (Basto et al., 2000; Chan et al., 2000), ainsi qu'une forme de MAP kinase (Minshull et al., 1994) (figure 28).

d) défauts détectés.

Le point de contrôle mitotique détecte des défauts affectant le fuseau, induits par des modifications de l'état des kinétochores. Chez *S. cerevisiae*, une perturbation de l'assemblage des kinétochores ou de leur attachement aux microtubules, provoque un arrêt mitotique. Cet arrêt ne se produit que si les gènes mad et bub sont fonctionnels (Wang and Burke, 1995). D'un autre côté, les levures dépourvues de la protéine Ndc10, sans laquelle les kinétochores ne peuvent se former, ne s'arrêtent pas en mitose quand elles sont traitées par le nocodazole,

indiquant que le signal inhibiteur doit être relayé par un kinétochore fonctionnel (Tavormina and Burke, 1998). Dans les cellules Ptk1, la destruction au laser du kinétochore libre du dernier chromosome non attaché rend impossible son alignement; pourtant, la cellule déclenche l'anaphase, montrant là encore que le kinétochore doit être fonctionnel pour relayer le signal inhibiteur (Rieder et al., 1995). L'ensemble de ces données suggère que les kinétochères libres, ou présentant un défaut de liaison aux microtubules, émettent un signal qui empêche la transition métaphase/anaphase et que le kinétochore doit être fonctionnel pour émettre ce signal.

La localisation cellulaire des protéines du point de contrôle du fuseau renforce cette hypothèse (Dobie et al., 1999). Les protéines Mad et Bub se localisent préférentiellement sur les kinétochères libres et sur les kinétochères dirigeant le mouvement des chromosomes vers la plaque équatoriale pendant la phase d'alignement. Elles sont très peu présentes, voire absentes pour les protéines Mad, sur les kinétochères des chromosomes alignés (Hoffman et al., 2001). Des expériences de micromanipulations réalisées dans des spermatocytes de la mante religieuse (Li and Nicklas, 1997) et l'analyse de mutants de *S.cerevisiae* qui entrent en mitose sans avoir répliqué leur génome et ne pouvant pas en sortir ont montré que le point de contrôle est sensible à la tension au niveau des kinétochères. Cet arrêt dépend bien de Mad2 (Biggins and Murray, 2001; Stern and Murray, 2001). Chez les vertébrés, un blocage en métaphase peut également être obtenu par des agents qui altèrent la dynamique du fuseau, sans le détruire. La faible distance séparant alors les kinétochères frères démontre une absence de tension entre eux et entraîne un blocage en métaphase, même si les chromosomes sont alignés.

Le point de contrôle du fuseau dispose donc de deux types de senseurs, l'un sensible à l'état d'attachement des kinétochères, l'autre à la tension. Cette double sensibilité du point de contrôle est un caractère conservé à travers les espèces. Chez la drosophile, on peut distinguer les mutants Bub1, dont les cellules entrent en anaphase avant que tous les kinétochères ne soient correctement attachés (Waters et al., 1998) et les mutants Rod et Zw10, où l'anaphase commence après l'attachement de tous les kinétochères, mais avant l'alignement de tous les chromosomes (Basto et al., 2000).

e) Interactions des protéines du point de contrôle.

Les protéines du point de contrôle mitotique interagissent entre elles, laissant supposer l'existence de complexes régulateurs au niveau des kinétochères.

Mad1 est l'une des protéines en amont de la cascade de signalisation. Mad1 interagit avec Mad2 et l'interaction du complexe Mad1-Mad2 avec les kinétochères dépend de Mad1. Cela permet de recruter Mad2 au kinétochore non attaché (figure 28). Ce recrutement facilite la liaison de Mad2 à CDC20, provoquant l'inhibition de l'APC (figure 28) (Chen et al., 1996; Luo et al., 2002; Sironi et al., 2001).

Bub3 interagit avec Bub1 et BubR1, cette interaction étant essentielle à leur localisation sur les kinétochères (figure 28) (Basu et al., 1998; Taylor et al., 1998). BubR1 est alors capable de s'associer à CDC20 et inhibe l'APC (figure 28) (Chan et al., 1999; Fang, 2002; Wu et al., 2000).

BubR1, Bub3, CDC20 et Mad2 sont retrouvés dans un complexe (MCC mitotic checkpoint complex), capable d'inhiber l'APC plus efficacement que Mad2 seule (Musacchio and Hardwick, 2002; Sudakin et al., 2001). Ce complexe existe quelle que soit la phase du cycle cellulaire, à des moments où les kinétochères ne sont pas encore matures (Sudakin et al., 2001). Seule une forme mitotique de l'APC semble sensible à leur activité inhibitrice.

Dans les extraits d'œufs de xénope, la localisation du complexe Mad1-Mad2 sur les kinétochères dépend du complexe Bub3-Bub1, mais pas de l'activité kinase de Bub1. Elle dépend également de CENP-E et de l'activité de la protéine kinase Mps1 (Abrieu et al., 2001) (figure 28). CENP-E interagit directement avec BubR1 et stimule son activité kinasique (Jablonski et al., 1998; Weaver et al., 2003; Yao et al., 2000). CENP-E est nécessaire pour recruter Mad1 et Mad2 au kinétochore et est donc nécessaire à l'activation du point de contrôle du fuseau. CENP-E est également nécessaire au maintien du point de contrôle du fuseau, via la localisation de Mad2 (Abrieu et al., 2000a). Mad2 subit des phosphorylations au cours de la mitose. Seule Mad2 non phosphorylée est capable d'interagir avec Mad1 ou l'APC *in vivo*. La phosphorylation de Mad2 régulerait donc son activité dans le point de contrôle du fuseau (Wassmann et al., 2003a). La perte de fonction de Mad2 chez la souris est létale très tôt au cours du développement embryonnaire (Dobles et al., 2000).

La dynéine cytoplasmique est responsable de la délocalisation de Mad2 du kinétochore quand tous les kinétochères sont correctement alignés sous tension (Howell et al., 2000) (figure 28). Quand le point de contrôle est activé par le nocodazole, Mad2 se localise uniquement sur les kinétochères, ce qui suggère que sa présence sur les pôles dépend exclusivement de son transport sur les microtubules.

En conclusion, Mad2 et BubR1 pourraient agir en synergie pour inhiber l'APC (Hoyt, 2001;

Sudakin et al., 2001), ou bien Mad2 et BubR1 pourraient reconnaître des défauts différents, soit d’attachement soit de tension (Skoufias et al., 2001).

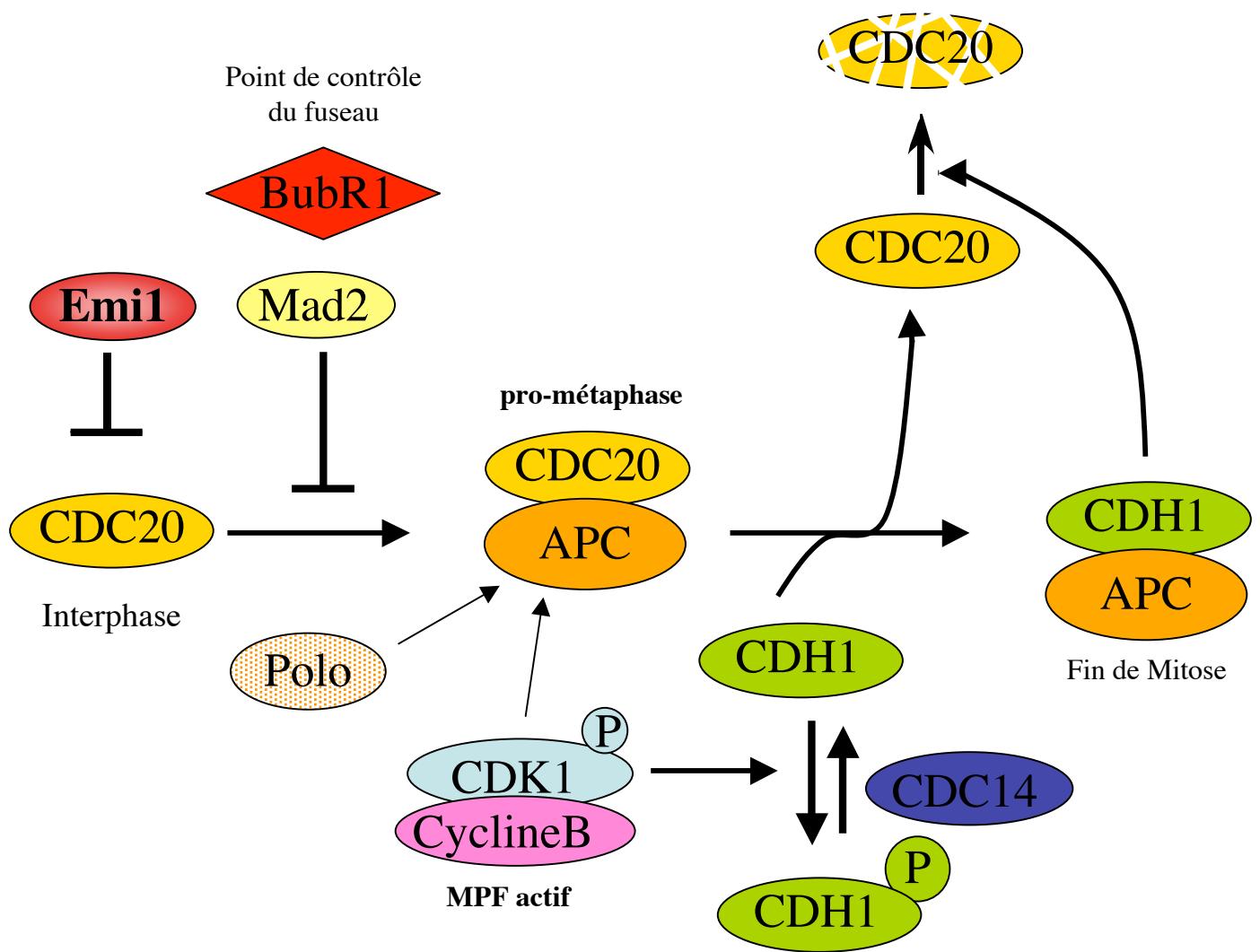
Les protéines Rod et Zw10 sont essentielles au fonctionnement du mécanisme de surveillance chez les eucaryotes supérieurs. Elles sont nécessaires au recrutement de la dynéine au niveau des kinétochores (figure 28). Lorsque deux fuseaux sont présents dans une même cellule, le premier fuseau à atteindre la métaphase entre en anaphase. Il provoque alors une anaphase prématuée du second fuseau, même si celui-ci présente encore plusieurs chromosomes mono-orientés, c'est-à-dire attachés à un seul pôle. Ces observations laissent penser que la transmission du signal inhibiteur produit par le kinétochore libre d'un chromosome mono-orienté est liée à sa connexion au fuseau et qu'un signal positif dominant est à l'origine de la transition métaphase/anaphase (Rieder et al., 1997).

f) L'APC et ses régulations

Les réactions d'ubiquitination nécessitent trois types d'enzymes appelées E1, E2 et E3. Le complexe APC est un édifice moléculaire composé d'au moins 11 sous-unités. Il possède une activité E3 ubiquitine ligase et collabore avec l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) et l'enzyme de conjugaison (E2) pour catalyser le transfert de molécules d'ubiquitine (Ub) sur des résidus lysine des substrats. La réitération de la réaction entraîne l'allongement de la chaîne d'ubiquitine. Un excès d'ubiquitine méthylée inhibe la protéolyse dépendante de l'APC et bloque la dégradation des Cyclines dans des extraits embryonnaires de palourde (Hershko et al., 1991). Les substrats de l'APC ont dans leur séquence une D-box (Glotzer et al., 1991) ou une KEN box (KENXXXR; Pfleger and Kirschner, 2000). Il existe aussi une A-box, requise pour la destruction de Aurora A par APC/CDH1 en sortie de mitose (Littlepage and Ruderman, 2002). L'APC est activé en pro-métaphase puis inactivé en fin de phase G1 par phosphorylation (King et al., 1995; Sudakin et al., 1995). L'APC peut s'associer à des protéines activatrices comme la protéine CDC20 (ou Fizzy chez la drosophile) et CDH1 (ou Fizzy related). Pour revue voir (Murray, 2004).

Lorsque la cellule entre en mitose, le MPF phosphoryle l'APC, ce qui augmente l'affinité de CDC20 pour l'APC, permettant ainsi la formation de nombreux complexes APC/CDC20 actifs, nécessaires à l'ubiquitination de la sécurine et de la Cycline B au cours de la mitose. Ces protéines ainsi étiquetées sont reconnues et rapidement dégradées en petits peptides par le protéasome 26S. En fin d'anaphase, l'APC se lie à CDH1, association qui perdure tout au

Figure 29: les régulations de l'APC



long de la phase G1 (figure 29) (Peters, 2002).

Les protéines CDH1 et CDC20 seraient spécifiques d'une catégorie de substrat (en fonction de la présence d'une D-box ou d'une KEN box) et donc d'une phase donnée (Schwab et al., 1997; Visintin et al., 1997). Des résultats récents en extraits d'oeufs de xénope montrent que les D-box se lient directement à l'APC de façon régulée par le cycle cellulaire. Cette interaction ne requiert pas CDC20 (Yamano et al., 2004). Ces nouveaux résultats vont à l'encontre du modèle actuel de reconnaissance du substrat grâce à CDC20 ou CDH1, mais restent préliminaires, ne cherchant pas à savoir le rôle de CDC20.

i. APC/CDC20.

Emi1 (Reimann et al., 2001) a été mise en évidence chez le xénope comme un inhibiteur de l'APC. Au cours de l'interphase, Emi1 pourrait inhiber l'APC en titrant CDC20 (figure 29). Emi1 est dégradée à l'entrée en mitose indépendamment de l'APC par le SCF, suggérant que cette dégradation est nécessaire à l'activation de l'APC en mitose (Reimann et al., 2001). Emi1 ne peut être dégradée tant qu'elle n'a pas été phosphorylée, peut-être par CDK1. L'APC ubiquitine alors ses substrats comme la Cycline A en pro-métaphase et la Cycline B à la transition métaphase/anaphase.

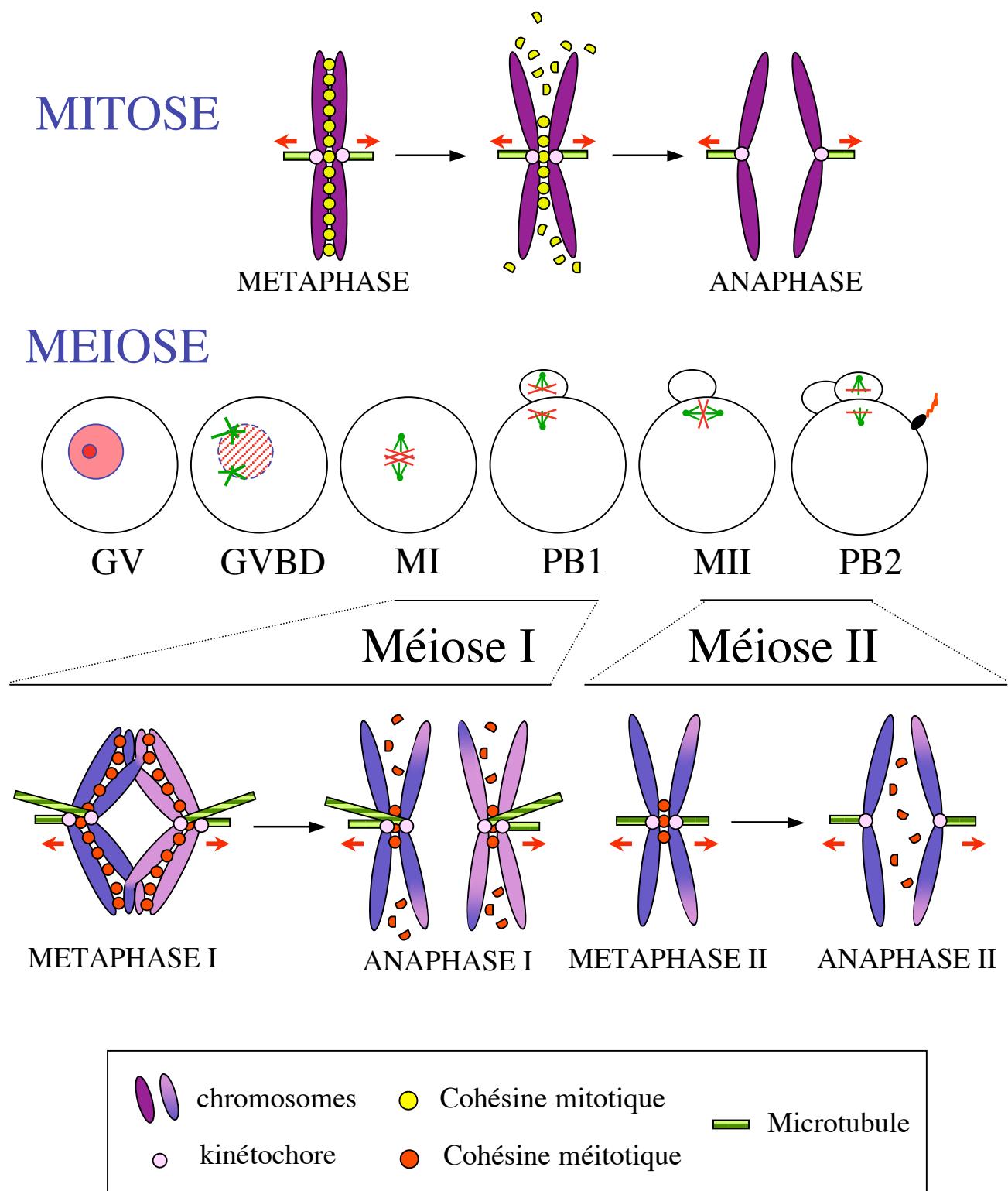
ii. APC/CDH1.

En fin de mitose, après dégradation de la Cycline B et de la sécurine, CDC20 est dégradée grâce à sa KEN box et remplacée par CDH1 jusqu'en fin de G1 (figure 29) (Kramer et al., 2000). Le niveau d'expression de CDH1 ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Fang et al., 1998). En interphase et en mitose jusqu'à l'anaphase, les complexes CDK/Cyclines A, B et E maintiendraient CDH1 dans un état phosphorylé, empêchant sa liaison à l'APC (figure 29) (Kramer et al., 2000; Zachariae et al., 1998). L'association de CDH1 avec l'APC en fin de mitose est déclenchée par la déphosphorylation de CDH1 effectuée par la phosphatase CDC14 (figure 29) (Kramer et al., 2000). L'APC lié à CDH1 catalyse l'ubiquitination de CDC20 et provoque sa dégradation (figure 29) (Pfleger and Kirschner, 2000). L'inactivation de CDH1 intervient en fin de phase G1 à l'apparition des premiers complexes CDK/Cyclines.

iii. phosphorylations et déphosphorylations de l'APC.

Un autre niveau de régulation concerne les phosphorylations et déphosphorylations de l'APC, qui sont capables de réguler son interaction avec ses partenaires activateurs. Une des sous-unités de l'APC, CDC27, est phosphorylée au cours de la méiose chez le xénope, l'homme, la

Figure 30: orientation des chromatides sœurs en mitose et méiose



palourde et la levure (Golan et al., 2002; Kotani et al., 1999; Kotani et al., 1998; Patra and Dunphy, 1998; Peters et al., 1996; Rudner and Murray, 2000; Yamada et al., 1997).

Polo et le MPF sont capables d'activer l'APC en phosphorylant les sous-unités CDC27 ou CDC16 (figure 29) (Brassac et al., 2000; Descombes and Nigg, 1998; Hershko et al., 1994; King et al., 1995; Kotani et al., 1998; Lahav-Baratz et al., 1995; Patra and Dunphy, 1998; Zachariae and Nasmyth, 1999). La mutation de sites consensus de phosphorylation de trois sous-unités de l'APC, CDC27, CDC16 ou CDC23 par CDK1 abolit la phosphorylation de l'APC, réduit sa liaison à CDC20 et retarde la sortie de mitose chez *S.cerevisiae* (Rudner and Murray, 2000).

L'APC est donc activé par phosphorylation par CDK1 et Polo, ainsi que par sa liaison à CDC20 et CDH1, permettant d'exercer son rôle seulement à des phases clés du cycle cellulaire.

52. Alignement et séparation des chromosomes homologues en méiose I

En méiose I, les chromosomes « maternels » et « paternels » échangent leur matériel génétique au niveau des chiasmas, qui établissent un lien physique entre eux. Les deux kinétochores des deux chromatides sœurs formant un chromosome sont attachés aux microtubules selon la même polarité (mono-orientation) (figure 30). Ceci constitue une différence importante par rapport à la mitose où les deux kinétochores des deux chromatides sœurs formant un chromosome sont attachés aux microtubules selon une polarité inverse (bi-orientation). En méiose I, le chromosome paternel et le chromosome maternel seront ségrégés, alors qu'en mitose ce sont les chromatides sœurs formant un chromosome qui seront séparées. Pendant la métaphase de première division méiotique, la cohésion des chromatides sœurs est assurée comme en mitose par un lien physique entre les bras et le centromère des chromatides sœurs (figure 30). De plus, les chromosomes homologues sont liés au niveau des chiasmas par une liaison entre une chromatide « non-sœur » de chaque chromosome. Les chiasmas sont résolus par la dissolution des cohésines qui relient ces chromatides « non sœurs » à la transition métaphase/anaphase, permettant la séparation physique des chromosomes homologues. Les cohésines localisées sur les bras des chromatides sœurs sont aussi dégradées. Seules les cohésines localisées au centromère des chromatides sœurs sont protégées de la dégradation, leur permettant de rester liées jusqu'en métaphase II. A la transition métaphase II/anaphase II, les cohésines centromériques seront dégradées, permettant la séparation des chromatides sœurs comme en mitose (figure 30).

Certaines cohésines présentes en méiose sont différentes de celles présentes en mitose. Rec 8 par exemple remplace Scc1. Chez la levure, la dégradation de Rec 8 fait intervenir la séparase comme en mitose. L'APC actif et l'activité séparase sont requis pour effectuer la méiose I chez *C.elegans* et chez les levures *S.pombe* et *S.cerevisiae*. Chez la souris, j'ai montré que l'activité séparase est requise pour effectuer la transition méiose I/méiose II. Chez le xénope au contraire, l'APC actif et l'activité séparase ne sont pas requis pour effectuer la méiose I. Je reviendrai sur ce point plus loin.

Chez la Drosophile, mei-S332 assure la protection des cohésines centromériques en méiose I et se localise dans les régions péri-centromériques (Kerrebrock et al., 1995), mais le mécanisme potentiel d'action de cette protéine n'est pas connu. Récemment, de nouvelles protéines capables de protéger les cohésines centromériques de la dégradation à la transition métaphase I/anaphase I ont été mises en évidence, analogues fonctionnels de mei-S332: les shugoshines (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). Kitajima TS et al ont montré que shugoshine 1 protégeait Rec 8 de la dégradation à la transition métaphase/anaphase en méiose I. Les levures invalidées pour ce gène ont des problèmes de ségrégation des chromosomes en anaphase II, Rec 8 étant dégradée totalement en méiose I. mei-S332 serait un homologue potentiel de shugoshine 1 et il existerait des homologues chez le nématode, les plantes, la souris, et l'homme.

53. Existence d'un point de contrôle du fuseau en méiose I?

En méiose I, les chromosomes homologues sont ségrégés, contrairement à la mitose où les chromatides sœurs sont séparées (figure 30). Des résultats contradictoires ont été publiés quant à l'existence d'un mécanisme de contrôle du fuseau de type mitotique, capable de réguler la séparation des chromosomes homologues en méiose I.

a) Cas du xénope

Deux groupes ont montré que l'inhibition de l'APC et l'absence de chute de l'activité MPF chez le xénope ne bloquent pas la séparation des chromosomes homologues ni la progression en anaphase I (Peter et al., 2001; Taieb et al., 2001).

L'immunodéplétion de CDC20, l'injection d'oligonucléotides antisens ciblant l'ARNm endogène de CDC20, l'immunodéplétion de CDC27 (une sous-unité de l'APC), la microinjection de Mad 2, la microinjection d'une forme non dégradable de la sécurine,

l'injection d'un peptide de la boîte de destruction (contenue dans les protéines cibles de l'APC), l'injection d'ubiquitine méthylée (inhibant l'allongement de la chaîne d'ubiquitine) ne bloquent pas les ovocytes de xénope en métaphase I, suggérant que l'APC et l'activité séparase ne sont pas requis pour effectuer la transition métaphase I/anaphase I. Les ovocytes ségrègent leurs chromosomes homologues sans dégradation de la sécurine et de la Cycline B et s'arrêtent en métaphase II comme les contrôles après expulsion du premier globule polaire. Par contre l'APC est nécessaire pour effectuer la transition métaphase II/anaphase II dans les ovocytes ainsi traités, suggérant que l'APC est fonctionnel et requis en méiose II.

b) Cas de la levure et du nématode

Chez les levures *S.pombe* et *S.cerevisiae* (Buonomo et al., 2000; Kitajima et al., 2003) et chez le nématode *C.elegans* (Davis et al., 2002; Furuta et al., 2000; Golden et al., 2000; Siomos et al., 2001), la séparation des chromosomes homologues au cours de la méiose I requiert l'activation de l'APC et l'activité séparase. Des mutants de l'APC (Davis et al., 2002; Furuta et al., 2000) et de la séparase (Siomos et al., 2001) chez le nématode s'arrêtent en métaphase I et des mutants de Rec8 (non clivable) et de la séparase chez les levures *S.pombe* et *S.cerevisiae* induisent un arrêt du cycle en métaphase I (Buonomo et al., 2000; Kitajima et al., 2003).

c) Cas de l'homme et de la souris

Chez la souris, l'existence d'un point de contrôle fonctionnel passant par l'inhibition de l'APC en méiose I est sujet à controverse. J'exposerai tout d'abord les arguments en faveur de l'existence d'un mécanisme de contrôle, par ordre chronologique.

Le premier argument en faveur de l'existence d'un point de contrôle du fuseau chez la souris est que CENP-E est localisée sur les kinétochores en pro-métaphase et en métaphase de méiose I et serait requise pour faire la transition métaphase I/anaphase I. En effet l'injection d'anticorps dirigés contre CENP-E bloque à 95% les ovocytes en métaphase I, suggérant l'existence d'un point de contrôle fonctionnel (Duesbery et al., 1997).

De plus, la surexpression de la Cycline B1 dans des ovocytes de souris induit un arrêt en métaphase I, suggérant que la dégradation de la Cycline B est requise pour la transition métaphase I/anaphase I et/ou que l'APC peut être saturé par un excès de substrat (annexe 1, Ledan et al., 2001).

D'autres observations chez la souris montrent que des altérations du fuseau empêchent la ségrégation des chromosomes en méiose I et l'inactivation du MPF. Bub1 se localise aux kinétochores et est phosphorylé (Bub1 est phosphorylé quand le point de contrôle est actif; Taylor and McKeon, 1997) jusqu'en anaphase des deux divisions méiotiques (Brunet et al., 2003). Cela suggère de manière indirecte l'existence d'un mécanisme de contrôle du fuseau actif en méiose I femelle chez la souris.

Récemment il a été montré que les ovocytes de souris répondent à des défauts transitoires du fuseau par un arrêt réversible en métaphase I, caractérisé par une forte activité MPF (Wassmann et al., 2003b). Cette étude a mis en évidence que Mad2 est présente au cours de la maturation méiotique et se localise aux kinétochores non attachés. La surexpression de Mad2 induit un arrêt en métaphase I et l'expression d'un dominant-négatif de Mad2 empêche l'ovocyte de répondre à des défauts du fuseau en métaphase I. Ces résultats renforcent fortement les preuves de l'existence d'un mécanisme de contrôle fonctionnel en méiose I femelle chez la souris.

J'ai montré que l'activité séparase est requise dans les ovocytes de souris pour effectuer la transition métaphaseI/anaphase I (je détaillerai ces résultats plus loin dans Article 1, Terret et al., 2003b).

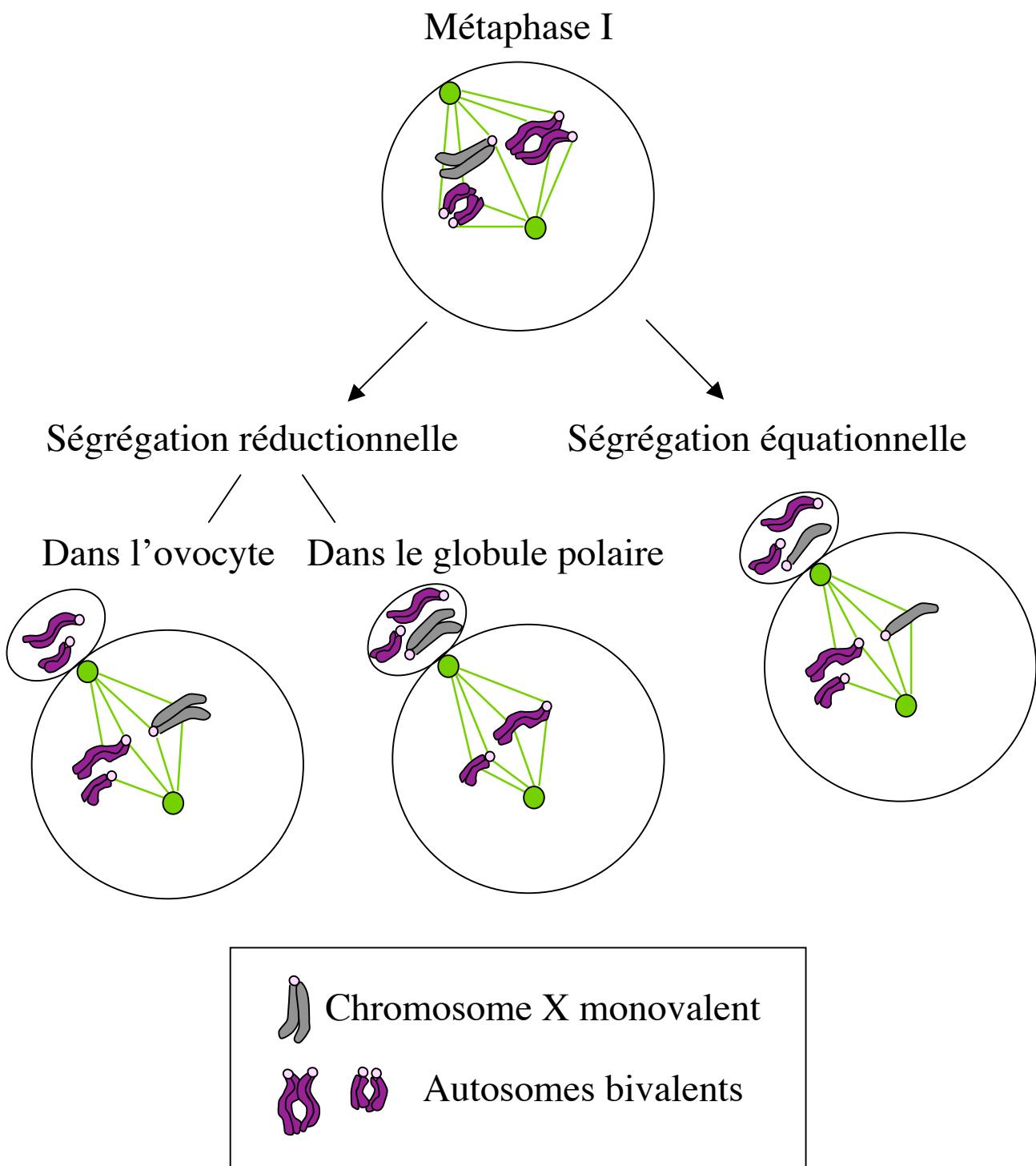
Enfin plus récemment il a été montré que la séparation des chromosomes homologues en méiose I dépendait de la protéolyse de la sécurine et de la Cycline B, protéolyse dépendante de la présence de leur D-box (Herbert et al., 2003).

De plus, lors de la méiose mâle chez la souris, les changements de localisation de Rec8 sont régulés de manière similaire aux changements de localisation de Rec8 lors de la méiose chez la levure. Ceci suggère que la dégradation de Rec8 lors de la méiose mâle chez la souris dépend de l'APC (Lee et al., 2003).

Toutes ces études suggèrent l'existence d'un mécanisme de contrôle de type mitotique (passant par l'inhibition de l'APC et de la dégradation de la sécurine et de la Cycline B) fonctionnel en méiose I chez la souris.

Néanmoins, chez l'homme, 20% des embryons conçus ont un contenu chromosomique aberrant résultant d'erreurs au cours de la méiose I femelle (Angell, 1994; Hunt and LeMaire-Adkins, 1998). Chez l'homme également, la plupart des trisomies sont la conséquence d'erreurs survenues en méiose I, corrélées avec l'augmentation de l'âge de la mère (Eichenlaub-Ritter et al., 1988). Ces arguments vont à l'encontre de l'existence d'un point de contrôle du fuseau fonctionnel au cours de la première division méiotique femelle chez les

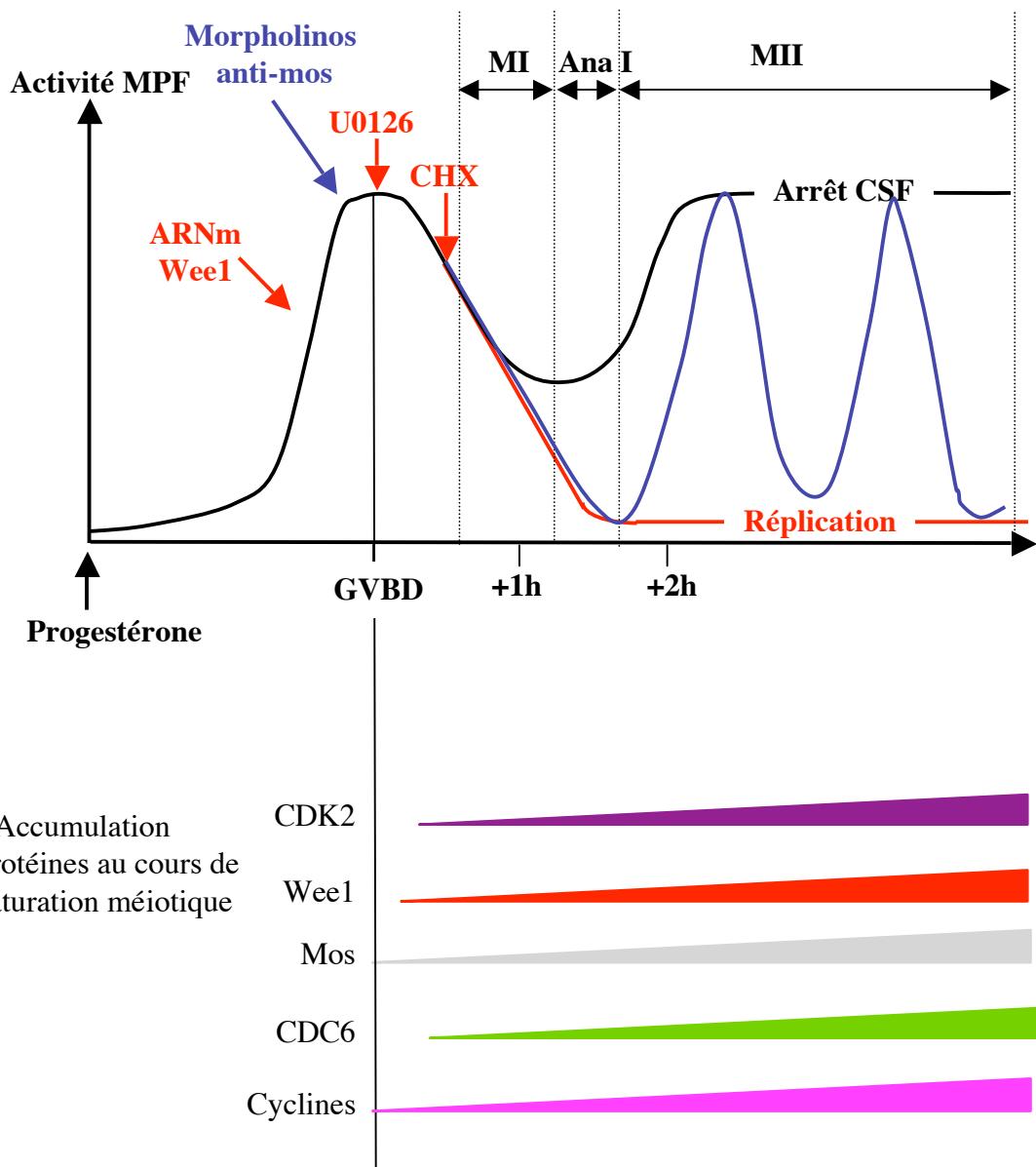
Figure 31: cas de l'homme et des souris XO



mammifères. Cependant, ce point de vue est plus nuancé, car il a été montré que chez les femmes âgées, la cohésion entre les chromosomes homologues est affaiblie par rapport aux femmes jeunes. En conséquence en méiose I, certains bivalents ne peuvent pas s'apparier par paire et seraient ségrégés comme des monovalents, comme lors d'une mitose. Cela ne déclencherait pas le point de contrôle du fuseau car ces monovalents seraient attachés par les kinétochores de leurs chromatides sœurs de manière opposée aux pôles du fuseau de division, leurrant le point de contrôle du fuseau (Wolstenholme and Angell, 2000) (figure 31). Le point de contrôle du fuseau fonctionnerait donc de la même manière en méiose I et en mitose, détectant des défauts similaires. Une étude comparative à partir d'ovocytes issus de femmes plus ou moins âgées a également montré que les quantités de transcrits Mad2 et Bub1 baissent en fonction de l'âge de la femme. Cela pourrait affaiblir le point de contrôle du fuseau chez les femmes âgées, en corrélation avec l'augmentation du nombre d'embryons aneuploïdes en fonction de l'âge (Steuerwald et al., 2001).

L'existence des souris XO n'ayant qu'un chromosome X et fertiles a longtemps été un argument en faveur de la non-fonctionnalité du point de contrôle du fuseau en méiose I. En méiose I, trois cas de figure existent pour la ségrégation du chromosome X monovalent. le chromosome X monovalent est ségrégué de manière équationnelle entre l'ovocyte et le globule polaire dans 30% des cas (une chromatide sœur allant dans l'ovocyte et une dans le globule polaire), de manière réductionnelle (le chromosome X allant uniquement dans l'ovocyte) dans 49% des cas et de manière réductionnelle encore (le X allant dans le globule polaire) dans 21% des cas, sans délai de la transition métaphase I/anaphase I (LeMaire-Adkins and Hunt, 2000). Cependant dans ces ovocytes, le chromosome X univalent s'aligne sur la plaque métaphasique en méiose I (LeMaire-Adkins et al., 1997), avec les kinétochores des chromatides sœurs attachés aux pôles opposés comme le suggère la division équationnelle observée dans 30% des ovocytes. Cet attachement pourrait leurrer le point de contrôle du fuseau et permettre le déclenchement de l'anaphase. A la transition métaphase I/anaphase I, les cohésines centromériques des chromatides sœurs sont protégées et ne sont pas dégradées. A l'anaphase I, ce maintien de la cohésion centromérique des chromatides sœurs du X monovalent va s'opposer aux forces de traction exercées par les fibres kinétochoriennes de part et d'autre. Dans la plupart des cas, ces forces de traction vont entraîner des cassures entre un des deux kinétochores des chromatides sœurs et la fibre kinétochorienne correspondante, résultant en la ségrégation réductionnelle du X dans 70% des cas (figure 31). Par contre cela n'explique pas pourquoi le chromosome X est préférentiellement ségrégué dans l'ovocyte (49%) par rapport au globule polaire (21%).

Figure 32: sortie de méiose I et réplication



In fine, toutes ces données, notamment les plus récentes, vont plutôt en faveur de l'existence d'un point de contrôle du fuseau fonctionnel et requis en méiose I chez la souris, permettant de classer la souris comme plus proche de la levure et du nématode que du xénope concernant ce point (je discuterai ces résultats dans le chapitre conclusions et perspectives).

6. Transition entre les deux phases M de méiose

A la transition métaphase I/anaphase I, l'activité MPF chute suite à la dégradation de la Cycline B et induit l'inactivation de CDK1 (Glotzer et al., 1991; Kobayashi et al., 1991b; Peter et al., 2001; Taieb et al., 2001). Dès l'anaphase I, la synthèse des Cyclines B entraîne une réactivation du MPF, permettant le maintien d'un niveau basal de MPF lors de la phase G intermédiaire entre les deux phases de division et inhibant probablement la phase réplicative (Hochegger et al., 2001; Kobayashi et al., 1991b).

Entre les deux phases M, les chromosomes restent condensés, le noyau ne se reforme pas et l'ADN ne se réplique pas; la chromatine et les microtubules restent dans un état pseudo-métaphasique. Chez le xénope, la réactivation rapide du MPF dès l'anaphase I permet à l'ovocyte d'entrer en seconde phase M de méiose. L'inhibition des synthèses protéiques chez le xénope par ajout de cycloheximide au moment de GVBD conduit à l'inactivation totale du MPF et entraîne la décondensation des chromosomes et la formation de noyaux non réplicants (figure 32) (Furuno et al., 1994; Huchon et al., 1993; Thibier et al., 1997). Si la cycloheximide est ajoutée 30 minutes après GVBD, les noyaux acquièrent la capacité à répliquer l'ADN (figure 32) (Dupre et al., 2002; Furuno et al., 1994). Ces données indiquent d'une part que la compétence à répliquer est acquise après GVBD grâce à la néo-synthèse de protéines nécessaires à la machinerie de réPLICATION et d'autre part que des protéines néo-synthétisées au cours de cette même période sont capables de maintenir cette machinerie sous forme inactive afin d'assurer le succès de la méiose (figure 32).

61. CDC6

CDC6 est une protéine essentielle à la réPLICATION de l'ADN et pourrait être la protéine qui confère à l'ovocyte sa compétence à répliquer. La réPLICATION de l'ADN se fait selon deux étapes. Tout d'abord, de nombreux facteurs s'assemblent sur les origines de réPLICATION pour former des complexes de pré-réPLICATION, constitués d'hélicases MCMs et d'ORCs. Ce

complexe s'assemble à la sortie de mitose grâce à des facteurs d'initiation comme CDC6. Ensuite, l'activation des CDKs à la phase S conduit à l'initiation de la réPLICATION.

Dans l'ovocyte de xénope, CDC6 est absente en prophase et s'accumule une heure après GVBD (figure 32). Elle subit des phosphorylations au cours de la maturation suggérant que son activité est régulée. Des ovocytes de xénope microinjectés avec des oligonucléotides antisens ciblants l'ARNm endogène de CDC6 et traités à la cycloheximide après GVBD ne sont plus capables de répliquer leur ADN. En absence de synthèse de CDC6, la réPLICATION de l'ADN n'a pas lieu après activation parthénogénétique des ovocytes. L'injection de la protéine recombinante est capable de restaurer la réPLICATION dans ces deux expériences. CDC6 est donc nécessaire et suffisante à la réPLICATION. Elle correspond au facteur manquant dans l'ovocyte à GVBD. CDC6 étant synthétisée après GVBD, il doit exister un ou plusieurs mécanismes inhibiteurs, notamment la phosphorylation inhibitrice de la protéine, entre les deux divisions de méiose (Lemaitre et al., 2002; Whitmire et al., 2002). Chez la souris, CDC6 n'est pas présente en prophase et est synthétisée au cours de la maturation méiotique comme chez le xénope. Chez la drosophile, la situation est comparable, CDC6 étant absente en prophase et synthétisée entre la métaphase I et la métaphase II. Chez ces trois espèces, les ovocytes sont donc compétents à répliquer au cours de leur maturation méiotique, mais CDC6 est inhibée. Ce mécanisme permettrait d'accumuler CDC6 en prévision des phases S embryonnaires, la transcription étant inhibée au cours du développement précoce dans ces espèces. Chez la levure *S.pombe*, la situation est différente. La synthèse de CDC6 est inhibée au cours de la méiose, les spores ne sont donc pas compétentes à répliquer. Chez cette espèce, la transcription reprend dès la fin de la méiose et CDC6 est alors rapidement synthétisée (Lemaitre et al., 2004, annexe 4).

62. Rôle des Cyclines

Les Cyclines B néo-synthétisées lors de la transition méiose I/méiose II pourraient participer à l'inhibition de la phase S et à l'entrée en méiose II via la régulation de l'activité MPF. En effet, l'injection d'une forme dominante négative de CDK1 au moment de GVBD chez le xénope bloque l'entrée en métaphase II et suffit à induire la réPLICATION de l'ADN (Furuno et al., 1994). Des ovocytes de souris microinjectés avec des ARN antisens ou des ARN double-brins ciblants l'ARNm endogène codant pour la Cycline B effectuent leur première phase M de méiose normalement, ils expulsent leur premier globule polaire, mais ne peuvent pas réactiver le MPF et continuent en interphase au lieu d'effectuer la seconde phase M de

méiose. Ils reforment des membranes nucléaires et décondensent leur chromatine (Ledan et al., 2001).

Ces données indiquent que la régulation de la transition méiose I/méiose II est directement liée à l'activité MPF. Le reliquat d'activité MPF entre les deux divisions méiotiques pourrait être suffisant pour éviter la reformation d'une enveloppe nucléaire et la décondensation des chromosomes. Ainsi, la capacité à répliquer, présente au cours de cette période grâce à l'apparition de CDC6, ne pourrait pas être utilisée tant que l'ADN reste condensé et qu'un noyau n'est pas formé. La dégradation incomplète des Cyclines et la reprise de leur traduction inhiberait donc le retour en interphase (figure 32). Les mécanismes permettant le maintien de cette activité basale de MPF ne sont pas connus.

63. Rôle de la voie Mos/.../MAPK

La suppression de la phase réplicative durant la transition dépend aussi de la voie Mos/.../MAPK. Chez les souris dont le gène Mos a été invalidé, 22% des ovocytes entrent dans un état pseudo-interphasique après la méiose I et 78% d'entre eux entrent en métaphase II après la réactivation du MPF (Verlhac et al., 1996). Cependant pour ces ovocytes qui passent en métaphase II, les microtubules et la chromatine évoluent vers une organisation interphasique lors de la transition entre les deux divisions méiotiques (Verlhac et al., 1996). La réplication de l'ADN pouvant avoir lieu sans reformation d'une membrane nucléaire (Lemaitre et al., 1998) il serait intéressant d'effectuer des tests d'incorporation de BrDU sur ces ovocytes afin d'établir s'il y a ou non réplication entre les deux divisions méiotiques.

La voie Mos/.../MAPK maintient donc les microtubules et la chromatine dans un état pseudo-métaphasique lors de la transition, ce qui aiderait à inhiber la réplication, la chromatine condensée ne pouvant pas être répliquée (Furuno et al., 1994; Verlhac et al., 1994).

En l'absence de Mos dans les ovocytes d'étoile de mer, la méiose I est suivie par une phase réplicative et des cycles embryonnaires répétés. Si l'on rajoute Mos, les ovocytes continuent en méiose II (Tachibana et al., 2000).

Dans l'ovocyte de xénope, lorsque MEK est inhibée par le U0126, l'activité MPF chute totalement, des noyaux se reforment, l'ADN est répliqué et l'ovocyte n'entre pas en seconde division méiotique (Furuno et al., 1994; Gross et al., 2000) (figure 32). L'action de la voie Mos/.../MAPK semble dépendre de la synthèse d'autres protéines, les Cyclines B. Mos réprimerait la réplication via le MPF. Dans ces ovocytes traités au U0126, l'injection d'une forme constitutivement active de p90^{RSK} permet de restaurer l'accumulation des Cyclines,

l'activation de CDK1 et la formation du fuseau de métaphase II (Gross et al., 2000). Ces données indiquent que sous l'influence de la MAPK, p90^{RSK} est capable de stimuler la synthèse et/ou d'inhiber la dégradation des Cyclines entre les deux divisions méiotiques chez le xénope; elle participe de cette façon à la réactivation du MPF et à l'entrée en méiose II. Cependant, l'injection de la protéine Mos ne suffit pas à inhiber la réplication induite par l'inhibition des néo-synthèses protéiques après GVBD (Furuno et al., 1994), indiquant que Mos est nécessaire à la suppression de la phase S mais pas suffisante.

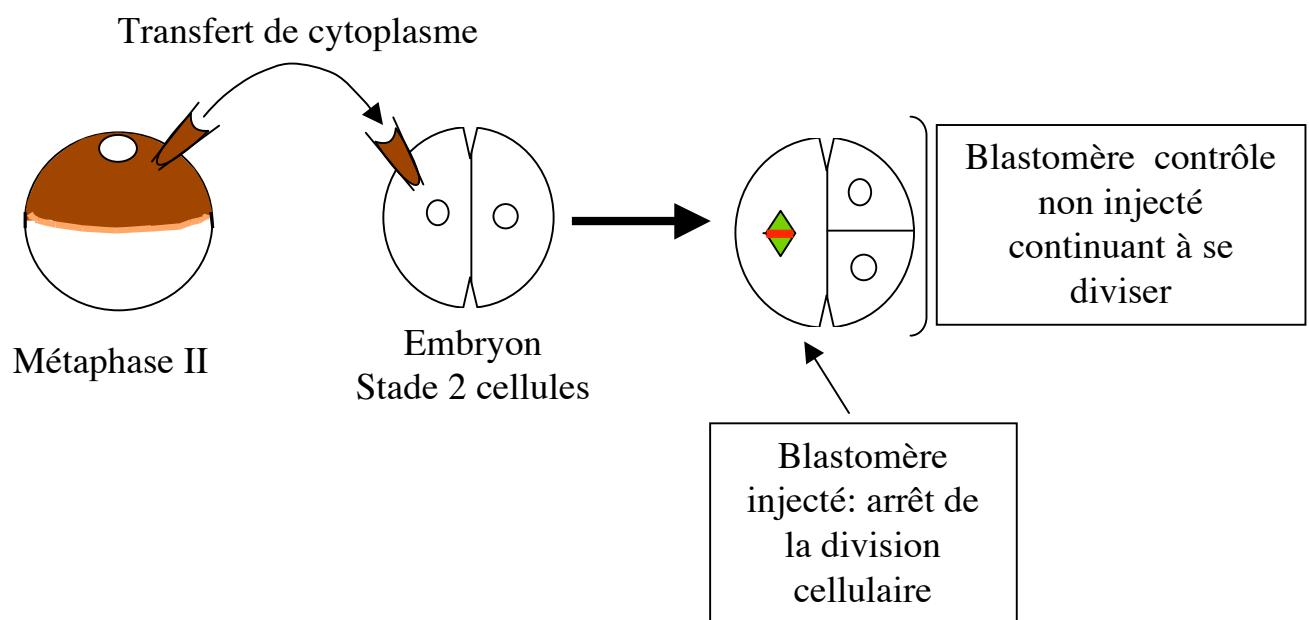
Cependant, des résultats récents obtenus dans les ovocytes de xénope montrent que si l'activité de Mos est bloquée par l'injection de morpholinos oligonucléotides anti-Mos, les ovocytes répliquent entre la méiose I et la méiose II, entrent en métaphase II puis s'activent spontanément mimant des cycles embryonnaires mitotiques, de manière similaire à l'inhibition de Mos chez l'étoile de mer (Dupre et al., 2002). Ces observations vont à l'encontre des résultats obtenus avec le U0126.

64. Wee1

Le maintien de l'activité MPF dépend non seulement de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des Cyclines comme nous venons de le voir, mais également de l'inhibition de la kinase Wee1. Wee1 est capable comme Myt1 de phosphoryler CDK1 sur les résidus inhibiteurs Tyr 15 et Thr 14. Contrairement à Myt1, Wee1 est absente dans les ovocytes de xénope bloqués en prophase. Wee1 est synthétisée en réponse à la progestérone après GVBD et s'accumule progressivement jusqu'en métaphase II (figure 32) (Iwabuchi et al., 2000; Nakajo et al., 2000). Il a été montré que l'expression ectopique de Wee1 dans les ovocytes de xénope stimulés par la progestérone entraîne l'inactivation de CDK1 après GVBD, la reformation de noyau et la réplication de l'ADN (Nakajo et al., 2000), indiquant qu'en temps normal cette kinase doit être absente ou inhibée dans les ovocytes immatures. Il a été suggéré que l'activité de CDK1 contrôle négativement la kinase Wee1 (Iwabuchi et al., 2000; Mueller et al., 1995b; Nakajo et al., 2000). L'activité basale de CDK1 lors de la transition méiose I/méiose II serait donc suffisante pour inhiber Wee1 et l'apparition d'une phase réplicative.

En conclusion, l'inhibition de la réplication entre les deux divisions méiotiques dépend du maintien d'une activité MPF résiduelle (grâce à la voie Mos/.../MAPK et à l'inhibition de Wee1), ainsi que de l'inhibition de CDC6. Il n'est pas à exclure que CDC6 puisse être inhibée par des phosphorylations dépendantes du MPF et de la voie Mos/.../MAPK.

Figure 33: mise en évidence de l'activité CSF chez l'amphibien par transfert de cytoplasme



7. Seconde phase M de méiose et arrêt CSF en métaphase II

71. Reformation du fuseau de division et alignement des chromosomes

Après émission du premier globule polaire, le fuseau de métaphase II se forme autour des chromosomes et s'oriente parallèlement au cortex de l'ovocyte. La fécondation déclenche l'anaphase et l'apparition de deux bosses corticales au-dessus des deux masses de chromatides sœurs séparées. Une de ces bosses s'élargit tandis que l'autre rétrécit et qu'a lieu la rotation du fuseau qui se place perpendiculairement au cortex. Quand le fuseau a fini sa rotation, le clivage s'achève et le second globule polaire est expulsé (Gard, 1992).

72. Arrêt en métaphase II

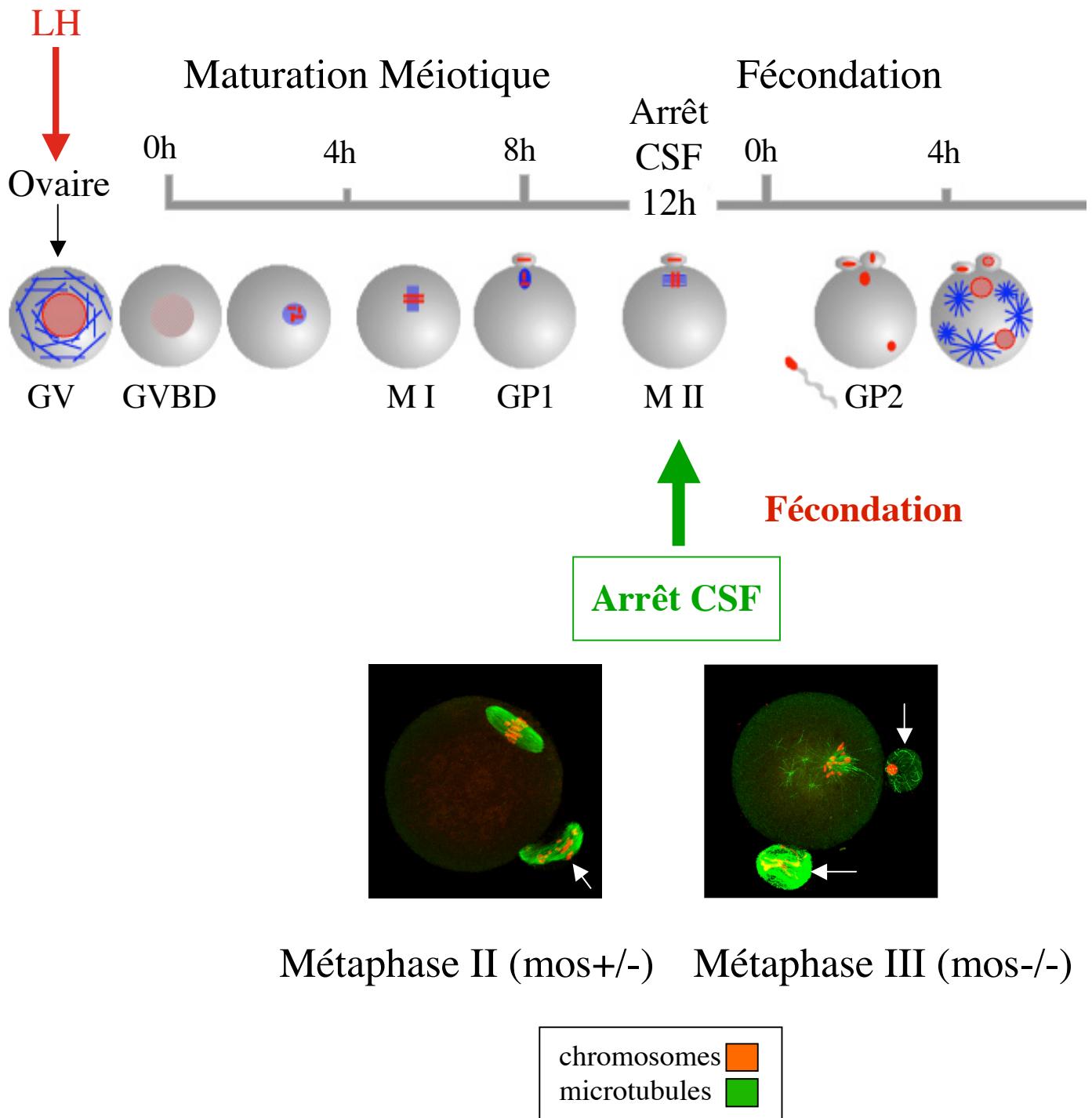
L'ovocyte de vertébré est bloqué en métaphase II, lors de l'arrêt CSF (CytoStatic Factor), en l'attente de la fécondation. Cet arrêt est propre aux cellules germinales femelles des vertébrés. L'arrêt CSF est caractérisé par une forte activité MPF et par la présence d'un fuseau de division stable avec des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique. La nature moléculaire du CSF n'est pas totalement connue à ce jour malgré sa mise en évidence en 1971 par Masui et Markert en même temps que le MPF (Masui and Markert, 1971).

a) Le CSF

L'activité CSF ralentit la dégradation de la Cycline B, maintenant ainsi une activité MPF forte qui empêche la sortie de métaphase. L'activité CSF a été mise en évidence par injection de cytoplasme d'ovocyte d'amphibien bloqué en métaphase II dans un blastomère d'embryon au stade deux cellules. Cette injection induit l'arrêt du cycle cellulaire dans le blastomère injecté, le blastomère contrôle non injecté continuant à se diviser (figure 33). Sur la base de ce test, Masui a montré que le CSF apparaît au cours de la maturation méiotique après GVBD en méiose I et qu'il disparaît après la fécondation. Physiologiquement, l'ovocyte de vertébré ne se bloque jamais en métaphase I, suggérant qu'un mécanisme serait soit capable d'inhiber le CSF en méiose I soit de compenser son activité afin d'effectuer la transition méiose I/ méiose II.

Au cours de l'arrêt CSF chez la souris, les Cyclines B sont partiellement dégradées et en permanence resynthétisées. Il existe donc un état d'équilibre synthèse/dégradation en faveur

Figure 34: voie MAPK et arrêt CSF



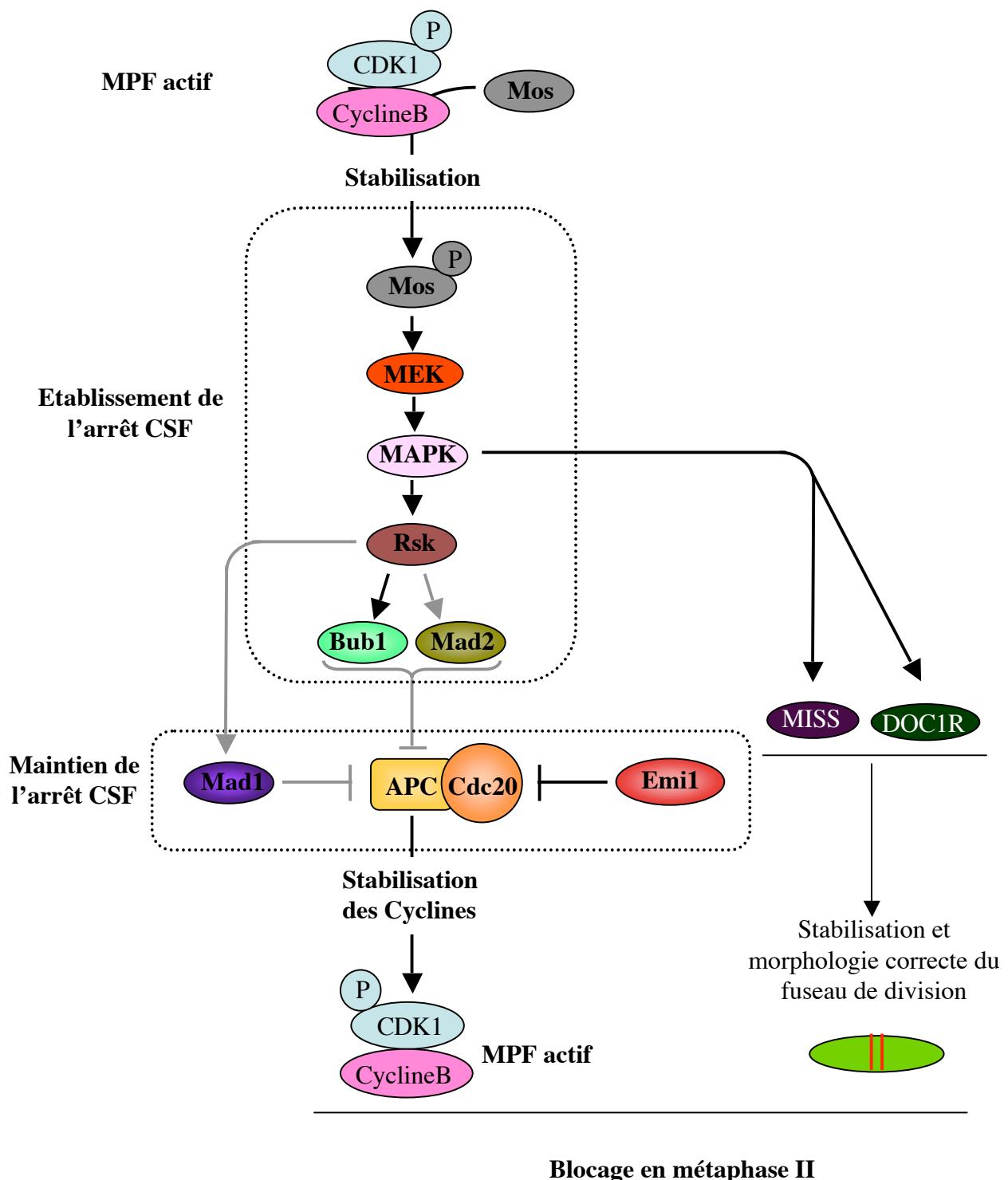
de l'accumulation de la Cycline B (Kubiak et al., 1993). L'inhibition des synthèses protéiques chez la souris en métaphase II active donc parthénogénétiquement les ovocytes, la Cycline B étant dégradée mais pas resynthétisée (Siracusa et al., 1978). En revanche, l'inhibition des synthèses protéiques (par la cycloheximide) dans des ovocytes de xénope bloqués en métaphase II n'entraîne qu'une inactivation partielle de CDK1 et dans ces conditions le fuseau de métaphase reste stable (Thibier et al., 1997). Cela montre qu'en corrélation avec la faible diminution de l'activité MPF, une petite proportion de Cyclines B est dégradée mais la majorité reste stable chez le xénope.

L'activité CSF de l'ovocyte de xénope est donc capable de stabiliser les Cyclines, en inhibant directement l'APC ou en protégeant les Cyclines de l'activité de l'APC. Des expériences réalisées chez le xénope indiquent que la compartimentation des différents partenaires pourrait jouer un rôle dans la protection des Cyclines B contre la dégradation induite par l'APC. En effet, la centrifugation à petite vitesse d'ovocytes bloqués en métaphase II conduit à la dégradation totale des Cyclines B (Thibier et al., 1997). Cette centrifugation modifie l'architecture interne des cellules et pourrait induire un rapprochement artificiel de partenaires normalement éloignés dans la cellule.

b) Voie Mos/.../MAPK et établissement de l'arrêt CSF

Mos possède une activité CSF sur la base du test fonctionnel suivant: l'injection de la protéine dans un blastomère d'embryon de xénope ou de souris au stade deux cellules bloque la division du blastomère injecté (Sagata et al., 1989b). Comme l'activité CSF, la protéine Mos apparaît au moment de GVBD, reste active jusqu'en métaphase II et disparaît après la fécondation chez le xénope (Watanabe et al., 1989). Les ovocytes des souris dont le gène Mos a été invalidé ne s'arrêtent pas en métaphase II, mais s'activent de manière parthénogénétique, induisant des carcinomes ovariens (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996). Ces souris sont hypofertiles. En métaphase II, l'activité MPF n'est pas stabilisée, induisant l'expulsion du second globule polaire et le passage en « métaphase III » de ces ovocytes (figure 34). Les ovocytes s'arrêtent en « métaphase III » avec des fuseaux de division monopolaires, arrêt médié sans doute par l'activation du point de contrôle du fuseau. Chez le xénope, l'inhibition de la synthèse de Mos par injection de morpholinos oligonucléotides antisens conduit à une activation parthénogénétique: après GVBD, l'activité MPF entame une série de cycles périodiques, entrecoupés de phases de réPLICATION de l'ADN, qui miment les cycles de division embryonnaires (Dupre et al., 2002).

Figure 35: contrôle de l'arrêt en métaphase II



Chez l'étoile de mer, la situation est similaire. L'inhibition de la synthèse de Mos par injection d'oligonucléotides conduit à l'activation parthénogénétique des œufs (Tachibana et al., 2000).

Les données issues des modèles d'étoile de mer, de xénope et de souris montrent sans ambiguïté que Mos est nécessaire à l'arrêt CSF. Au cours de l'arrêt en métaphase II, l'accumulation de Mos est sous le contrôle de l'activité MPF (Frank-Vaillant et al., 2001). Le blocage en métaphase II repose donc sur un équilibre entre le MPF et la voie Mos/.../MAPK qui assurent mutuellement leur stabilisation (figure 35).

Chez le xénope, l'injection de la protéine Mos ou de formes constitutivement actives de MAPK, MEK ou p90^{RSK1} dans un blastomère d'embryon au stade 2 cellules entraîne la stabilisation du MPF et le blocage en métaphase du blastomère injecté (Bhatt and Ferrell, 1999; Gross et al., 1999; Haccard et al., 1993; Huang et al., 1994; Sagata et al., 1989b), indiquant que les composants situés en aval de Mos dans la voie Mos/.../MAPK ont une activité CSF.

Il existe deux formes de p90^{RSK}: RSK1 et 2. La forme RSK2 est 25 fois plus abondante que la forme RSK1 dans l'ovocyte de xénope (Bhatt and Ferrell, 2000). L'immunodéplétion de p90^{RSK2} d'extraits mitotiques de xénope artificiellement arrêtés en phase M suite à l'addition de Mos induit une sortie de cet arrêt mitotique (Bhatt and Ferrell, 1999). L'addition de U0126 sur des ovocytes de xénope maturants induit le passage en interphase de ces œufs après la métaphase I; l'injection d'une forme constitutivement active de p90^{RSK1} dans les ovocytes de xénope traités au U0126 restaure l'arrêt CSF (Bhatt and Ferrell, 2000). L'ensemble de ces données suggère que chez le xénope la voie MEK/MAPK/p90^{RSK} est nécessaire et suffisante à la mise en place de l'arrêt CSF.

Comment s'effectue la connexion entre la voie Mos/.../MAPK/p90^{RSK} et la stabilisation des Cyclines ? Il a été suggéré que les protéines du point de contrôle du fuseau pourraient être responsables de l'arrêt de l'ovocyte en métaphase II, d'une façon indépendante des défauts du fuseau. Chez le xénope, les protéines du point de contrôle du fuseau Bub1, Mad1 et Mad2 sont des cibles de la voie Mos/.../MAPK (Schwab et al., 2001; Tunquist et al., 2003; Tunquist et al., 2002). La déplétion de Bub1 et Mad2 est capable de supprimer la mise en place d'un arrêt CSF induit dans des extraits par Mos, indiquant qu'elles sont nécessaires à l'action de Mos lors de ce processus (Tunquist et al., 2003; Tunquist et al., 2002).

Bien que la voie Mos/.../MAPK/p90^{RSK} soit requise pour l'établissement de l'arrêt CSF, il semble qu'elle ne soit pas nécessaire à son maintien chez le xénope. L'immunodéplétion de p90^{RSK2} dans des extraits CSF d'oeufs de xénope n'empêche pas le maintien de l'arrêt CSF (Bhatt and Ferrell, 1999). De même, l'inhibition de l'activité de la MAPK par du U0126 dans des extraits CSF d'œufs de xénope ne suffit pas à entraîner leur perte d'activité CSF. De plus, le même résultat est obtenu lorsqu'on immunodéplete les protéines Bub1 et Mad2, mais pas Mad1, dans des extraits d'œufs de xénope non fécondés (Tunquist et al., 2003; Tunquist et al., 2002). Le maintien de l'arrêt en métaphase II semble donc indépendant de la voie Mos/.../MAPK/p90^{RSK} et des protéines Bub1 et Mad2. Il serait en revanche dépendant de Mad1 et d'une autre protéine nommée Emi1 (Reimann et al., 2001; Reimann and Jackson, 2002) (figure 35).

p90^{RSK} était le seul substrat connu des MAPK il y a cinq ans dans les ovocytes de xénope. Chez le xénope, p90^{RSK} serait l'unique effecteur de la voie Mos/.../MAPK responsable de la mise en place de l'arrêt CSF via la phosphorylation et l'activation de Bub1 , mais pas de son maintien (Gross et al., 1999 ; Gross et al., 2000; Palmer et al., 1998; Schwab et al., 2001; Tunquist et al., 2002) (figure 35). La situation a l'air différente dans les ovocytes de souris. La MAPK active p90^{RSK} (Kalab et al., 1996), mais aussi d'autres substrats comme MISS et DOC1R, essentiels au maintien d'une morphologie correcte du fuseau de division de l'ovocyte au cours de l'arrêt CSF (Lefebvre et al., 2002, article3; Terret et al., 2003a, article 2). DOC1R possède un homologue chez le xénope, renforçant l'idée que l'action de la voie Mos/.../MAPK ne passerait pas uniquement par p90^{RSK} même chez le xénope. Cette hypothèse est renforcée par le papier de Horne MM (Horne and Guadagno, 2003) qui montre que la MAPK en mitose est nécessaire pour stabiliser les fuseaux bipolaires de façon indépendante de p90^{RSK}. De plus chez la souris, des preuves indirectes indiquent que p90^{RSK} pourrait ne pas être requis pour établir et/ou maintenir l'arrêt CSF. Dans les ovocytes de souris dont le gène Mos a été invalidé (comme dans les ovocytes de xénope injectés avec des morpholinos oligonucléotides anti-Mos, Dupre et al., 2002), ne possédant donc pas d'activité MAPK, l'activité de p90^{RSK} est à 50%, cependant les ovocytes ne s'arrêtent pas en métaphase II mais s'activent parthénogénétiquement (Kalab et al., 1996). De plus dans ces ovocytes, Bub1 est phosphorylée et localisée de la même façon que dans les souris sauvages pour leur maturation méiotique (Brunet et al., 2003) laissant supposer que Bub1 ne jouerait pas de rôle au cours de l'arrêt CSF. Par ailleurs, des souris invalidées pour le gène codant p90^{RSK2} ont été réalisées. Ces souris sont parfaitement fertiles et se développent normalement (mis à part des

problèmes d'ostéogénèse, Yang et al., 2004). Enfin, l'injection de formes constitutivement actives de p90^{RSK} 1 et 2 chez la souris ne restaure pas l'arrêt CSF des ovocytes Mos-/- et n'arrête pas la division des blastomères injectés au stade 2-cellules (Marie-Hélène Verlhac, communication personnelle).

c) Emi1 et le maintien de l'arrêt CSF

Emi1 est un inhibiteur de l'APC (Reimann et al., 2001). Au cours des cycles embryonnaires, son expression varie: elle est maximale en phase S et est dégradée en mitose selon un mécanisme dépendant du protéasome mais pas de l'APC (Hsu et al., 2002; Reimann et al., 2001). Avant la mitose, elle se lie à CDC20 bloquant l'activation de l'APC, conduisant à la stabilisation des Cyclines A, B et de la sécurine. Emi1 est présente chez le xénope durant la maturation méiotique. CDC20 s'accumule en réponse à la progestérone chez le xénope à partir de GVBD et constitue le seul activateur connu de l'APC assurant la dégradation de la sécurine et de la Cycline dans l'ovocyte de xénope (Lorca et al., 1998; Peters, 2002 ; Taieb et al., 2001). L'injection de Emi1 dans un blastomère d'un embryon de xénope au stade deux cellules induit un arrêt en métaphase du blastomère injecté, suggérant qu'Emi1 pourrait participer à l'arrêt CSF (Reimann et al., 2001). Dans des extraits CSF d'oeufs de xénope, l'addition de Emi1 bloque la dégradation de la Cycline B en réponse au calcium selon un mécanisme dépendant de Mos et de la MAPK. La déplétion de Emi1 de ces extraits CSF conduit à la dégradation de la Cycline B , de Mos et à l'inactivation de la MAPK en absence de calcium (Reimann and Jackson, 2002). Emi1 agirait donc en métaphase II pour stabiliser l'activité du MPF via l'inhibition de l'APC et la stabilisation de la Cycline B. Cependant, Emi1 étant présente dès GVBD, elle doit donc être inactivée jusqu'en métaphase II puisque l'ovocyte ne s'arrête pas en métaphase I.

Si la voie Mos/.../MAPK/p90^{RSK} est responsable de la mise en place de l'arrêt CSF, Emi1 pourrait être responsable du maintien de cet arrêt (figure 35). Le rôle de Emi1 dans l'établissement de l'arrêt CSF reste à approfondir, Emi1 étant physiologiquement responsable de l'inhibition de l'APC en phases S et G2 et permettant l'accumulation de la Cycline A (Peters, 2003).

d) CDK2/Cycline E.

Dans les cellules somatiques eucaryotes, CDK2 joue un rôle majeur dans la transition G1/S et durant la phase S. Au cours de la maturation méiotique, l'accumulation de CDK2 est maximale en métaphase II (Gabrielli et al., 1992). Chez le xénope, l'inhibition de la synthèse de CDK2 par des oligonucléotides antisens empêche l'ovocyte de maintenir une activité stable et élevée de MPF en métaphase II (Gabrielli et al., 1993; Rempel et al., 1995). L'inhibition de l'activité de CDK2 est par contre sans effet sur l'activité MPF en métaphase II, suggérant que le rôle de CDK2 dans l'arrêt CSF ne passe pas par son activité kinasique ou que CDK2 n'a aucun rôle dans l'arrêt CSF (Furuno et al., 1997). Le complexe CDK2/Cycline E est capable d'induire un arrêt en métaphase dans des extraits d'œufs de xénope même en l'absence de Mos et peut inhiber la dégradation de la Cycline B quand il est exprimé en anaphase de méiose I (Tunquist et al., 2002). Cependant CDK2 injectée dans un blastomère d'un embryon au stade deux cellules est incapable de bloquer la division. Cela montre soit que CDK2 participe à l'arrêt CSF mais qu'elle doit être modifiée post-traductionnellement ou activée pour médier son rôle, soit qu'elle n'est pas requise pour l'arrêt CSF mais stockée uniquement pendant la maturation méiotique pour exercer son rôle rapidement dans les phases S qui vont se succéder après la fécondation (Furuno et al., 1997).

En résumé, chez le xénope la voie Mos/MEK/MAPK/p90^{RSK}/Bub1 est requise pour la mise en place de l'arrêt CSF via l'inhibition de l'APC et donc la stabilisation des Cyclines. En revanche, le maintien de l'activité CSF jusqu'à la fécondation est indépendant de cette voie et requiert Emi1 et Mad1 qui inhibent CDC20 afin de bloquer l'APC, maintenant une activité MPF forte. Chez la souris, la voie Mos/.../MAPK aurait d'autres substrats que p90^{RSK}, permettant une stabilisation du fuseau lors de l'arrêt CSF (figure 35). De plus chez la souris, le traitement au U0126 active les ovocytes bloqués en métaphase II, suggérant que différemment du xénope, la voie Mos/.../MAPK est nécessaire au maintien de l'arrêt CSF (Phillips et al., 2002).

73. fécondation

La fécondation induit la sortie de l'arrêt en métaphase II. Les chromatides sœurs se séparent, le second globule polaire est expulsé et les pronuclei se forment. La fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte conduit à une augmentation transitoire du calcium intracellulaire, à l'activation

consécutive de la calmoduline Kinase II puis à l'activation de la dégradation des Cyclines B (Glotzer et al., 1991; Lorca et al., 1993; Murray et al., 1989). L'activité CSF de Mos est donc contournée grâce à un pic calcique qui induit directement la dégradation de la Cycline B. La dégradation de Mos induite par la fécondation est ensuite entraînée par l'inactivation du MPF (Bodart et al., 1999; Frank-Vaillant et al., 2001). En effet, la phosphorylation de Mos sur la sérine 3, catalysée par CDK1, cesse, ce qui déstabilise Mos (Castro et al., 2001).

RESULTATS

ARTICLE 1

The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity

Terret M.E, Wassmann K, Waizenegger I.C, Maro B,
Peters J.-M, Verlhac M.-H.

Current Biology 2003. 13 (14) 1797-1802

Situation du sujet

La mitose permet la multiplication clonale des cellules. Des dérèglements de ce processus peuvent conduire à la multiplication anarchique des cellules et à un processus de cancérisation. La méiose est une succession de deux divisions cellulaires sans synthèse d'ADN « intermédiaire » ce qui permet l'obtention de gamètes haploïdes.

Au cours de la mitose, l'ADN de la cellule s'organise en chromosomes condensés s'alignant sur la plaque métaphasique du fuseau de division afin d'être ségrégés en deux lots équivalents à l'issue de la division cellulaire. Un mécanisme de contrôle bloque la cellule en métaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur la plaque métaphasique, évitant ainsi une séparation précoce et anarchique des chromatides sœurs. Ce mécanisme de contrôle inhibe l'APC qui ne peut pas cibler ses substrats pour la dégradation par le protéasome.

En méiose I, des résultats contradictoires selon les espèces ont été publiés quant à l'existence d'un mécanisme passant par l'inhibition de l'APC et contrôlant la séparation des chromosomes homologues. Chez des espèces comme le nématode et la levure, il a été montré que l'APC actif et l'activité séparase (une activité indirectement régulée par ce mécanisme de contrôle en mitose) sont requis pour effectuer la première division de méiose (Buonomo et al., 2000; Davis et al., 2002; Furuta et al., 2000; Golden et al., 2000; Kitajima et al., 2003; Siomos et al., 2001). Chez le xénope au contraire l'APC actif et l'activité séparase ne sont pas nécessaires (Peter et al., 2001; Taieb et al., 2001). Chez la souris, l'existence d'un mécanisme de contrôle de ce type était très controversée quand j'ai commencé mon étude.

- Beaucoup d'arguments allaient à l'encontre de l'existence d'un point de contrôle de ce type chez l'homme et la souris. Le premier était que l'âge des femmes et des souris est corrélé avec le pourcentage d'aberrations chromosomiques résultant d'erreurs au cours de la méiose I femelle (Angell, 1994; Hunt and LeMaire-Adkins, 1998). Le second était l'existence des souris XO n'ayant qu'un chromosome X et fertiles.

- Quelques arguments indirects étaient en faveur de l'existence d'un mécanisme de contrôle de ce type chez la souris. CENP-E est requise pour faire la transition métaphase I/anaphase I (Duesbery et al., 1997). De plus, la surexpression de la Cycline B1 dans des ovocytes de souris induit un blocage en métaphase I, suggérant que la dégradation de la Cycline B est requise pour la transition métaphase I/anaphase I et/ou que l'APC peut être saturé par un excès de son substrat (Ledan et al., 2001).

Des erreurs en méiose I conduisant à des aneuploïdies et des problèmes de stérilité, il était donc important de déterminer si chez la souris, un mécanisme de contrôle de ce type était fonctionnel et requis pour la transition métaphase I/anaphase I. J'ai donc analysé l'importance de l'activité séparase dans la transition méiose I/méiose II au cours de la maturation méiotique chez la souris.

Résultats principaux

1. Nécessité de la dégradation via le protéasome.

Nous avons traité des ovocytes de souris par du MG132, un inhibiteur du protéasome. Le 26S protéasome dégrade les cibles ubiquitinées de l'APC comme la sécurine et la Cycline B, mais pas uniquement. Cette inhibition du protéasome est donc générale et ne concerne pas uniquement les cibles du point de contrôle du fuseau. Les ovocytes incubés dans du MG132 s'arrêtent en métaphase de première division de méiose (avec une forte activité MPF et un taux de Cycline B élevé) alors que les ovocytes contrôles passent la transition méiose I/méiose II et s'arrêtent en métaphase II.

Cette expérience montre que la dégradation effectuée par le protéasome est nécessaire à la transition méiose I/ méiose II chez la souris.

2. Nécessité de l'activité séparase

Nous avons microinjecté les ovocytes de souris avec un inhibiteur de séparase (Waizenegger et al., 2002). Cet inhibiteur est un peptide dérivé du site de clivage de la cohésine Scc1 humaine qui se lie au site actif de la séparase. Les ovocytes microinjectés avec l'inhibiteur de séparase ont une cinétique de maturation méiotique normale et expulsent leur globule polaire comme les ovocytes contrôles microinjectés avec du DMSO, le solvant de l'inhibiteur, ou avec un peptide contrôle. Les ovocytes sont donc à 90% arrêtés en métaphase de seconde division (avec une activité MPF élevée et un fort taux de Cycline B). Les ovocytes contrôle sont arrêtés avec une morphologie correcte: un fuseau de division en tonneau dont les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. Les ovocytes microinjectés avec l'inhibiteur de séparase présentent tous des phénotypes aberrants. 100% d'entre eux ont des plaques métaphasiques avec un mélange de chromosomes bivalents de méiose I (en forme de papillon) et de chromosomes monovalents de méiose II (en forme de bâtonnet). Cela montre que des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues ont eu lieu en méiose I. De

plus, 15% d'entre eux ont des phénotypes de type « cut », comme il a été décrit chez la levure, avec des chromosomes bloqués entre l'ovocyte et le globule polaire, indiquant que des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues sont intervenues en anaphase I.

L'injection de l'inhibiteur de séparase inhibe la séparase. Les chromosomes s'alignent normalement sur la plaque métaphasique en méiose I, le point de contrôle du fuseau est inhibé (ne détectant aucun chromosome pas aligné) et l'APC ubiquitine ses substrats. La dégradation de la Cycline B est donc effectuée, déclenchant la transition métaphase/anaphase, ainsi que la dégradation de la sécurine nécessaire à l'activation de la séparase. On peut penser que l'inhibiteur de la séparase ne sera pas efficace à 100% sur chaque chromosome homologue, et que certains se sépareront normalement. Par contre là où l'inhibiteur est actif, les cohésines persistent entre les chromosomes homologues, ce qui empêche leur séparation. On peut imaginer que la force du fuseau de méiose I est suffisante pour casser les interactions entre les microtubules du fuseau et les kinétochores, permettant le passage des bivalents dans l'ovocyte ou le globule polaire (comme dans le cas des souris XO). Cela explique le mélange de bivalents et de monovalents en métaphase II.

Ces résultats montrent que l'activité séparase est nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes homologues en méiose I.

3. Nécessité de la dégradation de la sécurine

Les ovocytes de souris ont été microinjectés avec un ARNm codant pour la sécurine. Les ovocytes microinjectés avec l'ARNm codant pour la sécurine se bloquent majoritairement (70%) en métaphase de première division de méiose (avec une forte activité MPF, un fort taux de Cycline B et un fuseau de méiose I normal en position sous-corticale). 30% de ces ovocytes injectés arrivent à passer la transition méiose I/méiose II et s'arrêtent en métaphase de seconde division de méiose. 78% de ces ovocytes ont un phénotype comme celui obtenu après injection de l'inhibiteur de séparase: des plaques métaphasiques avec un mélange de chromosomes bivalents de méiose I et de chromosomes monovalents de méiose II, montrant que des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues ont eu lieu en méiose I.

A forte concentration, on peut penser que la sécurine sature l'APC, inhibant donc sa fonction. L'APC étant inhibé, il ne peut pas ubiquitinier ses substrats et la Cycline B n'est pas dégradée, inhibant la transition métaphase/anaphase. Les ovocytes sont donc bloqués en méiose I. A plus faible concentration, la sécurine ne sature pas l'APC et inhibe uniquement la séparase. La transition métaphase/anaphase s'effectue suite à la dégradation de la Cycline B, mais les

cohésines entre les chromosomes homologues ne sont pas totalement dégradées. On est alors dans le même cas qu'en présence de l'inhibiteur de séparase, avec des cassures entre les microtubules du fuseau et les kinétochores.

Ces résultats montrent à nouveau que l'activité séparase est nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes homologues en méiose I et que l'APC pourrait être requis pour ce processus.

Conclusions

Mon travail montre que l'activité séparase est requise pour la ségrégation des chromosomes homologues lors de la méiose I femelle et suggère que l'APC actif pourrait également être requis dans ce processus. Ces résultats rapprochent la souris du nématode et de la levure chez lesquels l'APC actif et l'activité séparase sont requis pour effectuer la transition méiose I/méiose II. Chez le xénope en revanche, l'inhibition de l'APC ne bloque pas la transition méiose I/méiose II, qui peut se faire sans dégradation de la Cycline B et de la sécurine.

The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity

M. Emilie Terret,^{1,4} Katja Wassmann,^{2,4}
Irene Waizenegger,^{3,5} Bernard Maro,²
Jan-Michael Peters,³ and Marie-Hélène Verlhac^{1,*}

¹Division Méiotiques

²Division Biologie Moléculaire et Cellulaire
du Développement

UMR 7622

Centre National de la Recherche Scientifique
Université Pierre et Marie Curie

75252 Paris, cedex 05

France

³Research Institute of Molecular Pathology (IMP)

Dr. Bohr-Gasse 7

1030 Vienna

Austria

Summary

Faithful segregation of homologous chromosomes during the first meiotic division is essential for further embryo development. The question at issue is whether the same mechanisms ensuring correct separation of sister chromatids in mitosis are at work during the first meiotic division. In mitosis, sister chromatids are linked by a cohesin complex holding them together until their disjunction at anaphase [1–6]. Their disjunction is mediated by Separase, which cleaves the cohesins [7, 8]. The activation of Separase requires prior degradation of its associated inhibitor, called securin [9, 10]. Securin is a target of the APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), a cell cycle-regulated ubiquitin ligase that ubiquitinates securin at the metaphase-to-anaphase transition and thereby targets it for degradation by the 26S proteasome [11–14]. After securin degradation, Separase cleaves the cohesins and triggers chromatid separation, a prerequisite for anaphase. In yeast and worms, the segregation of homologous chromosomes in meiosis I depends on the APC/C and Separase activity. Yet, it is unclear if Separase is required for the first meiotic division in vertebrates because APC/C activity is thought to be dispensable in frog oocytes. We therefore investigated if Separase activity is required for correct chromosome segregation in meiosis I in mouse oocytes.

Results and Discussion

We show here for the first time that segregation of homologous chromosomes in meiosis I requires the 26S proteasome and Separase activities in mouse oocytes. In *X. laevis* oocytes, reduction of APC/C-mediated proteolysis by several means (treatment with the protea-

some inhibitor MG132, microinjection of antibodies against the APC/C activator fizzy, depletion of fizzy by antisense injection, microinjection of antibodies against the APC/C core subunit Cdc27, injection of the APC/C inhibitor Mad2, and injection of undegradable securin) has no effect on the metaphase-to-anaphase transition in meiosis I, and oocytes are able to segregate their homologous chromosomes normally without degradation of cyclin B and securin, whereas reduction of APC/C-mediated proteolysis in meiosis II prevents the metaphase-to-anaphase transition [15, 16]. On the other hand, previous observations suggested that the APC/C may be required for the metaphase I-to-anaphase I transition in mouse oocytes. In mitosis, ubiquitination by the APC/C and subsequent degradation of B-type cyclins causes MPF activity to disappear, a prerequisite for the exit of mitosis. During meiotic maturation, MPF activity is highest in metaphase I (MI), drops as oocytes exit meiosis I, increases again, and peaks in metaphase of meiosis II (Figure 1). In mouse oocytes, overexpression of cyclin B1 leads to an arrest in metaphase I [17], suggesting that degradation of cyclin B1 is required for the metaphase-to-anaphase transition in mouse oocytes and/or that the APC/C can be saturated by an excess of its substrate. Furthermore, overexpression of a component of the spindle checkpoint, Mad2, which interacts with and inhibits the APC/C in mitosis and therefore induces a metaphase arrest, causes a metaphase I arrest in meiosis (K.W., submitted).

Immature mouse oocytes can be induced to undergo meiosis I synchronously and then arrest in metaphase II in culture (Figure 1). To determine whether degradation of key substrates by the 26S proteasome was required for the first meiotic transition, immature oocytes were allowed to progress into prometaphase I (to avoid the observation of effects unrelated to the metaphase-to-anaphase transition) and were then treated for 5–6 hr with the 26S proteasome inhibitor MG132. Whereas control oocytes underwent the metaphase-to-anaphase transition of meiosis I normally and extruded their first polar body (Figures 2A and 2C), MG132-treated oocytes arrested in metaphase I (Figure 2C) with high levels of MPF activity (Figure 2D), a high cyclin B1 level (Figure 2E), a metaphase I spindle that has migrated to the cortex, and chromosomes aligned on the metaphase plate (Figure 2B). Therefore, these data suggest that 26S proteasome activity is required for the metaphase-to-anaphase transition in meiosis I (Figure 1).

The segregation of homologous chromosomes during the first meiotic division requires prior resolution of the chiasmata. In *S. cerevisiae* and *C. elegans*, resolution of chiasmata depends on the cleavage of a meiosis-specific cohesin, Rec8 [18, 19]. At the metaphase I-to-anaphase I transition, Rec8 is cleaved by Separase along chromosome arms but is resistant to proteolytic cleavage in the vicinity of centromeres. Rec8 located in the centromeric region will be further cleaved by Separase at the metaphase II-to-anaphase II transition [18, 20]. Similarly to mitosis, it is the activation of APC/C in metaphase I that

*Correspondence: marie-helene.verlhac@snv.jussieu.fr

⁴These authors contributed equally to this work.

⁵Present address: Boehringer Ingelheim Austria, Dr. Boehringer-Gasse 5-11, 1121 Vienna, Austria.

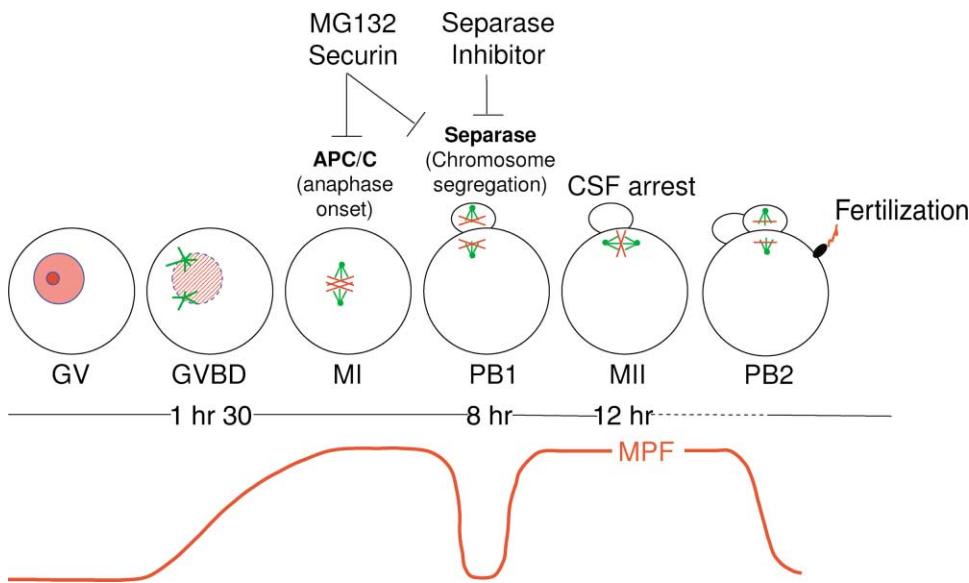


Figure 1. Meiotic Maturation of Mouse Oocyte

Mouse oocytes are arrested in prophase I in the ovaries and harbor a large nucleus (in pink) called the germinal vesicle. Meiosis resumption starts with the Germinal Vesicle BreakDown (GVBD), followed by a long prometaphase I in which chromosomes become condensed (red hatching) and in which spindle formation occurs (green). After separation of homologous chromosomes and first polar body extrusion (PB1), meiosis II starts without DNA replication and oocytes arrest in metaphase II. This block is called the CSF (Cytostatic Factor) arrest and will be bypassed by fertilization, which allows separation of sister chromatids. MPF activity appears in red. The stages at which MG132, the Separase inhibitor, and securin will act are indicated on the scheme.

triggers securin degradation, Separase activation, and hence homologous chromosome segregation after Rec8 cleavage [21–23].

To determine whether chromosome segregation in

meiosis I in mouse oocytes is regulated by a mechanism similar to that in *S. cerevisiae* and *C. elegans*, we injected mouse immature oocytes with a Separase inhibitor [24]. This inhibitor is a derivative of the human cohesin Scc1

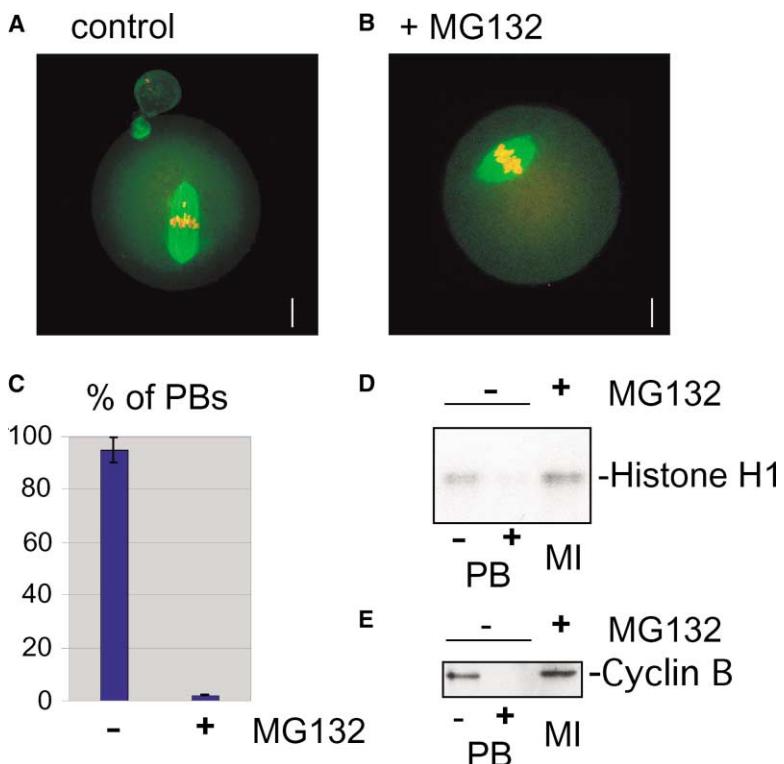


Figure 2. Mouse Oocytes Arrest in Metaphase I upon Treatment with MG132

Mouse oocytes were treated with 5 μ M MG132 for 5–6 hr in prometaphase I where indicated.

(A and B) Oocytes were analyzed by confocal microscopy. Microtubules appear in green; chromosomes appear in red. The scale bar represents 10 μ m.

(C) Percentage of polar body (PB) extrusion with or without MG132 treatment.

(D) In vitro kinase assay showing MPF activity in oocytes before and after polar body extrusion (\pm PB, 8 hr after GVBD) and MG132 treatment with Histone H1 as a substrate.

(E) Western blot visualizing the levels of cyclin B1 in oocytes as in (D).

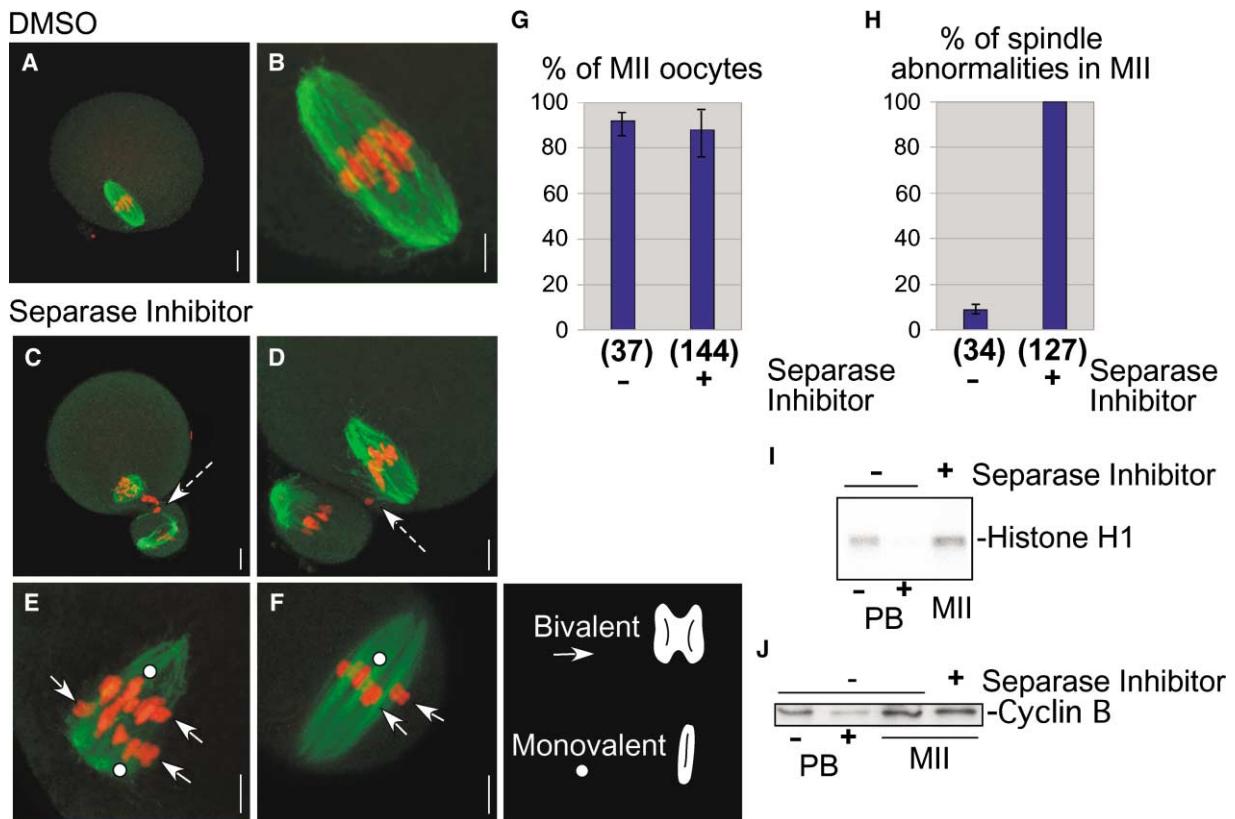


Figure 3. Aberrant Homologous Chromosome Segregation due to Microinjection of a Separase Inhibitor in Mouse Oocytes

(A–F) Mouse oocytes were microinjected with 20 mM Separase inhibitor or DMSO (at the same dilution) as indicated. Oocytes injected with (A and B) DMSO or with the (C–F) Separase inhibitor were analyzed by confocal microscopy. (C) and (D) show examples of cut phenotype. (E) and (F) show a mix of homologous chromosomes and sister chromatids (arrow and spot). Microtubules appear in green; chromosomes appear in red. The scale bar represents 10 μ m.

(G) Percentage of oocytes that went to metaphase II (MII) after injection of DMSO alone (−) or after injection of the Separase inhibitor (+). (H) Percentage of spindle abnormalities in metaphase II oocytes after injection of DMSO alone (−) or after injection of the Separase inhibitor (+). For (G) and (H) the number in parentheses corresponds to the number of injected oocytes.

(I) In vitro kinase assay showing MPF activity in oocytes injected with DMSO before or after polar body extrusion (±PB; 8 hr after GVBD) and in oocytes injected with the Separase inhibitor collected 14 hr after GVBD (MII).

(J) Western blot visualizing the levels of cyclin B1 in oocytes as in (I). The white arrows point to bivalent chromosomes from metaphase I that have not been segregated during the MI-to-MII transition.

cleavage site peptide and covalently binds to the active site of Separase. Control oocytes injected with a control FLAG peptide at 20 mM (data not shown) or diluted DMSO, the solvent of the drug, progressed through meiotic maturation normally. They extruded their first polar body and arrested in metaphase II with chromosomes aligned on the metaphase plate and a barrel-shaped spindle (Figures 3A, 3B, and 3G). Oocytes injected with the Separase inhibitor also extruded their first polar body with a percentage close to that of control oocytes (Figure 3G). They formed normal first meiotic spindles (data not shown). However, chromosome segregation was completely aberrant, with a mix of homologous chromosomes and sister chromatids in metaphase II (Figures 3E and 3F). Furthermore, some of them (15%) harbored chromosomes lagging between the oocyte and the first polar body (Figures 3C and 3D); this finding suggests that segregation did not occur normally. This phenotype, evoking the cut phenotype of fission yeast (for a review, see [25]), is reported here for the first time

in mouse oocytes. Consistent with a missegregation event, oocytes injected with the Separase inhibitor showed a perturbed metaphase II spindle organization with misaligned chromosomes and spindles that were not barrel shaped (Figure 3, compare [B] and [E] or [F] and Figure 3H). These oocytes were indeed in metaphase II since they had extruded their first polar body and showed high MPF activity and high levels of cyclin B1 (Figures 3I and 3J). Our results demonstrate that inhibition of Separase perturbed the metaphase I-to-II transition and strongly suggest that Separase activity is required for correct chromosome segregation in meiosis I (Figure 1).

To further show that Separase activity is required for proper segregation of homologous chromosomes during the metaphase I-to-anaphase-I transition, we over-expressed its protein inhibitor, securin. 70% of oocytes microinjected with mRNA encoding securin arrested in metaphase I (Figures 4B and 4G) with high MPF activity (Figure 4I) and high cyclin B1 levels (Figure 4J). Chromo-

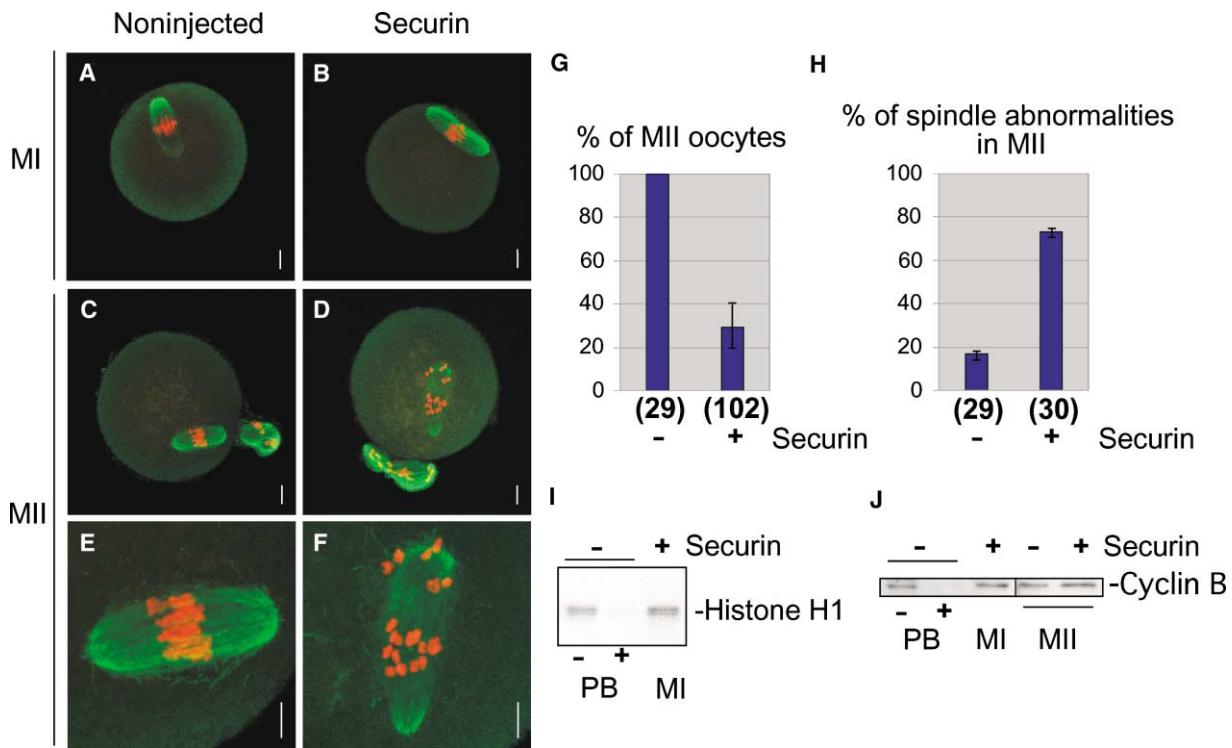


Figure 4. Mouse Oocytes Arrest in Metaphase I upon Microinjection of the RNA Encoding the Securin

(A–F) Mouse oocytes were microinjected or not with the RNA encoding the securin. Oocytes injected (B, D, and F) or not (A, C and E) with securin were analyzed by confocal microscopy; Microtubules appear in green; chromosomes appear in red. The scale bar represents 10 μ m.

(G) Percentage of oocytes that went to metaphase II (MII) without (–) or with (+) injection of securin.

(H) Percentage of spindle abnormalities in oocytes that went to MII after injection (+) or not (–) of the securin. For (G) and (H) the number in parentheses corresponds to the number of injected oocytes.

(I) In vitro kinase assay showing MPF activity in noninjected oocytes before or after polar body extrusion (\pm PB, 8 hr after GVBD) and in oocytes injected with securin collected at the same time.

(J) Western blot visualizing the levels of cyclin B1 in oocytes as in (I) and in oocytes in MII (14 hr after GVBD) that were injected (+) or not (–) with the securin.

somes were aligned on the metaphase plate, and the spindle had migrated to the cortex (Figure 4B). Most (73%) of the remaining 30% that extruded the first polar body and progressed into metaphase II harbored abnormal metaphase II spindles with misaligned chromosomes (Figures 4D, 4F, and 4H). Therefore, overexpression of securin was more efficient than injection of a synthetic Separase inhibitor and blocked the metaphase I-to-anaphase I transition. Indeed, securin is a very potent molecule since it can bind and inhibit Separase molecules that have already been activated [24]. The Separase inhibitor may not be efficient at 100% on all homologous chromosomes, and it is possible that the force of the meiosis I spindle is strong enough to tear apart chromosomes that are still held together by cohesins; this tearing may result in the missegregation events observed. Moreover, the arrest of mouse oocytes in metaphase I by overexpression of securin is the result of both efficient Separase inhibition and saturation of the APC/C, which normally triggers securin and cyclin B degradation at the metaphase-to-anaphase transition (Figure 1). Differently, in *X. laevis* oocytes, the injection of a nondegradable securin efficiently blocks cyclin B degradation but does not prevent first polar body extrusion [15]. As mentioned above, a metaphase I arrest is

also observed in mouse oocytes after overexpression of cyclin B1 and of the APC/C inhibitor Mad2 ([17]; K.W., submitted). Very recently it has been shown that Rec8 localization is regulated similarly to yeast Rec8 during male meiosis in the mouse [26]. Altogether, previous observations and the work presented here suggest that segregation of homologous chromosomes during the first meiotic division in mouse oocytes depends on a mechanism similar to the one acting during meiosis in *S. cerevisiae* and *C. elegans*: an APC/C-dependent degradation of securin that triggers Separase activation and subsequent cohesin cleavage.

How can we reconcile the requirement for APC/C during the first meiotic division in yeast, *C. elegans*, and now mouse and its apparent nonrequirement in *X. laevis*? The *X. laevis* oocyte is giant compared to a mouse oocyte (1000 times bigger), but the spindle is approximately the same size in both. One possibility seems that, for technical reasons, experiments that have been performed in *X. laevis* oocytes do not affect the localized active pool of APC/C in meiosis I. This would be similar to the situation previously encountered in which the early syncytial divisions of *D. melanogaster* embryos occurred without detectable oscillations in the total cyclin levels or Cdk1 activity [27]. However, it is now

established that local Cdk1 inactivation takes place near the spindle poles of syncytial embryos [28]. Alternatively, *X. laevis* may have evolved differently from other organisms and may have built a specific pathway, independent of the APC/C, to control homologous chromosome segregation in meiosis I.

Conclusions

Our results are in accordance with studies in *S. cerevisiae* and *C. elegans* but are contrary to what has been shown in another vertebrate species, *X. laevis*. The APC/C is required for the activation of Separase by targetting its inhibitor, securin, for degradation by the 26S proteasome. We propose here that the meiosis I-to-II transition in mouse oocytes also depends on APC/C activity, as has been shown in *S. cerevisiae* and *C. elegans*. In human oocytes, missegregation events in meiosis I are responsible for the generation of aneuploidies, which may lead to trisomies, malformations of the embryo, and spontaneous abortion. Therefore, it is of great importance to know the mechanisms controlling meiosis I. This study gives important insights into our understanding of the regulation of correct chromosome segregation in meiosis I in mammalian oocytes.

Experimental Procedures

Immature oocytes arrested in prophase I of meiosis were obtained by removing ovaries from 11-week-old OF1 female mice. Oocytes were removed and cultured as previously described [29]. For experiments with MG132, oocytes were treated with 5 μ M MG132 (stock solution at 50 mM in DMSO) 5 hr after Germinal Vesicle Breakdown for 5–6 hr. Control oocytes were treated with DMSO diluted 1:10,000 in culture medium.

The pRN3Myc2securin was constructed by PCR amplification of mSecurin and subcloning at EcoR1/Not1 sites. In vitro synthesis of capped RNA was performed by using linearized pRN3Myc2securin with the mMessage mMachine kit (Ambion). The capped RNA were then purified on RNeasy columns (Qiagen) and eluted in water at a final concentration of 0.5 μ g/ μ l. Aliquots were then stored at –80°C. The Separase inhibitor (stock solution 100 mM in DMSO) was diluted at a concentration of 20 mM in the injection buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA [pH 7.4]). As a control, we injected DMSO at the same dilution (1:5 in the injection buffer) and a FLAG peptide (stock solution 100 mM in DMSO) diluted at a concentration of 20 mM in the injection buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA [pH 7.4]). Microinjection into mouse oocytes was performed as described [30]. Immunofluorescent staining of microtubule and chromosomes was performed as described in [31]. The Histone H1 kinase assays were performed as described in [32], and cyclin B1 immunoblotting was performed as described in [31].

Acknowledgments

We thank Kim Nasmyth for suggesting the injection of the Separase inhibitor into mouse oocytes and Sara B.C. Buonomo for her help at the beginning of this project. We thank Julien Dumont for critical reading of the manuscript. We also thank Richard Schwartzmann (CNRS) for his help with confocal microscopy. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC4717 to M.-H.V.) and from the Action Concertée Incitative (ACI 0220435) jeune chercheur to M.-H.V. M.E.T. is a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Education et de la Recherche Technologique. K.W. is the recipient of a European Community Marie Curie Fellowship (HPMF-CT-2000-00880).

Received: July 11, 2003

Revised: August 25, 2003

Accepted: August 28, 2003

Published: October 14, 2003

References

- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35–45.
- Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47–57.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* **12**, 1986–1997.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., and Nasmyth, K. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* **13**, 320–333.
- Darwiche, N., Freeman, L.A., and Strunnikov, A. (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* **233**, 39–47.
- Sumara, I., Vorlauffer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., Peters J.-M. (2000). Characterization of the vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J. Cell Biol.* **151**, 749–762.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375–386.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.-M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399–410.
- Zou, H., McGarry, T.J., Bernal, T., and Kirschner, M.W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418–422.
- Jallepalli, P.V., Waizenegger, I.C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M.R., Peters, J.-M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* **105**, 445–457.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* **10**, 3081–3093.
- Funabiki, H., Yamanaka, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438–441.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067–1076.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **13**, 2039–2058.
- Peter, M., Castro, A., Lorca, T., Peuch, C.L., Magnaghi-Jaulin, L., Doree, M., and Labbe, J.C. (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes. *Nat. Cell Biol.* **3**, 83–87.
- Taieb, F.E., Gross, S.D., Lewellyn, A.L., and 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**, 508–513.
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.-E., and Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.* **132**, 400–413.
- Buonomo, S.B., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**, 387–398.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D., and Loidl, J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesin protein with functions in meiosis chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev.* **15**, 1349–1360.
- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**, 461–464.

21. Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A.M., and Greenstein, D. (2000). EMB-30: an APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1401–1419.
22. Golden, A., Sadler, P.L., Wallenfang, M.R., Schumacher, J.M., Hamill, D.R., Bates, G., Bowerman, B., Seydoux, G., and Shakes, D.C. (2000). Metaphase to anaphase (mat) transition-defective mutants in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **151**, 1469–1482.
23. Siomos, M.F., Badrinath, A., Pasierbek, P., Livingstone, D., White, J., Glotzer, M., and Nasmyth, K. (2001). Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 1825–1835.
24. Waizenegger, I.C., Gimenez-Abian, J.F., Wernic, D., and Peters, J.-M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol.* **20**, 1368–1378.
25. Yanagida, M. (1998). Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. *Trends Cell Biol.* **8**, 144–149.
26. Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* **116**, 2781–2790.
27. Edgar, B.A., Sprenger, F., Duronio, R.J., Leopold, P., and O'Farrell, P.H. (1994). Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **15**, 440–452.
28. Su, T.T., Sprenger, F., Digregorio, P.J., Campbell, S.D., and O'Farrell, P.H. (1998). Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation. *Genes Dev.* **15**, 1495–1503.
29. Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W.H., Evans, M.J., and Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* **122**, 815–822.
30. Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Kubiak, J.Z., Umbhauer, M., Rassiner, P., Colledge, W., and Maro, B. (2000). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* **19**, 6065–6074.
31. Lefebvre, C., Terret, M.-E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B., and Verlhac, M.-H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.* **157**, 603–613.
32. Kubiak, J.Z., Weber, M., de Pennart, H., Winston, N., and Maro, B. (1993). The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J.* **12**, 3773–3778.

Note Added in Proof

The manuscript by K.W. that is cited as submitted on the first page of this manuscript is now in press: K. Wassmann, T. Niault, and B. Maro (2003). Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. *Curr. Biol.* **13**, 1596–1608.

ARTICLE 2

DOC1R: a MAP kinase substrate that controls microtubule organization of metaphase II mouse oocytes

Terret M.E, Lefebvre C, Djiane A, Rassinier P, Moreau J, Maro B, Verlhac M.-H.

Development 2003. 130: 5169-5177

Situation du sujet

A la fin de la maturation méiotique, l'ovocyte reste bloqué en métaphase de seconde division de méiose, en attente de la fécondation. Cet arrêt est caractéristique des ovocytes de vertébrés et est dû à une activité CSF (CytoStatic Factor, Masui and Markert, 1971) dont la composition moléculaire n'est pas totalement connue à ce jour. Néanmoins la voie Mos/.../MAPK est essentielle à cet arrêt.

Afin d'identifier des régulateurs ou cibles de la voie Mos/.../MAPK, nous avons effectué un crible double-hybride avec la MAPK ERK2 de rat comme appât. Un des clones positifs isolés était DOC1R (Deleted in Oral Cancer 1 Related). Mon travail s'est concentré sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette protéine au cours de la maturation méiotique chez la souris.

Résultats principaux

1. Le crible double-hybride

Une banque d'ADNc d'ovocytes de souris au stade GV a été réalisée. Cette banque est la première de ce type pour l'ovocyte de souris et a nécessité 2000 ovocytes, chaque ovocyte de souris contenant 0,7pg d'ARN polyA. Chez la souris, la reprise de l'expression zygotique a lieu au stade deux cellules. Les ARNm présents dans l'ovocyte en prophase servent donc à la maturation méiotique et à la première division zygotique essentiellement, permettant donc l'obtention d'une banque très spécifique représentative des ARNm servant uniquement au cours de la maturation méiotique. La banque a été criblée en utilisant la MAP Kinase ERK2 de rat comme appât. A partir de 10^7 transformants, 133 clones réellement positifs ont été obtenus, dont deux clones différents ressortaient très fréquemment. Un clone correspond à l'homologue murin d'un gène humain suppresseur de tumeur, mDOC1R (Deleted in Oral Cancer-1 Related), et l'autre clone à une protéine inconnue, MISS (MAPK Interacting and Spindle Stabilizing).

Afin de vérifier l'interaction de DOC1R avec la MAPK, des expériences de co-immunoprecipitation ont été réalisées dans des ovocytes de xénope, système plus approprié que l'ovocyte de souris pour ce type d'expériences biochimiques. Des ARNm produits *in vitro* codant pour MISS et DOC1R fusionnées à un épitope Myc ont été microinjectés dans des ovocytes de xénope. Ces protéines fusionnées sont capables de co-immunoprecipiter avec

la MAPK endogène d'extraits d'ovocytes de xénope, indiquant que ce sont des vrais partenaires de la MAPK.

2. Structure de DOC1R

La séquence de DOC1R est peu informative. Elle est riche en résidus proline dans sa partie N-terminale et possède trois sites potentiels de phosphorylation par la MAPK. De plus elle possède deux domaines de liaison potentiels aux CDK/Cyclines et à CDK2. Il existe des homologues de DOC1R chez le nématode, le poulet, le xénope et l'homme.

3. Régulations post-traductionnelles de DOC1R au cours de la maturation méiotique

Pour les analyses biochimiques, j'ai fait produire un anticorps dirigé contre un peptide présent dans DOC1R. J'ai détecté spécifiquement la protéine DOC1R endogène dans les ovocytes en métaphase II par immunotransfert. Cependant, mon anticorps s'est avéré peu sensible et je n'ai pas pu m'en servir en routine dans cette étude réalisée dans un modèle biologique peu adapté pour les études biochimiques sans outils performants (23 ng de protéines totales par ovocyte). J'ai donc réalisé mes expériences avec une protéine exogène DOC1R étiquetée Myc ou GFP. J'ai ainsi montré que DOC1R est régulée au cours de la maturation méiotique. DOC1R est présente dans les ovocytes en GV et subit des modifications post-traductionnelles dès GVBD, migrant à un poids moléculaire apparent supérieur à celui de la protéine présente dans les ovocytes immatures. Cette forme retardée sur gel se maintient depuis GVBD jusqu'en métaphase II. Ce retard de migration sur gel est dû à des phosphorylations car un traitement à la phosphatase λ sur des ovocytes en métaphase II permet de retrouver le poids moléculaire apparent de la forme présente dans les ovocytes immatures. De plus, ces phosphorylations peuvent être en partie attribuées au MPF et à la MAPK car ces deux kinases phosphorylent *in vitro* la protéine DOC1R purifiée. Cela est cohérent avec l'existence d'un site potentiel de liaison aux Cyclines/CDK et de 3 sites potentiels de phosphorylation par la MAPK dans la séquence de la protéine DOC1R; de plus DOC1R subit un retard électrophorétique dès GVBD où le MPF est activé mais pas les MAPK. La voie Mos/.../MAPK est en partie impliquée *in vivo* dans ces phosphorylations: la migration électrophorétique en gel à une et deux dimensions de DOC1R est différente dans les ovocytes en métaphase II de souris Mos-/ qui ne présentent pas d'activé MAPK.

DOC1R est donc régulée de manière post-traductionnelle au cours de la maturation méiotique, potentiellement par le MPF et par les MAPK.

4. Localisation et fonction de DOC1R au cours de la maturation méiotique

A l'aide de mon anticorps spécifique de DOC1R j'ai déterminé la localisation de la protéine endogène par immunofluorescence. DOC1R est présente dans les ovocytes immatures dans le noyau, puis elle suit les microtubules tout au long de la maturation méiotique, se localisant en particulier sur les fuseaux méiotiques de métaphase I et II; ces changements de localisation ont été confirmés par l'utilisation d'un construit DOC1R-GFP.

Parallèlement, j'ai entrepris une approche fonctionnelle par microinjection d'ARN antisens ou double-brins dans les ovocytes afin d'inhiber la traduction de la protéine DOC1R. La déplétion de l'ARNm DOC1R endogène par RNAi est très efficace en seconde division de méiose (vérification sur la protéine endogène) et conduit à des phénotypes sévères en métaphase II: des fuseaux enrichis de microtubules astériens et la nucléation abondante d'asters de microtubules dans le cytoplasme. Cela suggère que DOC1R contrôle la dynamique des microtubules en métaphase II, ce qui est en accord avec la localisation de la protéine endogène. Les ARN double-brins n'étant pas totalement efficaces en métaphase I, nous ne pouvons pas présager du rôle potentiel de DOC1R au cours de la première division méiotique. Le phénotype obtenu en métaphase II est spécifique puisque la co-injection d'ARN double-brins ciblant DOC1R endogène et d'ARNm sens codant pour l'homologue xénope de DOC1R cloné au laboratoire restaure l'arrêt en métaphase II, avec des fuseaux sans microtubules astériens et sans asters de microtubules dans le cytoplasme.

Ces résultats montrent que DOC1R est présente tout au long de la maturation méiotique, associée à une localisation microtubulaire et que son rôle serait de contrôler la dynamique des microtubules au cours de la maturation méiotique au moins en métaphase II au cours de l'arrêt CSF.

Conclusions

DOC1R est un substrat des MAPK lors de la maturation méiotique chez la souris. Elle est présente tout au long de la maturation méiotique, associée à une localisation microtubulaire. Elle contrôlerait la dynamique des microtubules au cours de la maturation méiotique au moins en métaphase II au cours de l'arrêt CSF.

DOC1R: a MAP kinase substrate that controls microtubule organization of metaphase II mouse oocytes

M. Emilie Terret¹, Christophe Lefebvre¹, Alexandre Djiane¹, Pascale Rassinier¹, Jacques Moreau², Bernard Maro¹ and Marie-Hélène Verlhac^{1,*}

¹UMR 7622, CNRS, Université Paris VI, 9 quai Saint Bernard, Bat. C, 75252 Paris, cedex 05, France

²Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris VII, 2 place Jussieu, 75251 Paris, cedex 05, France

*Author for correspondence (e-mail: marie-helene.verlhac@snv.jussieu.fr)

Accepted 10 July 2003

Development 130, 5169–5177

© 2003 The Company of Biologists Ltd

doi:10.1242/dev.00731

Summary

For the success of fertilization, spindles of vertebrate oocytes must remain stable and correctly organized during the arrest in metaphase II of meiosis. Using a two-hybrid screen with MAPK as a bait, we have recently identified MISS (MAPK interacting and spindle stabilizing) which controls mouse oocyte metaphase II spindle stability. Using the same screen, we identify another MAPK partner, DOC1R (Deleted in oral cancer one related), a murine homologue of a potential human tumor suppressor gene. We characterize DOC1R during mouse oocyte meiosis resumption. DOC1R is regulated by phosphorylation during meiotic maturation by MPF (M-phase promoting factor) and by the MOS.../MAPK pathway. DOC1R and a DOC1R-GFP fusion localize to microtubules during

meiotic maturation. Consistent with this microtubular localization, we show, by antisense and double-stranded RNA injection, that depletion of DOC1R induces microtubule defects in metaphase II oocytes. These defects are rescued by overexpressing a *Xenopus* DOC1R, showing that they are specific to DOC1R. Thus, the discovery of DOC1R, a substrate of MAPK that regulates microtubule organization of metaphase II mouse oocytes, reinforces the importance of this pathway in the control of spindle stability during the metaphase II arrest.

Key words: DOC1R, MAPK, Mouse meiotic maturation, Microtubules

Introduction

After ovulation, mouse oocytes arrest for several hours in metaphase II (MII) of the second meiotic division with a stable spindle. Typically, mouse meiotic spindles are barrel shaped and are devoid of astral microtubules. These meiotic spindles organize from MTOCs (microtubule organizing centers) that lack centrioles. During the arrest in metaphase II, chromosomes remain aligned on the metaphase plate, waiting for fertilization to trigger chromosome segregation. Not much is known about the precise mechanisms that allow the second meiotic spindle to remain correctly organized during the so-called CSF (cytostatic factor) (Masui and Markert, 1971) arrest in metaphase II of vertebrate oocytes. This CSF arrest is mediated by the MOS.../MAPK (mitogen activated protein kinase) pathway and has been mainly studied on the aspect of MPF (M-phase promoting factor) (Masui and Markert, 1971) stabilization. Indeed, during the metaphase II arrest, MPF (a complex between CDC2 and cyclin B) levels remain high, owing to the CSF activity generated by the MOS.../MAPK pathway (Colledge et al., 1994; Dupre et al., 2002; Haccard et al., 1993; Hashimoto et al., 1994; Nebreda and Hunt, 1993; Posada et al., 1993; Verlhac et al., 1996). In *Xenopus* oocytes, MAPK phosphorylates p90rsk which in turns phosphorylates Bub1, which would inhibit the APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) to target cyclin B for degradation therefore maintaining a high MPF activity (Gross et al., 1999;

Gross et al., 2000; Tunquist et al., 2002). However, the MOS.../MAPK pathway also controls microtubule organization, as mouse *Mos*^{-/-} oocytes are not arrested in metaphase II, instead they activate spontaneously and remain arrested in a third metaphase with monopolar spindles (Verlhac et al., 1996). Furthermore, using a two-hybrid screen with MAPK as a bait on a mouse oocyte cDNA library, we have recently identified MISS (MAPK interacting and spindle stabilizing) a substrate of the MOS.../MAPK pathway which mediates metaphase II spindle stability during the CSF arrest (Lefebvre et al., 2002). For the success of fertilization and future embryo development, it is therefore a key issue to understand at a cellular level how the MOS.../MAPK pathway maintains a spindle correctly organized in metaphase II.

We describe the isolation of another MAPK partner using the same two-hybrid screen: DOC1R (D19ERTD144E – Mouse Genome Informatics), a murine homologue of a potential human tumor suppressor gene DOC1R (deleted in oral cancer one related) (Zhang et al., 1999). Until now, little was known about this protein that has been found on the basis of its homology with human DOC1, a human tumor suppressor gene (Todd et al., 1995). DOC1R is related to a coiled-coil region of a kinesin (KIF14) of unknown function. Like MISS, DOC1R is rich in proline residues in its N terminus. DOC1R has a perfect consensus site for MAPK phosphorylation, a potential CDK2 binding site and a potential cyclin/CDK binding site (Zhang et al., 1999). We show here that DOC1R

has been conserved from *Xenopus laevis* to human, which suggests that it performs important functions in vertebrate species. In mouse oocytes, DOC1R is present at all stages of meiotic maturation and is regulated by multiple phosphorylations. Both cyclin B/CDC2 and MAPK are able to phosphorylate DOC1R in vitro, and the MOS.../MAPK pathway phosphorylates DOC1R in vivo. This protein is localized in dots on microtubules especially on metaphase I and II spindles. Consistently, a DOC1R-GFP fusion localizes to the metaphase II spindle. The depletion of DOC1R by microinjection of antisense (asRNA) or double-stranded (dsRNA) RNA directed against its endogenous mRNA has a strong effect on the metaphase II spindle morphology. Injected oocytes harbor spindles with astral microtubules, as well as numerous asters in the cytoplasm, suggesting that DOC1R regulates microtubule organization during the CSF arrest of metaphase II oocytes. We show that this phenotype is specific to DOC1R as it can be rescued by the overexpression of the *Xenopus* protein. Thus, we have discovered a new class of proline-rich proteins, MISS and DOC1R, substrates of MAPK that regulate microtubule organization during the CSF arrest of mouse oocytes.

Materials and methods

Collection and culture of mouse oocytes

Immature oocytes arrested in prophase I of meiosis were obtained by removing ovaries from 11-week-old OF1 and *Mos*^{-/-} female mice. Oocytes were removed and cultured as previously described (Verlhac et al., 1996). Nocodazole was diluted in the culture medium at 10 µM.

Two-hybrid screen

The two-hybrid screen was performed as previously described (Lefebvre et al., 2002).

RT-PCR assay

For preparing RNA from mouse ovaries, total RNA were extracted using the Rneasy mini Kit (Qiagen). Immature mouse oocytes were lysed in PBS without total RNA extraction. Then 500 ng of RNA from ovaries, or 30 immature oocytes in sterile PBS were treated with 2 U of RQ1 DNase (Promega) for 20 minutes at 37°C and heated for 5 minutes at 85°C. The first strand cDNA synthesis was performed with 50 U of MmuLV Superscript (Life Technologies) using 2.5 µM random hexamer (pdN6, Pharmacia), 1 mM dNTPs

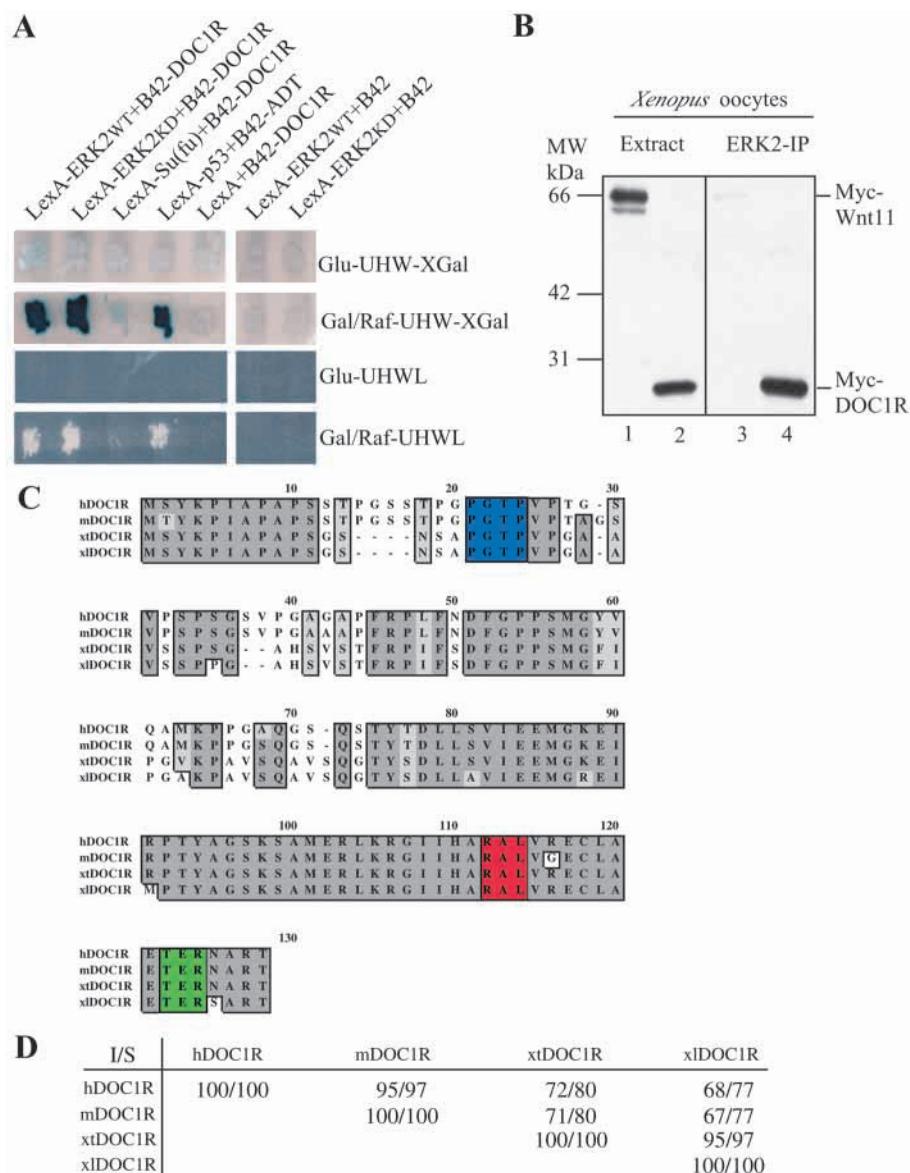


Fig. 1. Interaction between DOC1R and MAPK; alignments of DOC1R sequences. (A) Two-hybrid interaction between DOC1R and MAPK. DOC1R interacts with ERK2WT and ERK2KD but not with the negative control Su(Fu). Yeast strains transformed with LexA-ERK2WT, LexA-ERK2KD (Waskiewicz et al., 1997), LexA-53 (positive control), LexA-Su(Fu) or LexA alone were mated with yeast strains transformed respectively with the B42-DOC1R, B42-AD-T (positive control), or empty B42. The diploids obtained were tested for transactivation of both the β-galactosidase and the LEU2 reporter genes on glucose (Glu)- or galactose (Gal/Raf)-containing media. The B42-DOC1R fusion protein clearly interacts both with LexA fusions of ERK2WT and ERK2KD as strongly as the positive control, whereas it does not interact with the negative control Su(Fu). (B) DOC1R co-immunoprecipitates with endogenous p42^{mapk} (ERK2) from immature *Xenopus* oocyte extracts. Lanes 1 and 2: total immature *Xenopus* oocyte extracts expressing either MYC-WNT11 (*Xenopus* WNT11, a negative control, lane 1) or MYC-DOC1R mRNA (lane 2). Lanes 3 and 4: anti-p42^{mapk} (ERK2) immunoprecipitates prepared from the MYC-WNT11 (lane 3) and MYC-DOC1R (lane 4) expressing oocyte lysates. All samples were analysed by immunoblotting using the anti-MYC antibody. This experiment was repeated twice. (C) Amino acid sequence alignments of the DOC1R protein from different vertebrate species. DOC1R is rich in proline in its N-terminal end and contains one potential MAPK phosphorylation site (blue), one CDK2 binding site (red) and one cyclin/CDK-binding site (green). (D) Percentage of identities (I) and similarities (S) between the amino acid sequences of DOC1R from different vertebrate species (h, human; m, mouse; xt, *Xenopus tropicalis*; xl, *Xenopus laevis*).

(Promega), in 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl for 1 hour at 37°C, followed by 5 minutes at 95°C. The PCR amplification was performed using 5'-ATGCCTCGAGATGACG-TACAAGCCAATCGC and 5'-ATGCGAATTCCCGTGCAGGCA-TTGCCTCT primers, at 55°C for 30 cycles.

Plasmid construction and in vitro synthesis of capped RNA, asRNA and dsRNA

The pRN3MYC2-DOC1R was constructed by RT-PCR amplification of the DOC1R open reading frame from RNA isolated from mouse ovaries. Total RNA were extracted using the Rneasy Mini Kit (Qiagen). The reverse transcription was performed on 500 ng of RNA. The PCR amplification was done on 50 ng of RNA/DNA using 5'-GATCGAATTTCATGWSNTAYAARCCNATHGCN and 5'-GATC-GCGGCCGCTTACGTGCAGGCAATTGCGTTC primers. The PCR product was then cloned into the pRN3MYC2 vector. The pRN3DOC1R-GFP was obtained by PCR subcloning at *Xba*I/*Eco*RI sites using 5'-ATGCCTCGAGATGACGTACAAGCCAATCGC and 5'-ATGCGAATTCCCGTGCAGGCAATTGCGTCT primers. The pET-DOC1R plasmid was constructed by subcloning at *Eco*RI/*Nol*I sites into the pET30a vector (Novagen). The DOC1R protein expressed from the pET30a vector contains a 6His repeat inside 51 additional amino acids, which makes it bigger of about 5 kDa.

The *Xenopus* cDNA was isolated from the *Xenopus* oocyte cDNA library (Iouzalem et al., 1998) by PCR using the 5'-ATGCGA-ATTCACTGCTATAAACCAT and 3'-ATGCGCAGGCCATG-TGCAGGCACTGCGTTCTGT primers on 200 ng of library. The PCR product was further cloned into pRN3 at the *Eco*RI/*Nol*I sites.

The in vitro synthesis of capped RNA, asRNA and dsRNA was performed using linearized plasmids with the mMessage mMachine kit for capped RNAs (Ambion) or with the Megascript Kit for as and dsRNA (Ambion). The capped RNAs and asRNA were then purified on RNeasy columns (Qiagen) and eluted in the injection buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) at a final concentration of 0.5 µg/µl. Aliquots were then stored at -80°C. For the production of dsRNA, each strand of complementary RNA was first precipitated with ethanol then washed in phenol/chloroform and further incubated at 85°C for 5 minutes. After annealing for 3 hours at 37°C, 4 µl aliquots of dsRNA were stored at -80°C.

Microinjection of synthetic RNA

Microinjection into mouse oocytes was performed as described (Verlhac et al., 2000).

Co-immunoprecipitation in *Xenopus* oocyte extracts

Xenopus oocyte microinjection as well as oocyte extraction was performed as previously described (Gavin et al., 1999). Samples of 30 oocytes were extracted in 300 µl of lysis buffer (80 mM β-glycerophosphate, pH 7.4, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 100 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF). The oocyte extract was then clarified by centrifugation at 13,000 rpm at 4°C for 20 minutes. The supernatant was removed from the overlying lipid layer and the yolk protein and was further clarified by a second centrifugation at 13,000 rpm at 4°C for 10 minutes. The oocyte extracts were stored at -70°C. For the immunoprecipitation of endogenous xp42^{mapk}, we used an anti-ERK2 antibody conjugated to agarose (Santa Cruz Biotechnology). *Xenopus* oocyte extracts (300 µl) were pre-cleared with 20 µl of protein A coupled to agarose beads for 30 minutes at 4°C. The cleared extracts were then incubated for 2 hours at 4°C with the antibody coupled to 20 µl of agarose beads. The beads were washed four times in 1 ml lysis buffer supplemented with 150 mM NaCl and then processed for immunoblotting.

Dephosphorylation assay

Just after collection and lysis, oocytes were incubated with or without 400 U of λ-phosphatase (New England Biolabs) in λ-phosphatase buffer at 37°C for 1 hour and then processed for immunoblotting.

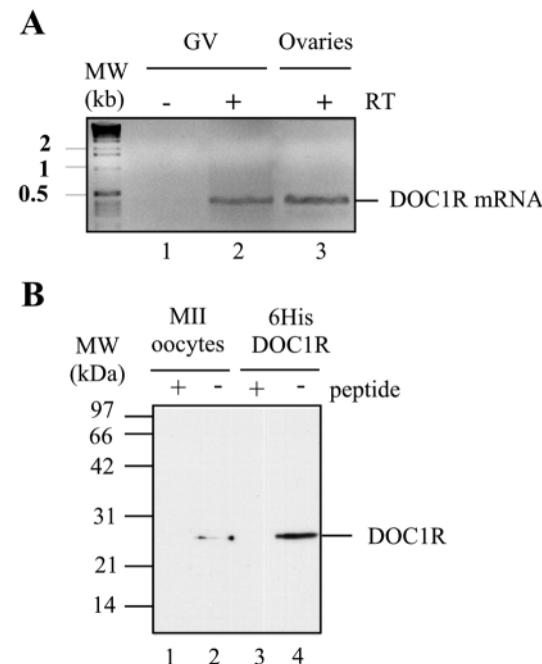


Fig. 2. DOC1R mRNA and protein are present in mouse oocyte. (A) Expression of DOC1R mRNA in immature oocytes (lanes 1 and 2) and ovaries (lane 3), treated or not with reverse transcriptase (RT, + or -). (B) The anti-DOC1R antibody recognizes a band at 28 kDa in 200 oocytes arrested in metaphase II (lane 2) and recognizes 1 µg of purified DOC1R protein (lane 4). The antibody pre-incubated with the DOC1R peptide (peptide, + or -) does not recognize either endogenous DOC1R (lane 1) or purified DOC1R (lane 3). These experiments were repeated twice.

Preparation of recombinant DOC1R protein

The DOC1R recombinant protein was prepared from the HMS174 *E. coli* transformed with the pET-DOC1R plasmid. The protein was purified from bacteria under native conditions as described in the QIAexpressionist handbook (Qiagen).

Kinase assays

The in vitro kinase assays were performed on 0.1 µg of purified DOC1R or 2.5 µg of Histone H1 in 10 µl of Histone H1 kinase buffer [80 mM β-glycerophosphate, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2.5 mM benzamidine, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and 1 mM DTT, pH 7.4] with 0.025 µg of commercial recombinant active rat ERK2 (BIOMOL, Ref SE-137) or 0.025 µg of cyclin B/CDC2 (Biolabs) supplemented with 6.25 µCi of [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) and 50 µM cold ATP, for 30 minutes at 37°C. Reactions were stopped by the addition of sample buffer (Laemmli, 1970) and were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography.

2D gel electrophoresis

Oocytes microinjected with MYC-DOC1R encoding RNA were collected 14 hours after GVBD and stored at -80°C in water containing 1 mM PMSF and 10 µg/ml leupeptin/pepstatin/aprotinin. They were then processed as previously described (Louvet-Vallee et al., 2001).

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as previously described (Brunet et al., 1999). To visualize endogenous DOC1R, oocytes were first fixed for 30 minutes in 3.7% formaldehyde at 30°C then treated

for 10 minutes in 0.25% TritonX-100 in PBS, washed in 0.1% Tween 20/PBS, incubated for 1 hour with the primary affinity-purified anti-DOC1R antibody (at 1:50) in 3% BSA/0.1% Tween 20/PBS. They were then washed in 0.1% Tween 20/PBS and further incubated for 1 hour with the secondary anti-rabbit FITC (1:80) in 3% BSA/0.1% Tween 20/PBS. After incubation with the secondary antibody, all samples were washed in 0.1% Tween 20/PBS, incubated for 5 minutes in Propidium Iodide (5 µg/ml in 0.1% Tween20/PBS), then washed three times in PBS before mounting in Citifluor (Chem. Lab., UCK).

Immunoblotting

Oocytes at the appropriate stage of maturation were collected in sample buffer (Laemmli, 1970) and heated for 3 minutes at 100°C. We used the following antibodies: an affinity-purified anti-DOC1R antibody directed against the LVRECLAETERNART peptide (Sigma Immunochemicals), the anti-MYC 9E10 monoclonal antibody (sc-40; Santa Cruz Biotechnology), an anti-Ezrin antibody (Louvet-Vallee et al., 2001) and the anti-Erk antibody (sc-94; Santa Cruz Biotechnology).

Results

Isolation of DOC1R, a MAPK-interacting protein

MISS was isolated from a two-hybrid screen using rat ERK2 as a bait on a mouse oocyte cDNA library that we had prepared in the laboratory (Lefebvre et al., 2002). During the same screen, we had identified another partial cDNA of about 500 bp encoding a protein domain that interacts with rat ERK2. The homology of this partial cDNA with the human DOC1R (Zhang et al., 1999) coding sequence allowed us to isolate the full-length ORF of the murine DOC1R. The full-length DOC1R protein specifically interacts with ERK2 in a two-hybrid assay, as yeast strains co-transformed with plasmids expressing LexA-ERK2 and B42-DOC1R can induce expression of the two reporter genes (Leu2 and β-galactosidase; Fig. 1A). A MYC-tagged DOC1R protein also co-immunoprecipitates with endogenous MAPK from *Xenopus* oocyte extracts, whereas a negative control encoding for MYC-WNT11 does not (Fig. 1B compare lanes 3 and 4). All these data show that DOC1R is a MAPK partner. DOC1R, together with MISS (Lefebvre et al., 2002) and p90^{rsk} (Kalab et al., 1996) are the only known MAPK substrates in mouse oocytes.

DOC1R potentially contains one MAPK phosphorylation site (Fig. 1C, blue), one CDK2 binding site (red) and a cyclin/CDK binding site (green) (Shintani et al., 2000). Like MISS, this protein is very rich in proline residues in its N-terminal end (Fig. 1C) (Lefebvre et al., 2002).

By homology searches in databases, we also isolated ESTs encoding homologues of the DOC1R protein (Fig. 1C). The DOC1R and human DOC1R protein are almost identical (they present 95% of identities, Fig. 1D). Interestingly, the protein is highly conserved from *Xenopus laevis* to human (about 70% of identities, Fig. 1D). This conservation suggests that DOC1R mediates important function(s) in vertebrate species.

DOC1R mRNA and protein are present in mouse oocytes

To investigate if the DOC1R mRNA was expressed in mouse ovaries and oocytes, we performed RT-PCR using specific primers on total RNA from ovaries and immature oocytes. The presence of the DOC1R mRNA in ovaries and oocytes is shown in Fig. 2A (lanes 2 and 3).

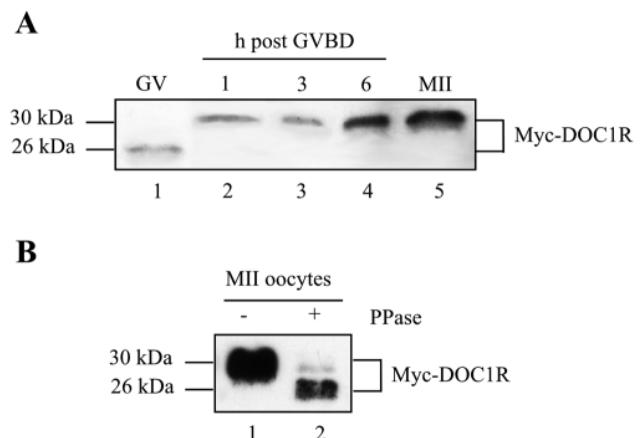


Fig. 3. DOC1R is regulated by phosphorylation. For A,B, immature oocytes were injected with RNA encoding the MYC-DOC1R protein and further cultured for different length of time. Each sample corresponds to a pool of 25 oocytes from the same injection and to oocytes that expressed the mRNA for at least 6 hours. (A) MYC-DOC1R regulation during meiotic maturation. MYC-DOC1R mRNA was injected into wild-type oocytes that were collected at different stages of meiotic maturation: immature (lane 1, GV), at 1 hour (lane 2), 3 hours (lane 3), 6 hours (lane 4) and 14 hours (lane 5, Metaphase II, MII) after GVBD. (B) In vitro dephosphorylation of MYC-DOC1R from mouse oocyte extracts. Thirty oocytes were injected with MYC-DOC1R mRNA, cultured 14 hours after GVBD, collected and incubated without (lane 1) or with (lane 2) 400 U of λ-phosphatase (PPase + or -). All samples were analyzed by immunoblotting with the anti-MYC antibody. Experiments have been repeated four times.

To examine if the DOC1R protein was present in mouse oocytes, an affinity-purified anti-DOC1R antibody was produced and tested on a DOC1R protein produced in bacteria. A specific band of apparent molecular weight of 28 kDa is recognized with the antibody (Fig. 2B, lane 4) that disappears when the antibody is pre-incubated with the immunogenic peptide (Fig. 2B, lane 3). As the expected molecular weight of the tagged-DOC1R is ~19 kDa, the conformation of the protein must therefore modify its migration in SDS PAGE (see below). The antibody recognizes one band of about 28 kDa in mature mouse oocytes (Fig. 2B, lane 2) that also disappears when the antibody is pre-incubated with the immunogenic peptide (Fig. 2B, lane 1). The antibody seems highly specific for DOC1R, as it does not recognize any other protein on the immunoblot. As one mouse oocyte contains only 23 ng of total protein, this certainly explains why the antibody recognizes only a very faint band in mouse oocyte extracts (200 oocytes).

Therefore these experiments show that both DOC1R mRNA and protein are expressed in mouse oocytes.

DOC1R is regulated by phosphorylation during meiotic maturation of mouse oocytes

Because it required 200 oocytes to see a faint band corresponding to DOC1R on immunoblot, we followed the behavior of an overexpressed DOC1R protein during meiotic maturation after microinjection of RNA encoding MYC-DOC1R into immature oocytes. Samples of microinjected oocytes were collected at different times during meiosis

resumption. In contrast to MYC-MISS protein, the MYC-DOC1R protein accumulates in GV oocytes and at all stages of meiotic maturation (Fig. 3A) (Lefebvre et al., 2002). The apparent increase in MYC-DOC1R protein amount during meiosis is due to the progressive translation of injected RNA. In immature oocytes, the protein migrates to an apparent molecular weight of 26 kDa (Fig. 3A, lane 1). By contrast, during meiosis resumption the MYC-DOC1R protein up-shifts, migrating more slowly at about 30 kDa, suggesting that it is regulated by post-translational modifications.

We tested if these modifications could be due to phosphorylation. Immature oocytes in GV were injected with RNA encoding the MYC-DOC1R protein and collected in metaphase II. Half of the sample was treated with λ -phosphatase and the other half served as a control. As shown in Fig. 3B, the phosphatase treatment induces a down-shift of MYC-DOC1R electrophoretic mobility (compare lanes 1 and 2). This result indicates that DOC1R effectively undergoes phosphorylation during meiosis resumption.

The down-shift is not complete, suggesting that the treatment with λ -phosphatase was not totally efficient, or that the protein undergoes post-translational modifications other than phosphorylation.

Both cyclin B/CDC2 and MAPK phosphorylate DOC1R

As MYC-DOC1R undergoes post-translational modifications in oocytes collected one hour after GVBD, when MPF is active and MAPK inactive (Verlhac et al., 1994), we tested the ability of both kinases to phosphorylate DOC1R in vitro. For that, we incubated either purified cyclin B/CDC2 or active ERK2 in the presence of [γ -³²P]-ATP and purified DOC1R protein. As shown on the autoradiograph, both purified cyclin B/CDC2 and active MAPK are able to in vitro phosphorylate the DOC1R protein (Fig. 4A, lanes 1 and 4) to levels close to the histone H1 phosphorylation (Fig. 4A, lanes 2 and 5). This is consistent with the prediction of one MAPK phosphorylation site and one cyclin/CDK-binding site (Shintani et al., 2000) in the DOC1R protein sequence.

We took advantage of the *Mos*^{-/-} mice, which do not activate MAPK (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996), to show that MYC-DOC1R is an *in vivo* substrate of the MOS.../MAPK pathway. As shown in Fig. 4B, the SDS PAGE migration profile of MYC-DOC1R from *Mos*^{-/-} oocytes taken 12 hours after GVBD is completely different from wild-type oocytes and is characterized by three different bands from 26 to 30 kDa (compare lanes 1 and 2). The molecular weight of the lower band is the same as the DOC1R protein present in immature oocytes and the upper band migrates at an apparent molecular weight identical to the DOC1R protein present in mature wild-type oocytes.

To check whether the upper migrating forms of MYC-DOC1R present both in wild-type and *Mos*^{-/-} oocytes share the same post-translational modifications, we performed 2D gel analysis. We observed that the upper band from wild-type oocytes resolved into two major isoforms (Fig. 4C, top panel). To position the different isoforms of MYC-DOC1R from one sample to the other, we used Ezrin as an internal control (not shown) (Louvet-Vallee et al., 2001). In metaphase II *Mos*^{-/-} oocytes, the isoforms corresponding to the upper migrating band were shifted towards the basic pole

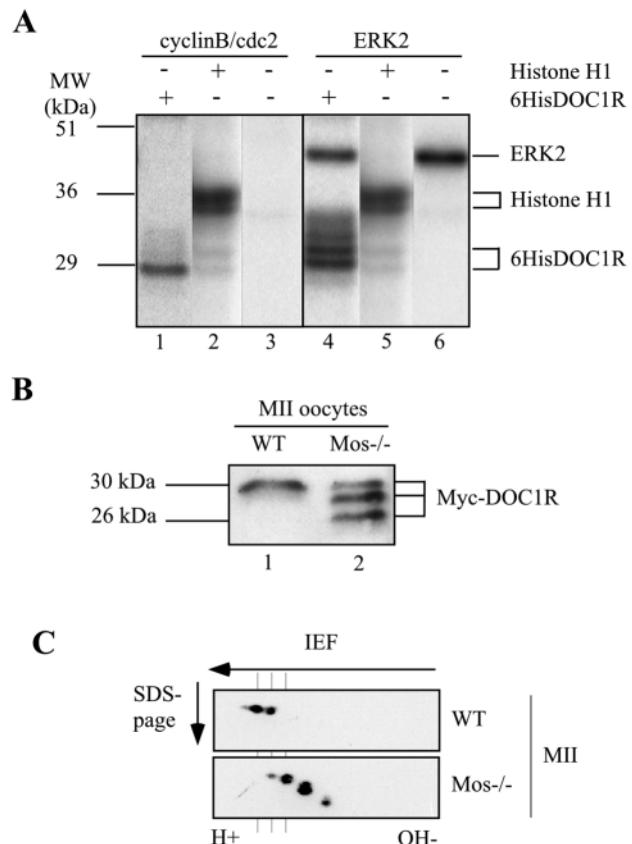


Fig. 4. cyclin B/CDC2 and MAP kinase phosphorylate DOC1R. (A) Purified cyclin B/CDC2 and MAPK phosphorylate DOC1R in vitro. Purified cyclin B/CDC2 (lanes 1, 2 and 3) and recombinant active rat ERK2 (lanes 4, 5 and 6) were incubated with (+) or without (-) 6His-DOC1R or Histone H1 (lanes 2 and 5) in the presence of [γ -³²P]-ATP. The [³²P] incorporation was detected by autoradiography. This experiment has been repeated twice. (B) The MOS.../MAPK pathway phosphorylates DOC1R. MYC-DOC1R-injected oocytes from wild-type (lane 1) or *Mos*^{-/-} (lane 2) mice were cultured for 12 hours after GVBD and collected. This experiment has been repeated three times. (C) MYC-DOC1R expression after microinjection of RNA encoding MYC-DOC1R into immature wild-type or *Mos*^{-/-} oocytes. Forty wild-type oocytes cultured for 12 hours after GVBD (top panel) or 40 *Mos*^{-/-} oocytes cultured for 12 hours (bottom panel) after GVBD were collected and analysed by 2D gel electrophoresis. The migration of MYC-DOC1R is shifted towards the acidic pole (H+) in wild-type oocytes compared with its migration in *Mos*^{-/-} oocytes. To position the different MYC-DOC1R isoforms from one sample to the other, we re-probed all the blots using Ezrin as an internal control (Louvet-Vallee et al., 2001). This experiment has been repeated three times. Samples in B and C were analyzed by immunoblotting using an anti-MYC antibody.

(OH-, Fig. 4C, bottom panel). These results show first that the band migrating in 1D at an apparent molecular weight of 30 kDa corresponds to different isoforms of DOC1R. Second these results show that MYC-DOC1R is less phosphorylated in *Mos*^{-/-} oocytes, as phosphorylations confer negative charges to proteins. These experiments suggest that the protein is effectively phosphorylated by the MOS.../MAPK pathway and that other kinases are also responsible for DOC1R phosphorylation.

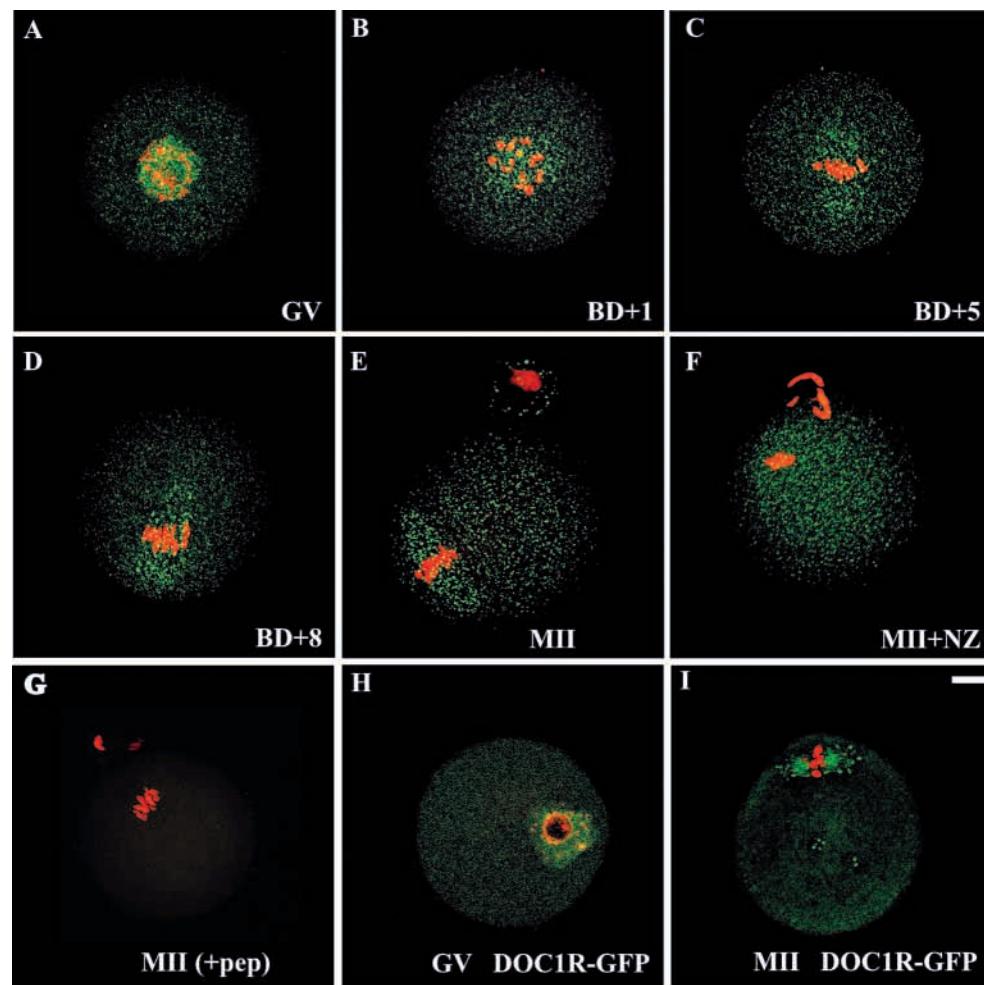


Fig. 5. DOC1R localizes to microtubules during meiotic maturation. (A-F) Localization of the endogenous DOC1R protein. Groups of 20 oocytes at different stages of meiotic maturation were fixed with formaldehyde and further stained with the anti-DOC1R antibody (A-F) or with the antibody blocked with 30 µM of immunogenic peptide (G). (H,I) Oocytes microinjected with DOC1R-GFP encoding RNA and collected in GV (H) or MII (I). All oocytes were analyzed by confocal microscopy using identical settings. (A) Immature oocyte in GV, (B) oocyte collected 1 hour after GVBD, (C) 5 hours after GVBD, (D) 8 hours after GVBD, (E-G-I) 14 hours after GVBD in metaphase II (MII), (F) cultured for 13 hours after GVBD then treated with nocodazole for 1 hour (MII+NZ). The DOC1R staining or DOC1R-GFP localization appear in green and chromosomes in red. Two-hundred and fifty oocytes were scored for this experiment. Scale bar: 10 µm.

DOC1R is present at all stages of meiotic maturation and localizes on metaphase spindles

We followed the endogenous DOC1R localization during meiotic maturation. We show that DOC1R is present in immature oocytes (Fig. 5A) and during all stages of meiotic maturation (Fig. 5B-E), confirming the immunoblotting analysis of the exogenous MYC-DOC1R protein. DOC1R accumulates in immature oocytes in the nucleus (Fig. 5A), as previously described in interphase human cells (Zhang et al., 1999). During the first meiotic division (Fig. 5B-D), DOC1R accumulates in the cytoplasm and localizes in dots in the vicinity of the chromosomes in a region enriched in microtubules. Microtubule re-organization has been well described during mouse oocyte maturation (Brunet et al., 1999); microtubules form early during the first division around the chromosomes and organize into a bipolar spindle about 2 hours after meiosis resumption. DOC1R localization follows microtubule organization during metaphase I. In metaphase II (Fig. 5E), DOC1R also accumulates in the cytoplasm and on the spindle. To prove that the DOC1R protein is associated with microtubules, we treated metaphase II oocytes with nocodazole, which induces microtubule depolymerization (Fig. 5F). In these oocytes, the DOC1R protein was diffusely located in the cytoplasm, which proves that DOC1R associates specifically with spindle microtubules. As a control, we performed immunofluorescence after blocking the purified

antibody with the immunogenic peptide and no staining was observed (Fig. 5G). Furthermore, like the endogenous DOC1R protein, a DOC1R-GFP fusion localizes in the germinal vesicle of immature oocytes (Fig. 5H) and on the metaphase II spindle (Fig. 5I).

The DOC1R depletion induces formation of asters of microtubules in the cytoplasm as well as at spindle poles of metaphase II oocytes

To investigate the role of DOC1R, we microinjected antisense RNA (asRNA), or double-stranded RNA (dsRNA) targeting the endogenous DOC1R mRNA. Oocytes were injected at the GV stage, collected at different stages of meiotic maturation and immunocytochemistry was performed to examine the chromosome and microtubule morphology (Fig. 6A-F). The injection of control dsRNA targeting the *Xenopus* Frizzled 7 mRNA did not affect meiotic maturation or spindle organization (Fig. 6B,K), with injected oocytes looking like non-injected ones in metaphase II (Fig. 6A,K). Typically, metaphase II-arrested oocytes present barrel-shaped spindles with no astral microtubules and no cytoplasmic asters of microtubules (Maro et al., 1985). When we injected asRNA or dsRNA against DOC1R mRNA, oocytes underwent their first meiotic division normally, extruded first polar bodies of normal size and with the same percentage as control oocytes ($84.2 \pm 8.2\%$ of polar body extrusion in the case of dsDOC1R

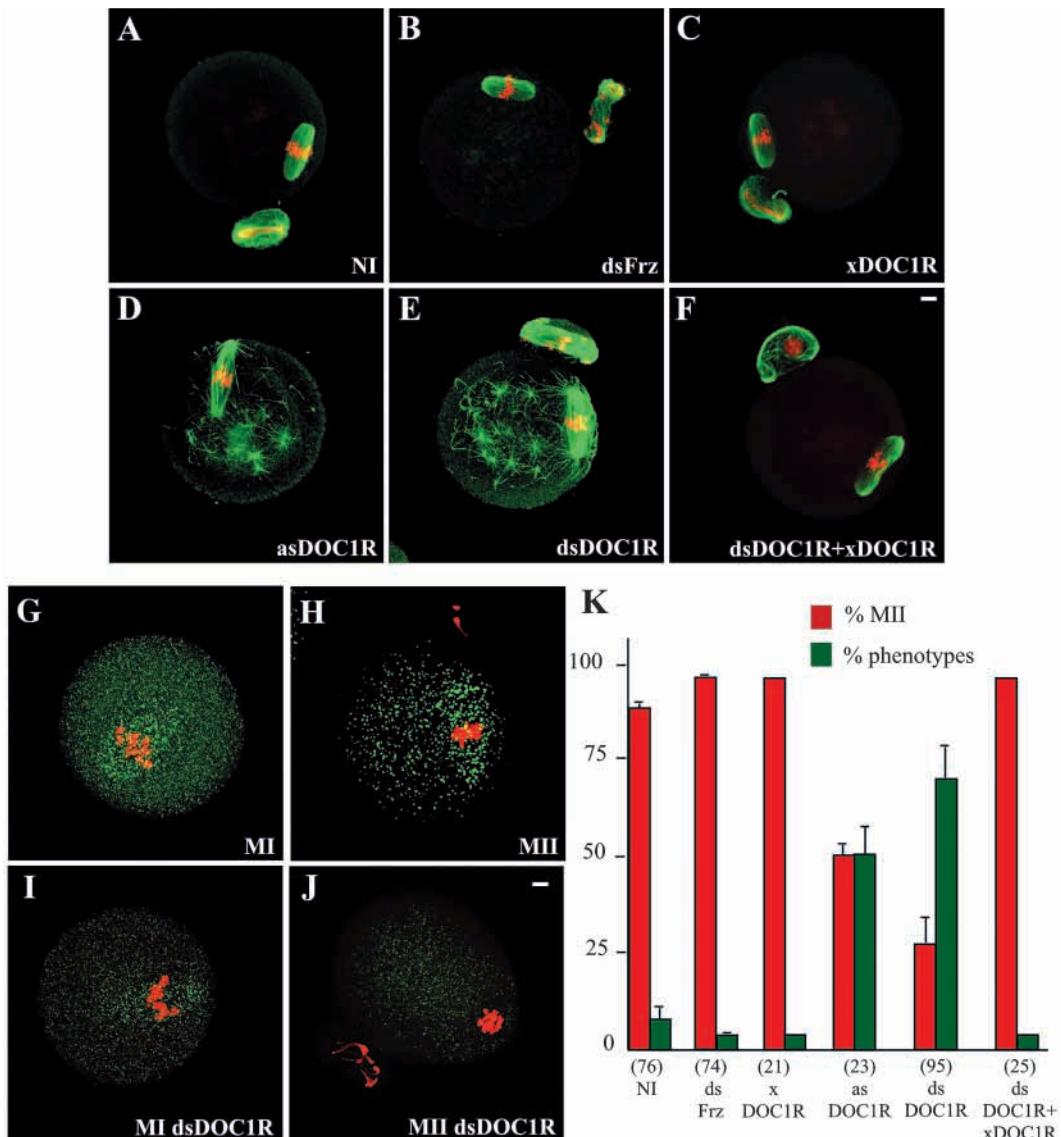


Fig. 6. DOC1R depletion induces formation of numerous microtubule asters at spindle poles as well as in the cytoplasm of MII oocytes. Immature oocytes were microinjected with antisense RNA (asDOC1R) or double-stranded RNA (dsDOC1R or dsFrz) directed against DOC1R or *Xenopus* Frizzled mRNA, or they were injected with RNA encoding *Xenopus* DOC1R with or without dsDOC1R, further cultured and collected at different stages of meiotic maturation. Oocytes were fixed with formaldehyde and analyzed by confocal microscopy. (A) Control non-injected oocyte (NI) collected in metaphase II. (B) Control oocyte injected with dsFrz collected in metaphase II. (C) Control oocyte injected with RNA encoding *Xenopus* DOC1R and collected in metaphase II. (D) Oocyte injected with asDOC1R collected in metaphase II. (E) Oocyte injected with dsDOC1R collected in metaphase II. (F) Oocyte injected with dsDOC1R and with RNA encoding *Xenopus* DOC1R, then collected in metaphase II. (G,H) Non-injected oocyte collected in metaphase I (MI, G) or metaphase II (MII, H). (I,J) Oocyte injected with the dsDOC1R collected in metaphase I (I) or II (J). For A-F, microtubules appear in green, for G-H, the endogenous DOC1R staining appears in green. For all images, chromosomes appear in red. Scale bars: 10 µm in A-F; 6 µm in G-J. (K) Statistics of the experiment described above. Percent MII: percentage of oocytes presenting a normal bipolar metaphase II spindle. Percent phenotypes: percentage of oocytes presenting spindle defects and numerous asters in the cytoplasm. The numbers in brackets correspond to the total number of oocytes analyzed. These experiments have been repeated between three to five times.

versus 84±12% in the control oocytes), but were arrested in metaphase II with severe phenotypes: spindles showing astral microtubules and numerous cytoplasmic asters (Fig. 6D,E). The injection of the asRNA induced 50% of such phenotypes while the injection of dsRNA was more efficient and induced 70% of elongated spindles (Fig. 6K).

To determine the efficiency of our dsRNA, we checked the presence of the endogenous DOC1R in the injected oocytes.

The injection of dsRNA against DOC1R induces a loss of DOC1R localization on the MII spindle but not on the metaphase I spindles (Fig. 6 compare G with I and H with J).

To prove that the phenotype we observed was specific, we injected the dsRNA together with RNA encoding the *Xenopus* DOC1R protein. Despite the amino acid conservation between the murine and the *Xenopus* DOC1R proteins, the *Xenopus* cDNA diverges from the mouse, and thus is corresponding

cDNA cannot be targeted by the dsRNA. As shown on Fig. 6F,K, the *Xenopus* protein complements the microtubule defect induced by the dsRNA. The injection of the RNA coding the *Xenopus* protein has no effect by itself on microtubule organization (Fig. 6C). So the cytoplasmic asters as well as nucleation of microtubules from the spindle poles is solely due to DOC1R depletion.

Altogether, our experiments demonstrate that DOC1R regulates microtubule organization at least in metaphase II (see Discussion). The depletion of DOC1R induces severe damage to the microtubule cytoskeleton, which may compromise chromosome segregation after fertilization and hence compromise further embryo development.

Discussion

DOC1R regulation during meiotic maturation of mouse oocytes

DOC1R was isolated in the same screen that identified MISS, a protein required for metaphase II spindle stability. We show here that DOC1R is a MAPK partner as it interacts in a two-hybrid approach and co-immunoprecipitates with endogenous MAPK from *Xenopus* oocyte extracts.

DOC1R has a consensus site for MAPK phosphorylation, a potential CDK2 binding site and a potential cyclin/CDK binding site (Shintani et al., 2000). We show that DOC1R is expressed at all stages of meiotic maturation and that it is regulated by multiple phosphorylations. First, cyclin B/CDC2 is able to phosphorylate DOC1R in vitro, which is consistent with the presence of one potential cyclin/CDK binding site in its coding sequence. Furthermore, DOC1R becomes phosphorylated early in metaphase I, when MPF is active but not MAPK. Second, MAPK is able to phosphorylate DOC1R in vitro and in vivo, in agreement with the presence of one consensus site for MAPK phosphorylation in its sequence.

By 2D gel analysis, we show that the post-translational modifications that affect DOC1R during meiotic maturation are quite complex. Some modifications can be attributed to MPF activation, some to the MOS/.../MAPK pathway and it cannot be excluded that DOC1R is also modified by post-translational modifications other than phosphorylations. The characterization of DOC1R modifications by phosphorylation will be the object of further studies.

DOC1R function during meiotic maturation of mouse oocytes

Endogenous DOC1R is localized in dots on microtubules during all stages of meiotic maturation in particular on metaphase I and II spindles. These dots could reflect either an accumulation of DOC1R into vesicular structures associated with microtubules or macromolecular complexes containing DOC1R multimers.

Consistent with DOC1R association with microtubules, its depletion leads to drastic phenotypes in metaphase II arrested oocytes: elongated spindles enriched in astral microtubules and numerous asters of microtubules in the cytoplasm. The phenotype is specific to DOC1R depletion (1) because it is observed only when the endogenous protein can no longer be detected on the metaphase II spindle and (2) because overexpression of the *Xenopus* protein complements the defects observed after dsRNA injection.

The phenotype can be explained by extensive microtubule polymerization from MTOCs (microtubule organizing centers) that in mouse oocytes are present at spindle poles as well as foci in the cytoplasm (Maro et al., 1985). It can be interpreted as a reduced ability of the chromatin to stabilize microtubules in its vicinity. Normally, meiotic spindles are devoid of astral microtubules and cytoplasmic MTOCs do not form microtubule asters. The depletion of DOC1R promotes microtubule nucleation and/or elongation. This suggests that DOC1R normally increases microtubule dynamics in metaphase II arrested oocytes. We cannot exclude that DOC1R has a similar function in metaphase I, because we could not completely deplete the endogenous pool of DOC1R during the first meiotic division. The absence of a detectable phenotype in metaphase I could be explained by a low turnover of the protein and therefore a lack of full efficiency of the dsRNA during metaphase I.

DOC1R localization and the phenotype observed after its depletion are consistent with the potential tumor suppressor role of the DOC1R gene (Zhang et al., 1999). Indeed, human tumors are characterized by chromosomal instability primary resulting from spindle organization defects (Saunders et al., 2000).

A new vision of the metaphase II arrest of vertebrate oocytes

As for MISS, we could not find obvious invertebrate homologues of DOC1R. However, the protein sequence of DOC1R has been highly conserved from *Xenopus laevis* to human. Moreover, we show here that the *Xenopus* protein can functionally complement the mouse DOC1R. So we believe that both DOC1R and MISS mediate important functions specific to vertebrate species.

The meiotic metaphase II spindle harbors an unusual location in the cell: it is closely associated with the cortex, which is enriched in actin microfilaments. This association allows spindle rotation at fertilization, a prerequisite to second polar body extrusion that is essential for further embryo development. It is interesting that DOC1R is related to a coiled-coil region in a kinesin (KIF14) (for a review, see Miki et al., 2001) of unknown function that contains both a kinesin as well as a myosin domain. We can imagine that DOC1R somehow regulates interactions between spindle microtubules and microfilaments of the cortex that are necessary for maintaining proper MII spindle organization.

The discovery of new MAPK substrates, such as DOC1R and MISS, involved in the regulation of microtubule organization, is of crucial importance for our understanding of the processes controlling the metaphase II arrest of vertebrate oocytes. It suggests that the MOS/.../MAPK pathway not only controls CSF arrest by maintaining a high MPF activity through p90^{rsk} activity (Bhatt and Ferrell, 1999; Gross et al., 1999; Gross et al., 2000) but also ensures that the spindle is properly organized during the arrest for the success of fertilization. Our findings are consistent with the unpublished data showing that the maintenance of bipolar spindles assembled in *Xenopus* egg extracts requires MAPK activity, but not p90^{rsk} activity (Horne et al., 2003).

In conclusion, we have discovered two proteins that seem essential for mouse embryo development as their absence results in severe damage to the microtubule network of metaphase II mouse oocytes. Indeed *C. elegans* *mei-1* and

mei-2 mutants (proteins that regulate microtubule dynamics in meiosis and induce severing of microtubules to produce small meiotic spindles) extrude large polar bodies and show aneuploidy (Srayko et al., 2000).

We thank Paul Hossenlopp (Université Pierre et Marie Curie) for his help in the choice of the DOC1R immunogenic peptide. We thank Richard Schwartzmann (CNRS) for his help with confocal microscopy. We thank Olivier Gavet, Katia Wassmann and Julien Dumont for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 9913 and ARC 5792 to M.-H.V.). M.E.T. and C.L. are recipients of fellowships from the Ministère de l'Education et de la Recherche Technologique.

References

- Bhatt, R. R. and Ferrell, J. E., Jr (1999). The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science* **286**, 1362-1365.
- Brunet, S., Santa-Maria, A., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J. Z. and Maro, B. (1999). Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic metaphase. *J. Cell Biol.* **146**, 1-11.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Udy, G. B. and Evans, M. J. (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* **370**, 65-68.
- Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R. and Haccard, O. (2002). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **21**, 4026-4036.
- Gavin, A. C., Ni Ainle, A., Chierici, E., Jones, M. and Nebreda, A. R. (1999). A p90(rsk) mutant constitutively interacting with MAP kinase uncouples MAP kinase from p34(cdc2)/cyclin B activation in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2971-2986.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L. and Maller, J. L. (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* **286**, 1365-1367.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y.-W. and Maller, J. L. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90rsk. *Curr. Biol.* **10**, 430-438.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E. and Maller, J. L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* **262**, 1262-1265.
- 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.
- Horne, M. M. and Guadagno, T. M. (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **161**, 1021-1028.
- Iouzalem, N., Camonis, J. and Moreau, J. (1998). Identification and characterization in *Xenopus* of XsmgGDS, a RalB binding protein. *BBRC* **250**, 359-363.
- Kalab, P., Kubiak, J. Z., Verlhac, M.-H., Colledge, W. H. and Maro, B. (1996). Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and dependent activation. *Development* **122**, 1957-1964.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lefebvre, C., Terret, M.-E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B. and Verlhac, M.-H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.* **157**, 603-613.
- Louvet-Vallee, S., Dard, N., Santa-Maria, A., Aghion, J. and Maro, B. (2001). A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **231**, 190-200.
- Maro, B., Howlett, S. K. and Webb, M. (1985). Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 1665-1672.
- Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **117**, 129-146.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. and Hirokawa, N. (2001). All Kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7004-7011.
- Nebreda, A. R. and Hunt, T. (1993). The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extract of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* **12**, 1979-1986.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. (1993). Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2546-2553.
- Saunders, W. S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A. H., Petersen, I. and Gollin, S. M. (2000). Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 303-308.
- Shintani, S., Ohyama, H., Zhang, X., McBride, J., Matsuo, K., Tsuji, T., Hu, M. G., Hu, G., Kohno, Y., Lerman, M. et al. (2000). p12DOC-1 is a novel cyclin-dependent kinase 2-associated protein. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6300-6307.
- Srayko, M., Buster, D. W., Bazirgan, O. A., McNally, F. J. and Mains, P. E. (2000). MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes Dev.* **14**, 1072-1084.
- Todd, R., McBride, J., Tsuji, T., Donoff, R. B., Nagai, M., Chou, M. Y., Chiang, T. and Wong, D. T. (1995). Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *FASEB J.* **9**, 1362-1370.
- Tunquist, B., Schwab, M. S., Chen, L. G. and Maller, J. L. (2002). The spindle checkpoint kinase Bub1 and cyclin E/Cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by Cytostatic Factor. *Curr. Biol.* **12**, 1027-1033.
- Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J. and Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* **120**, 1017-1025.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J. and Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* **122**, 815-822.
- Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Kubiak, J. Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W. and Maro, B. (2000). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* **19**, 6065-6074.
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16**, 1909-1920.
- Zhang, X., Tsao, H., Tsuji, T., Minoshima, S., McBride, J., Majewski, P., Todd, R., Shimizu, N., Wong, D. T., Housman, D. E. et al. (1999). Identification and mutation analysis of DOC-1R, a DOC-1 growth suppressor-related gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 59-63.

ARTICLE 3

**Meiotic spindle stability depends on
MAPK-interacting and spindle-stabilizing
protein (MISS), a new MAPK substrate**

Lefebvre C, Terret M.-E, Djiane A, Rassinier P, Maro
B, Verlhac M.-H.

The Journal of Cell Biology 2002. 157(4) 603-613

Situation du sujet

Le cadre de cette étude est le même que celui de l'article 2. Un autre des clones positifs isolés était MISS (MAP Kinase Interacting and Spindle Stabilizing protein). Ce travail porte sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette protéine au cours de la maturation méiotique chez la souris.

Résultats principaux :

- Une banque d'ADNc d'ovocytes de souris au stade GV a été réalisée. Cette banque est la première de ce type pour l'ovocyte de souris et a nécessité 2000 ovocytes, chaque ovocyte de souris contenant 23ng de protéines totales et 0,7pg d'ARN polyA.
- La banque a été ciblée en utilisant la MAP Kinase ERK2 de rat comme appât. A partir de 10^7 transformants, 133 clones réellement positifs ont été obtenus (après tests de spécificité). Après analyse des clones, deux clones différents ressortaient très fréquemment dont MISS. La banque a été réalisée à partir d'un oligo-dT, les parties 5' de ces clones ont donc d'abord été récupérées. Le clone entier de la protéine MISS a été obtenu par RT-PCR grâce aux EST (Expressed Sequence Tag) de souris présentes dans les banques de données.
- Afin de vérifier l'interaction de MISS avec la MAPK, des expériences de co-immunoprecipitation ont été réalisées dans des ovocytes de xénophage.
- La protéine MISS endogène n'est pas détectable dans les ovocytes immatures, mais est présente en métaphase de seconde division de méiose.
- MISS est une protéine de 263 acides aminés, riche en résidus proline dans sa partie N-terminale et possède quatre sites de phosphorylation par la MAPK. Elle contient une vraie séquence PEST ainsi qu'un signal de localisation nucléaire bipartite (NLS) fonctionnel contenant un site de liaison à la MAPK (Tanoue et al., 2000).
- Dans les ovocytes, la protéine MISS endogène se localise sous forme d'aggrégats le long du fuseau de division. Cette localisation est spécifique puisqu'elle est abolie lorsque l'anticorps est pré-incubé avec le peptide immunogène. La protéine MISS-GFP se comporte comme la protéine endogène et n'est localisée qu'en métaphase II le long des fibres kinétochoriennes.

- Myc-MISS n'est pas détectable en métaphase I mais s'accumule en métaphase II. Elle n'est pas détectable après activation parthénogénétique. Le traitement au nocodazole, qui dépolymérise les microtubules, induit une stabilisation de Myc-MISS en métaphase I, comme il le fait pour la Cycline B (Kubiak et al., 1993). En métaphase II, la protéine Myc-MISS subit des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation puisqu'elle est sensible à un traitement à la phosphatase λ .
- Dans les ovocytes de souris Mos^{-/-}, qui ne présentent pas d'activité MAPK, la migration électrophorétique en une et deux dimensions de Myc-MISS est modifiée par rapport aux ovocytes de souris sauvages.
- L'inhibition de l'expression de MISS par ARN interférence ou l'injection d'ARN antisens et de morpholino oligonucléotides ciblant MISS n'est pas efficace en méiose I, mais est très efficace en méiose II (vérification sur la protéine endogène). Elle conduit à des phénotypes microtubulaires en métaphase II: des fuseaux désorganisés (monopolaires, ou même absents) ainsi que l'apparition dans l'ovocyte d'asters cytoplasmiques en grand nombre. Le phénotype obtenu en métaphase II est spécifique puisque la co-injection du morpholino oligonucléotide ciblant DOC1R endogène et d'ARNm sens codant pour Myc-MISS (ARN non ciblé par la séquence présente dans le morpholino) restaure l'arrêt en métaphase II, avec des fuseaux normaux et sans asters de microtubules dans le cytoplasme.
- L'inhibition de l'expression de MISS par ARN interférence ne perturbe pas le développement précoce de l'embryon de souris.

Conclusions

MISS est un substrat des MAPK lors de la maturation méiotique chez la souris. Elle est présente uniquement en méiose II, associée à une localisation microtubulaire. La protéine est régulée par un mécanisme de dégradation microtubule-dépendant et cette instabilité de MISS est cohérente avec la présente d'une séquence PEST dans la protéine. MISS permet la stabilisation du fuseau de métaphase II au cours de l'arrêt CSF. Elle ne semble pas nécessaire à la régulation des premières divisions zygotiques.

Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate

Christophe Lefebvre, M. Emilie Terret, Alexandre Djiane, Pascale Rassinier, Bernard Maro, and Marie-Hélène Verlhac

Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, cedex 05, France

Vertebrate oocytes arrest in the second metaphase of meiosis (metaphase II [MII]) by an activity called cytostatic factor (CSF), with aligned chromosomes and stable spindles. Segregation of chromosomes occurs after fertilization. The Mos/.../MAPK (mitogen-activated protein kinases) pathway mediates this MII arrest. Using a two-hybrid screen, we identified a new MAPK partner from a mouse oocyte cDNA library. This protein is unstable during the first meiotic division and accumulates only in MII, where it localizes to the spindle. It is a substrate of the Mos/.../MAPK pathway. The depletion of endogenous RNA

coding for this protein by three different means (antisense RNA, double-stranded [ds] RNA, or morpholino oligonucleotides) induces severe spindle defects specific to MII oocytes. Overexpressing the protein from an RNA not targeted by the morpholino rescues spindle destabilization. However, dsRNA has no effect on the first two mitotic divisions. We therefore have discovered a new MAPK substrate involved in maintaining spindle integrity during the CSF arrest of mouse oocytes, called MISS (for MAP kinase-interacting and spindle-stabilizing protein).

Introduction

Meiotic maturation in vertebrate oocytes corresponds to the period including the exit from the G2 block to the arrest in metaphase of the second meiotic division (metaphase II [MII]*). Meiotic maturation starts with the activation of maturation-promoting factor (MPF), which triggers germinal vesicle breakdown (GVBD), chromosome condensation, and formation of the first meiotic spindle. This spindle migrates to the cortex and after extrusion of the first polar body, the second meiotic spindle forms below the cortex, where it remains stable for hours with chromosomes aligned on the metaphase plate.

Address correspondence to Marie-Hélène Verlhac, Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, UMR 7622, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard-Bat. C-5, 75252 Paris, cedex 05, France. Tel.: 33-14-427-3401. Fax: 33-14-427-3498. E-mail: marie-helene.verlhac@snv.jussieu.fr

*Abbreviations used in this paper: as, antisense; CSF, cytostatic factor; ds, double stranded; ERK2, extracellular regulated kinase 2; GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MI, MII, and MIII, metaphase I, II, and III; MISS, MAP kinase-interacting and spindle-stabilizing protein; NLS, nuclear localization signal.

Key words: MISS; MAP kinase; spindle stability; morpholino; mouse

The cascade initiated by c-mos, which activates mitogen-activated protein kinases (MAPK) (the Mos/.../MAPK pathway), controls many important events of meiotic maturation (for an extensive review see Abrieu et al., 2001). This pathway controls the migration of the germinal vesicle (GV) to the cortex in *Xenopus* oocytes and the migration of the first meiotic spindle to the cortex in mouse oocytes (Choi et al., 1996; Gavin et al., 1999; Verlhac et al., 2000a). It is therefore essential for the establishment of asymmetric divisions during meiosis. This pathway also controls microtubule organization in mouse oocytes (Verlhac et al., 1994, 1996). Moreover, the Mos/.../MAPK pathway promotes the cytostatic factor (CSF; Masui and Markert, 1971) arrest of vertebrate oocytes (Haccard et al., 1993; Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996). Indeed, vertebrate oocytes are arrested at metaphase of the second meiosis by an egg cytoplasmic substance called CSF. Then fertilization will release the egg from the arrest and allow it to complete meiosis and proceed to mitosis. The CSF arrest of the cell cycle is affected by the Mos/.../MAPK cascade, which results in the activation of the ribosomal S6 kinase p90^{rsk} (Bhatt and Ferrell, 1999; Gross et al., 1999, 2000). However, the mechanism of the cell cycle arrest in MII has not

been fully clarified. Particularly puzzling is the fact that the cell cycle is not arrested at metaphase I (MI), whereas all the kinases mentioned above have already been activated before MI. So molecules activated only in MII and targets of the Mos/.../MAPK pathway could also be involved in the CSF arrest.

To look for physiological effectors of the Mos/.../MAPK pathway in meiosis, we generated a mouse immature oocyte cDNA library that we screened by two hybrid using MAPK as a bait. We isolated a new protein, MAP kinase-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), which is rich in proline residues and has four potential MAPK phosphorylation sites, a MAPK docking site, a PEST sequence, and a bipartite nuclear localization signal (NLS). Apart from a potential human homologue, we did not find any homologies with other proteins in the databases. In mouse oocytes, MISS is a potential in vivo substrate for the Mos/.../MAPK pathway. The endogenous protein accumulates during mouse meiotic maturation and localizes as discrete dots on the MII spindle. Also, a MISS-GFP construct localizes to kinetochore microtubules in MII oocytes. The stability of MISS is regulated during mouse meiotic maturation. It is unstable in MI, where its degradation is microtubule dependent, and becomes stable in MII. MISS is again unstable after parthenogenetic activation and the endogenous protein is no longer detected in early embryos. By microinjecting both antisense (as) RNA, double-stranded (ds) RNA, and morpholino oligonucleotides (Summerton and Weller, 1997) directed against MISS endogenous mRNA, we show that it is involved in maintaining MII spindle integrity. Mouse oocytes microinjected with any of these three different molecules, and not control molecules, display disorganized MII spindles and numerous asters in their cytoplasm. Moreover, the spindle defects induced after microinjection of morpholino oligonucleotides directed against 25 bp upstream of the ATG can be rescued by the overexpression of Myc-MISS from RNA corresponding to the full-length ORF devoid of MISS 5' UTR. The injection of dsRNA against MISS has yet no effect on the first two mitotic divisions, suggesting a specific role for MISS in meiosis. MISS is the first example of a physiological MAPK substrate that is stabilized in MII and specifically regulates MII spindle integrity during the CSF arrest.

Results

Isolation of MISS that binds ERK2

We have prepared a two-hybrid cDNA library from 1,000 mouse immature oocytes. This library was screened using rat extracellular regulated kinase 2 (ERK2, one of the two mammalian MAPK) as a bait. From this screen, six clones were isolated that encoded a partial cDNA of ~500 bp. We confirmed the specificity of the two-hybrid interaction between this partial cDNA product and ERK2 (Fig. 1 A).

A mouse EST showing 95 overlapping base pairs with our partial cDNA enabled us to obtain the full-length ORF from the databases (Fig. 2 A). A full-length clone, identical to ours, has recently been pulled out from an mCAP-enriched cDNA library (Kawai et al., 2001). The sequence of the MISS mRNA and protein is presented in Fig. 2 B. This protein is very rich in proline residues in its NH₂-terminal end and harbors a PEST sequence, a bipartite NLS that con-

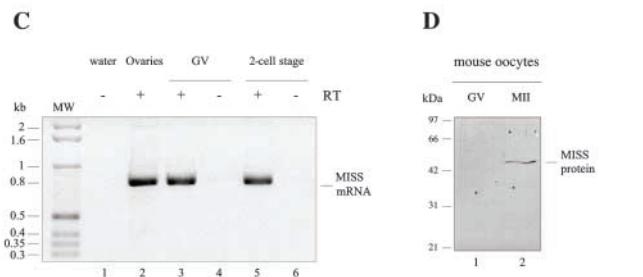
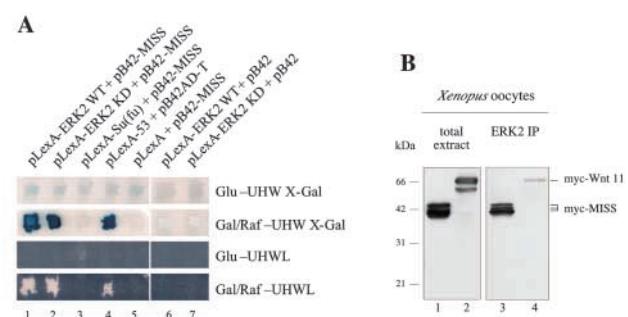


Figure 1. Interaction between MISS and MAPK. (A) Two-hybrid interaction between MISS and MAPK. MISS interacts with ERK2WT and ERK2KD but not with a negative control. The yeast transformed with LexA-ERK2WT, LexA-ERK2KD (Waskiewicz et al., 1997), LexA-53 (positive control; CLONTECH Laboratories, Inc.), LexA-Su(Fu), or LexA alone were mated with yeast transformed respectively with B42-cDNA, B42-AD-T (positive control; CLONTECH Laboratories, Inc.), or empty B42. The diploids obtained were assayed for transactivation of both the β -galactosidase and the LEU2 reporter genes on glucose (Glu)- or galactose (Gal/Raf)-containing media. The B42 fusion proteins are under the control of the galactose promoter. The B42-cDNA clearly interacts both with fusions of ERK2WT and ERK2KD at levels identical to the positive control, whereas it does not interact with a negative control (Su[Fu]). (B) MISS coimmunoprecipitates with endogenous p42^{mpk} from *Xenopus* oocyte extracts. Oocyte extracts expressing Myc-Wnt11 (*Xenopus* Wint11; negative control) or Myc-MISS RNA (lanes 1 and 2). Anti-p42^{mpk} immunoprecipitates (lanes 3 and 4) prepared from the oocyte lysates were analyzed by immunoblotting with anti-Myc antibody. This experiment was performed three times. (C) Expression of MISS RNA in immature oocytes and two cell stage embryos. For RT-PCR analysis, total RNA was isolated from mouse ovaries (lane 2), immature oocytes (lanes 3 and 4), and two cell stage embryos (lanes 5 and 6) and treated with or without reverse transcriptase (RT, + or -). Lane 1 corresponds to a PCR control (water). (D) MISS accumulates during meiotic maturation. 2,000 immature (lane 1) or mature (lane 2) oocytes were collected and immunoblotted using an affinity-purified anti-MISS antibody.

tains a MAPK docking site (Tanoue et al., 2000), and potential MAPK phosphorylation sites (Fig. 2 C).

We confirmed the two-hybrid interaction by showing that MISS coimmunoprecipitates with endogenous MAPK from *Xenopus* oocyte extracts (Fig. 1 B).

MISS mRNA is present in immature oocytes but MISS protein accumulates after meiosis resumption and localizes to the MII spindle

To check if the full-length RNA encoding MISS was present in mouse oocytes, we performed RT-PCR using primers specific for the MISS mRNA. By RT-PCR, we could amplify a

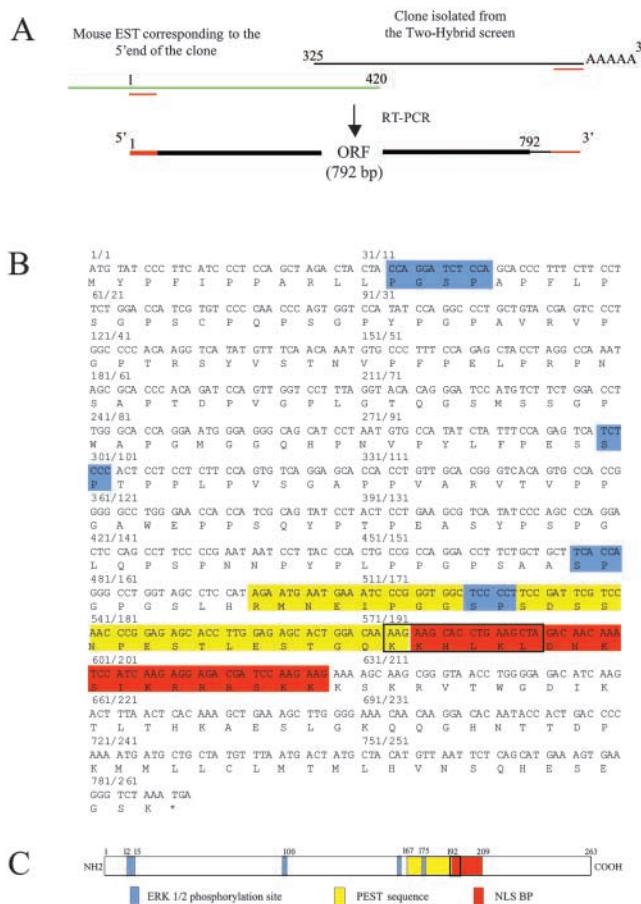


Figure 2. The sequence of MISS. (A) Schematic representation of how the full-length ORF was isolated. (B) Nucleotide and amino acid sequence of MISS ORF (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AK009250). The amino acid sequence is rich in proline in the NH₂-terminal end and contains a PEST sequence, a bipartite NLS and four potential MAPK phosphorylation sites. The MAPK docking site is boxed. (C) Schematic representation of the full-length MISS protein indicating the different domains.

specific band of ~800 bp corresponding to the full-length MISS ORF (Fig. 1 C). As shown in Fig. 1 C, MISS mRNA is expressed in mouse ovaries, mouse immature oocytes (at the GV stage), and two cell stage mouse embryos. However, both by immunoblotting (Fig. 1 D, lane 1) and immunofluorescence (Fig. 3 A) using an affinity-purified anti-MISS peptide antibody, we could not detect the presence of the endogenous protein in immature oocytes. MISS was present in mature oocytes (Fig. 1 D, lane 2). The apparent molecular weight being around 45 kD suggests that MISS undergoes posttranslational modifications. By immunofluorescence, MISS was undetectable in GV oocytes (Fig. 3 A), was hardly detectable in the vicinity of the chromosomes in late MI oocytes (Fig. 3 B), and accumulated strongly and became localized in MII-arrested oocytes (Fig. 3, C and D). Both the cytoplasmic and the MII spindle staining are specific because they are no longer present when the purified antibody is preincubated with the immunogenic peptide (Fig. 3 F). Interestingly, we could not detect any staining in early mouse embryos (Fig. 3 E), suggesting that MISS accumulates specifically in meiosis. A MISS-GFP construct also behaves like the endogenous protein during mei-

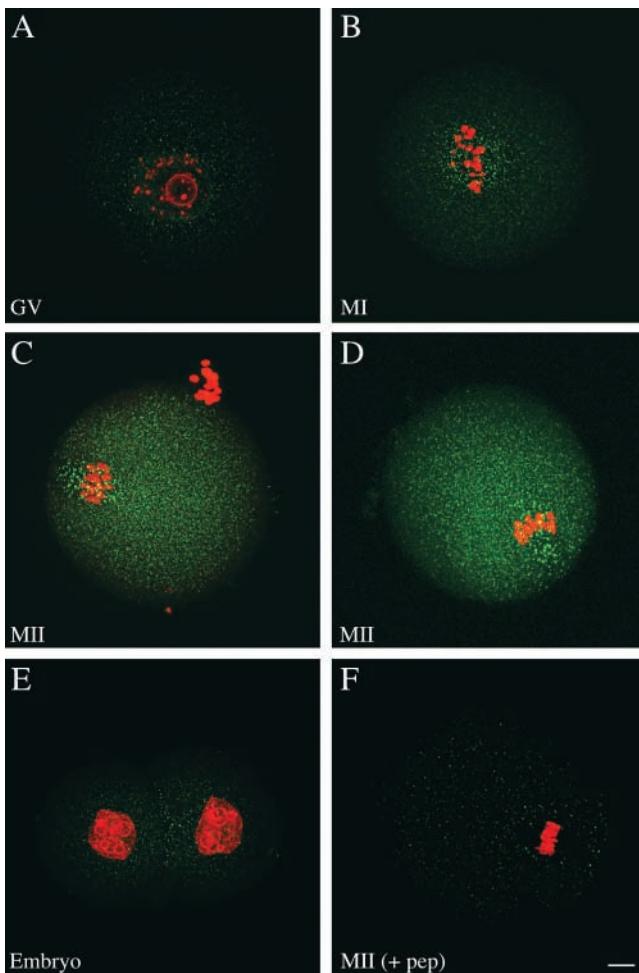


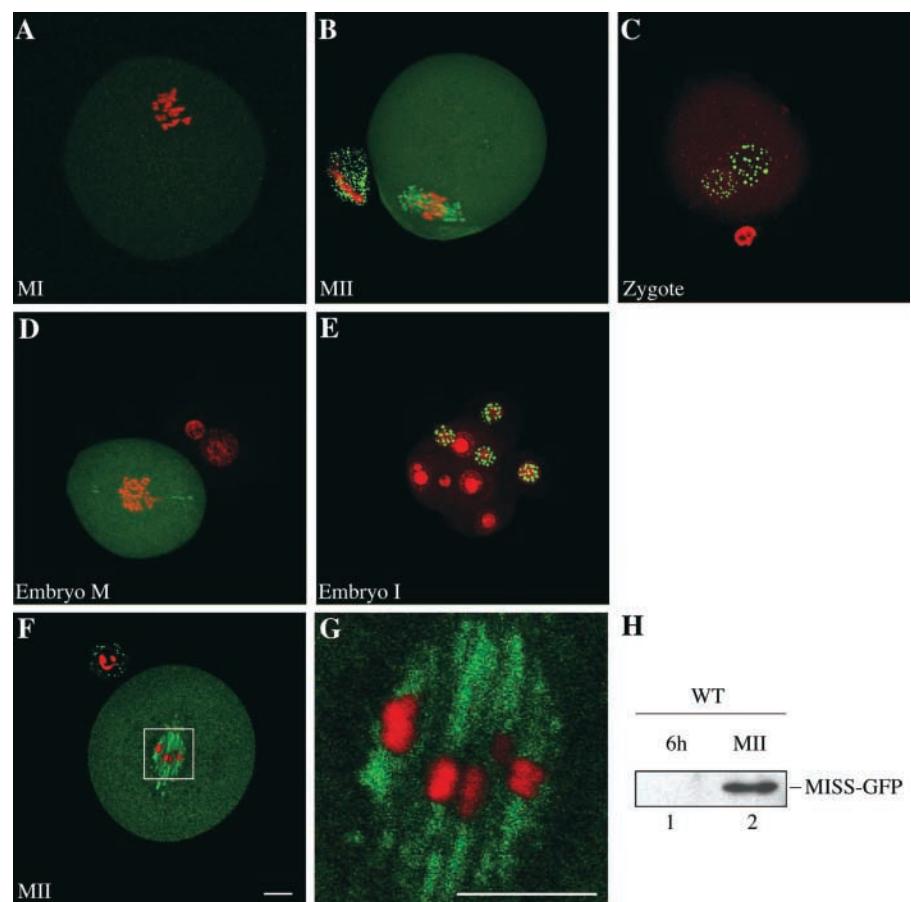
Figure 3. Immunofluorescent staining of MISS in oocytes and early embryos. Groups of 20–30 oocytes at different stages of meiotic maturation were fixed with formaldehyde and further stained with an affinity-purified anti-MISS antibody. All oocytes were analyzed by confocal microscopy using identical settings. (A) Immature oocytes (GV). (B) MI oocyte. (C and D) MII oocyte. (E) Two cell stage embryo. (F) MII oocyte stained with the affinity-purified antibody preincubated with 30 mM of the immunogenic peptide. This experiment was repeated three times. The MISS staining appears in green and chromosomes in red. Bar, 10 μm.

otic maturation. Indeed, the overexpressed MISS-GFP protein is detected by immunoblotting in MII oocytes (Fig. 4 F), and no localization of the MISS-GFP protein is detected in MI oocytes (Fig. 4 A). In MII oocytes, the MISS-GFP localizes in patches along fibers that evoke kinetochore fibers emanating from the chromosomes (Fig. 4, B, F, and G). The MISS-GFP protein also localizes along the spindle in mitotic dividing embryos (Fig. 4 D). After activation and in interphase, the MISS-GFP protein is completely excluded from the cytoplasm and present only in the nucleus, where small dots are observed (Fig. 4, C and E). This result suggests that the NLS present in the protein is functional and involved in a tight regulation of MISS localization.

MISS is unstable in MI and stable in MII

Our anti-MISS antibody was not very sensitive by immunoblotting, as it required 2,000 MII oocytes (one mouse gives

Figure 4. MISS-GFP in mouse oocytes and embryos. Overexpression of MISS-GFP protein after microinjection of RNA coding MISS-GFP into wild-type oocytes, zygotes, and one blastomere of a late two cell stage embryo. Oocytes, zygotes, and embryos were fixed at the indicated stages and analyzed by confocal microscopy. For A–E, the projection of all confocal sections was performed. (A) Oocyte collected in MI. (B) Oocyte collected in MII. (C) Zygote with male and female pronuclei. (D) Two cell embryo injected into one blastomere that is in mitosis (M). (E) Eight cell embryo in interphase (I). (F) Oocyte collected in MII (only one confocal section). (G) Higher magnification of the chromatin area from the oocyte in D. Experiments have been repeated three times. The MISS-GFP staining appears in green and chromosomes in red. Bar, 10 μ m. (H) 20 injected oocytes collected 6 h (lane 1) and 12 h after GVBD (lane 2) were analyzed by immunoblotting using an anti-GFP antibody.



~40 oocytes). To analyze more easily the behavior of MISS during mouse meiotic maturation, we microinjected Myc-MISS RNA into mouse immature oocytes and followed the tagged protein during meiotic maturation.

First we checked that the Myc-MISS behaves like the endogenous MISS. Indeed, the exogenous protein could not be detected in immature oocytes, whereas it was present in mature oocytes (Fig. 5 A, lanes 1 and 2). We microinjected chimeric RNA that contained the MISS ORF flanked by the 5' and 3' UTR of the *Xenopus* β -globin gene, thus the translation of the Myc-MISS encoding RNA was not submitted to translational regulations by MISS endogenous 5' and 3' UTR. Using the same construct, we typically observed similar amounts of translation of the exogenous RNA both in immature and mature oocytes when allowed to overexpress for the same amount of time (Fig. 5 A; the levels of expression of Myc-ERK2 are similar in immature and mature oocytes).

Then, we injected a pool of GV oocytes with RNA coding for Myc-MISS and cultured them for the same total amount of time (14 h). We collected them at different stages after meiosis resumption: early MI (2–6 h after GVBD); late MI (8 h after GVBD); or MII (12 h after GVBD). This kind of experiment is possible in mouse oocytes by releasing oocytes after a different length of time spent in medium supplemented with dbcAMP. Meiosis resumption of mouse oocytes occurs spontaneously by removing the oocytes from the ovaries. However, they can be maintained at the GV stage by keeping them in a dbcAMP-containing medium (the dbcAMP mimics a high concentration of AMPc, which

has an inhibitory effect on meiosis resumption). In this way, each sample belongs to a pool of oocytes that were injected at the same time and that had expressed the protein for the same amount of time. We could not detect Myc-MISS protein in early MI oocytes (Fig. 5 B). Myc-MISS accumulates only late during meiotic maturation, around the first polar body extrusion (Fig. 5 B). It suggests that the protein is unstable in MI. We show here that Myc-MISS accumulates rapidly around the first polar body extrusion.

Because the kinetics of Myc-MISS accumulation are similar in wild-type compared with *mos*^{-/-} oocytes (Fig. 5 C), which do not have MAPK activity (Verlhac et al., 1996), the Mos.../MAPK pathway does not regulate MISS stability.

To demonstrate that Myc-MISS is indeed unstable in MI due to a high turnover of the protein, we examined its stability in oocytes incubated in nocodazole. In mouse oocytes, cyclin B1 is stabilized by nocodazole treatment, suggesting that its degradation requires intact microtubules (Kubiak et al., 1993). We treated Myc-MISS-injected oocytes with nocodazole for 3 h. As shown in Fig. 5 D, this treatment induces Myc-MISS and cyclin B1 accumulation before polar body extrusion. This shows that MISS is unstable in MI and is degraded by a microtubule-dependent mechanism.

To analyze MISS behavior after parthenogenetic activation, we microinjected Myc-MISS RNA into MII-arrested oocytes. Half of the injected oocytes were activated by ethanol treatment, whereas the other half was not treated. As shown in Fig. 5 E, Myc-MISS accumulates during the MII arrest (lanes 3 and 4), whereas it is unstable after activation (lanes 1 and 2).

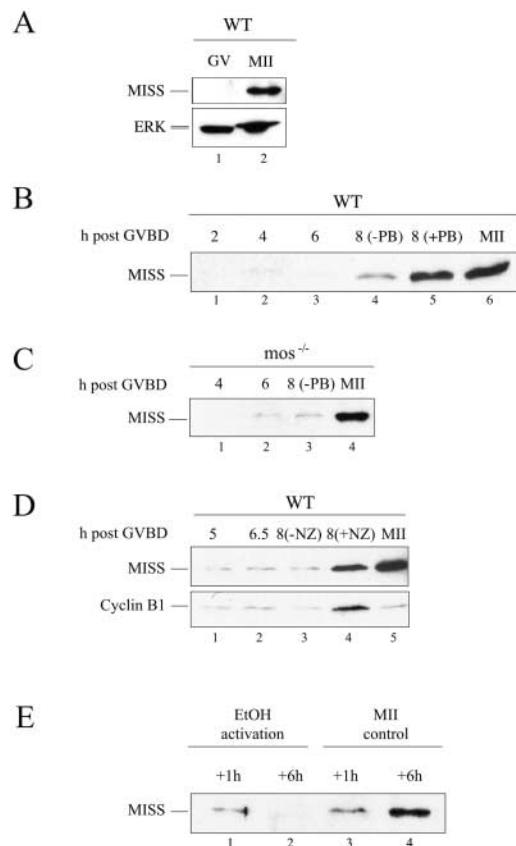


Figure 5. MISS is unstable in MI and activated oocytes and stable in MII oocytes. For A–D, a pool of immature oocytes was injected with RNA and cultured for 14 h. Each sample corresponds to a pool of 20–40 oocytes from the same injection and to oocytes that have expressed the protein for the same amount of time (14 h). Experiments have been repeated three to four times. (A) Overexpression of Myc-MISS protein (top) or Myc-ERK2 (bottom) after microinjection of the corresponding RNA into wild-type immature oocytes. 20 oocytes were collected as immature (lane 1) or mature (12 h after GVBD; lane 2). (B) Myc-MISS-injected wild-type oocytes were collected 2 h (lane 1), 4 h (lane 2), 6 h (lane 3), 8 h (before polar body extrusion; lane 4), 8 h (after polar body extrusion; lane 5), or 12 h (lane 6) after GVBD. (C) Myc-MISS-injected mos^{-/-} oocytes were collected 4 h (lane 1), 6 h (lane 2), 8 h (before polar body extrusion; lane 3), or 12 h (lane 4) after GVBD. (D) Myc-MISS-injected wild-type oocytes were collected 5 h (lane 1), 6.5 h (lane 2), 8 h (before polar body extrusion; lane 3), or 12 h (lane 5) after GVBD. Oocytes microinjected with Myc-MISS were also cultured for 5 h after GVBD, incubated for 3 h in nocodazole (NZ; 10 μ M), and collected (lane 4). The top panel is the anti-Myc immunoblot, and the bottom panel is the anti-cyclin B1 immunoblot. (E) Myc-MISS-injected wild-type oocytes were activated by ethanol treatment (lanes 1 and 2) or not (lanes 3 and 4) and further cultured for 1 or 6 h. All samples, except bottom blot in D, were analyzed by immunoblotting using an anti-Myc antibody.

As we observed by immunofluorescence on the endogenous protein, Myc-MISS protein accumulated late in MI. Based on the nocodazole experiment and the behavior of other Myc-tagged proteins in mouse oocytes (i.e., Myc-ERK2; Fig. 5 A; Verlhac et al., 2000b), we conclude that MISS is stabilized only during the MII stage.

Myc-MISS is a substrate of the Mos/.../MAPK pathway

The protein sequence of MISS displays four potential ERK phosphorylation sites and a MAPK docking site. We have

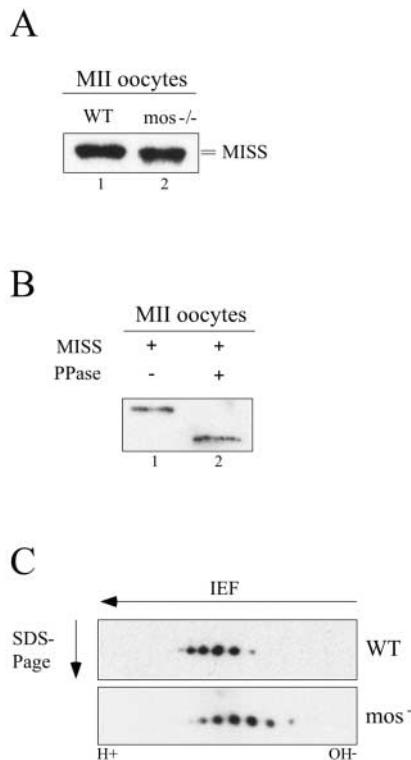
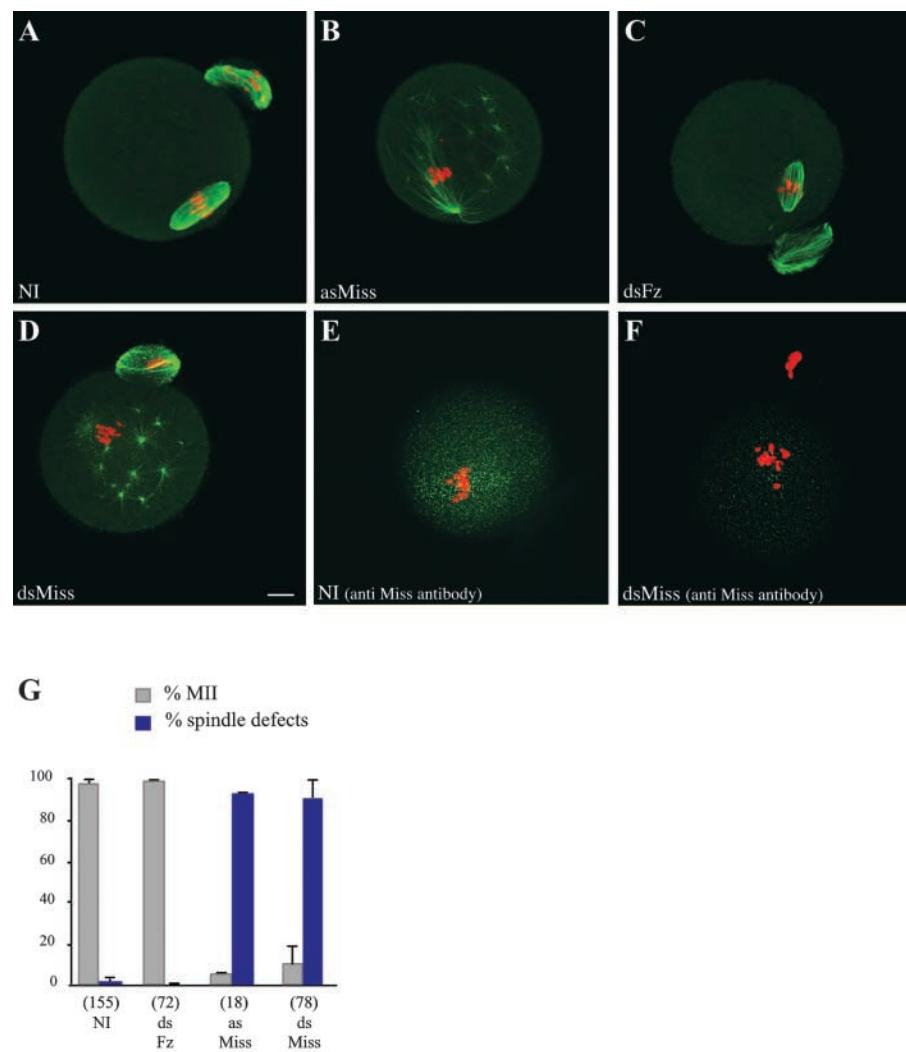


Figure 6. Myc-MISS is a substrate of the Mos/.../MAPK pathway. (A) Myc-MISS-injected oocytes from wild-type (lane 1) or mos^{-/-} (lane 2) mice were cultured for 14 h after GVBD and then collected. In the mos^{-/-} oocytes (lane 2), the electrophoretic migration of Myc-MISS is faster compared with its mobility in wild-type oocytes (lane 1). (B) In vitro dephosphorylation of Myc-MISS in oocyte extracts. 30 oocytes were injected with RNA encoding Myc-MISS, cultured 14 h after GVBD, collected in water, and incubated without (lane 1) or with 400 U of λ -phosphatase (lane 2). (C) Overexpression of Myc-MISS protein after microinjection of RNA encoding Myc-MISS into immature wild-type or mos^{-/-} oocytes. 40 oocytes were collected 14 h after GVBD and were analyzed by 2D gel electrophoresis. The migration of Myc-MISS shifts toward the acidic pole (H^+) in wild-type oocytes, compared with its migration in mos^{-/-} oocytes. We have used an internal control to compare the position of dots (Louvet-Vallee et al., 2001). Experiments have been repeated three times. All samples were analyzed by immunoblotting using an anti-Myc antibody.

shown that active MAPK can phosphorylate MISS in vitro (unpublished data). To determine whether the protein is an in vivo substrate of MAPK, we checked for its electrophoretic mobility in oocytes from mos^{-/-} oocytes. In these oocytes, the migration of Myc-MISS is faster compared with its electrophoretic mobility in wild-type oocytes, reflecting a posttranslational modification of Myc-MISS in wild-type oocytes (Fig. 6 A). Among the posttranslational modifications, we show that at least some of them are associated with phosphorylation. Indeed, treatment of the protein isolated from MII-arrested oocytes with λ -phosphatase induced a downshift of its electrophoretic mobility (Fig. 6 B, compare lanes 1 and 2).

Moreover, the migration of Myc-MISS in 2D gel electrophoresis is shifted to the acidic pole (H^+) in wild-type oocytes compared with its migration in mos^{-/-} oocytes (Fig. 6 C). Because phosphorylations are associated with negative charges, this result suggests that the protein is more phosphorylated in wild-type oocytes compared with mos^{-/-} oocytes.

Figure 7. Depletion of MISS mRNA induces severe spindle defects in MII-arrested oocytes. Immature oocytes were microinjected with asRNA (asMISS) or dsRNA (dsMISS or dsFz) directed against MISS or *Xenopus* frizzled mRNA, collected 14 h after GVBD, fixed, and analyzed by confocal microscopy. For each oocyte, the projection of all confocal sections was performed. (A) Noninjected oocyte (NI) arrested in MII. (B) Oocyte injected with asMISS. (C) Oocyte injected with dsFz (control). (D) Oocyte injected with dsMISS. Microtubules appear in green. (E and F) Oocytes stained with the anti-MISS peptide antibody. (E) Non-injected oocyte in MII. (F) Oocyte injected with dsMISS. For all images, chromosomes appear in red. Bar, 10 μ m. (G) Statistics of the experiment described above. Percent MII, percentage of oocytes presenting a normal bipolar MII spindle; % spindle defects, percentage of oocytes showing monopolar spindle, no spindle, and numerous asters in the cytoplasm. The numbers in brackets correspond to the total number of oocytes analyzed.



Altogether our results show that Myc–MISS is an *in vivo* substrate of the Mos/.../MAPK pathway.

Interfering with endogenous MISS mRNA induces severe spindle defects in MII-arrested oocytes

To determine the potential role of MISS during mouse meiotic maturation, we decided to interfere with endogenous mRNA expression. Three different types of molecules were used. First, asRNA (asMISS) or dsRNA (dsMISS) directed against the full-length ORF were microinjected into immature oocytes. The microinjection of either asRNA or dsRNA directed against endogenous MISS mRNA had no effect on GVBD or first polar body extrusion (data not shown). However, both injections induced severe spindle disorganization in MII-arrested oocytes. As shown in Fig. 7, B and D, the MII spindle loses its bipolarity and numerous asters appear in the cytoplasm. This phenotype is visible right after the MII spindle is formed (13 h after GVBD). It is never observed in noninjected oocytes or in oocytes injected with an irrelevant dsRNA at the same concentration and directed against *Xenopus* frizzled 7 (Fig. 7, A and C). As expected, the injection of dsMISS induced a disappearance of MISS endogenous protein in MII oocytes (Fig. 7, compare E and F). Moreover, this phenotype was highly reproducible, as it was observed in >90% of the 96 asMISS- or dsMISS-injected

oocytes (Fig. 7 E). Interestingly, this phenotype is similar to the one observed in *mos*^{-/-} oocytes, which arrest in metaphase III (MIII) with monopolar spindles after second polar body extrusion (Fig. 8 F; Verlhac et al., 1996).

To prove that the spindle phenotype we observed was specific, we then microinjected morpholino oligonucleotides directed against 25 bp upstream of the first ATG (Summerton and Weller, 1997). Again we observed the same phenotype after injection of morpholino directed against MISS endogenous mRNA (Fig. 8 C), but not after injection of the same morpholino presenting five mismatches, as recommended by the manufacturer (Fig. 8 A). The spindle defects observed after injection of the morpholino oligonucleotide were reproducible and were observed in 63% of the cases (Fig. 8 G). We could further show that these defects were specific by rescuing them with an RNA encoding Myc–MISS, which does not contain the 5' UTR sequence and is therefore not targeted by the morpholino. The same oocytes were first injected with control morpholino or anti-MISS morpholino, and then were injected with Myc–MISS-encoding RNA. As shown in Fig. 8, B and D, the injection of Myc–MISS alone or the coinjection of the control morpholino together with Myc–MISS had no effect on spindle organization. However, the injection of Myc–MISS restored normal MII spindle organization (Fig. 8,

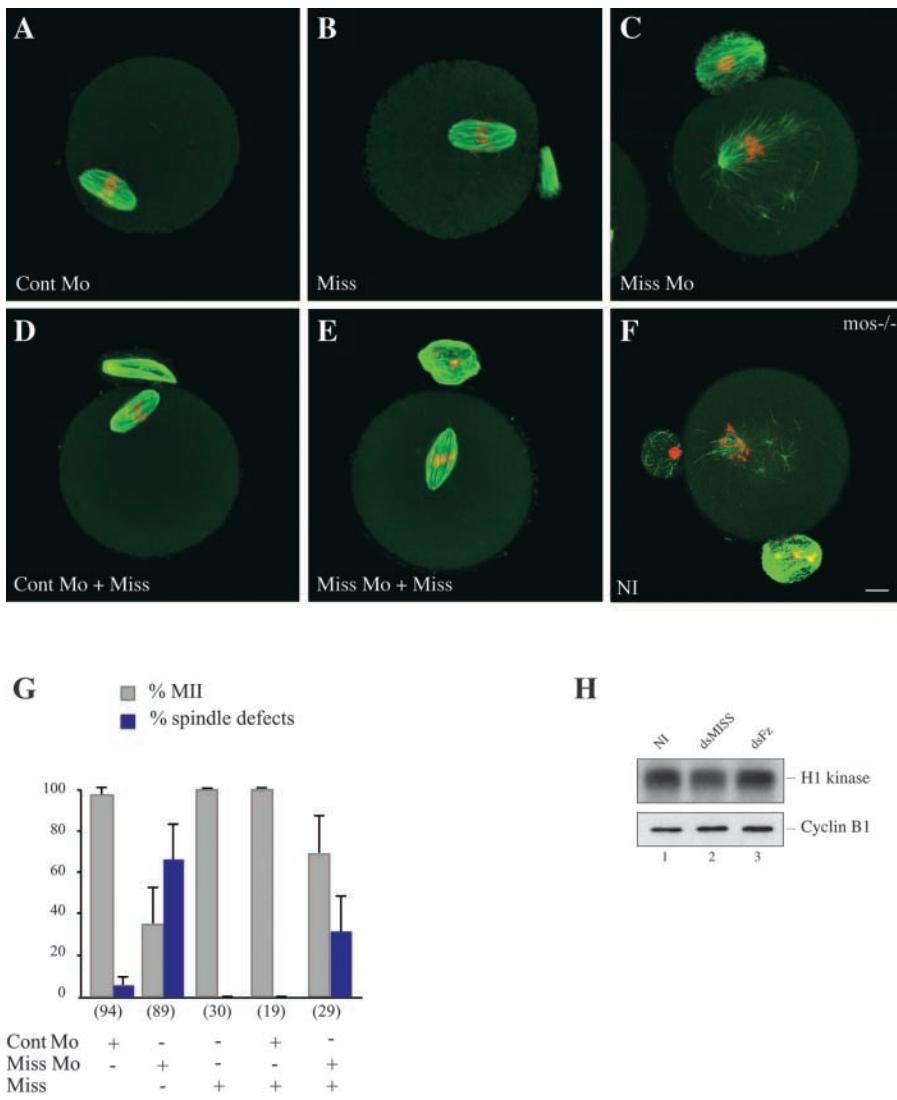


Figure 8. Myc-MISS rescues the depletion of endogenous MISS mRNA after morpholino injection. Immature oocytes were microinjected, collected 14 h after GVBD, fixed, and analyzed by confocal microscopy. For each oocyte, the projection of all confocal sections was performed. (A) Oocyte injected with MISS morpholino containing five mismatches (Cont Mo) as a control. (B) Oocyte injected with Myc-MISS RNA (MISS). (C) Oocyte injected with MISS morpholino (MISS Mo). (D) Oocyte coinjected with both control morpholino and Myc-MISS RNA (Cont Mo+MISS). (E) Oocyte coinjected with both MISS morpholino and Myc-MISS RNA (MISS Mo+MISS). (F) Noninjected (NI) *mos*^{-/-} oocyte arrested in MIII with a monopolar spindle. Microtubules appear in green and chromosomes in red. Bar, 10 μ m. (G) Statistics of the experiment described above. Percent MII, percentage of oocytes presenting a normal bipolar MII spindle; % spindle defects, percentage of oocytes showing monopolar spindle, no spindle, and numerous asters in the cytoplasm. The numbers in brackets correspond to the total number of oocytes analyzed. (H) Histone H1 kinase activity and amount of cyclin B1 in treated oocytes. Oocytes either noninjected (NI; lane 1) or injected with dsMISS (lane 2) or dsFz (lane 3) were collected 12 h after GVBD and analyzed for histone H1 kinase activity (top) and amount of cyclin B1 (bottom).

E and G). The coinjection of anti-MISS morpholino with Myc-MISS RNA induced \sim 2.5 times less oocytes with MII spindle defects than injection of the anti-MISS morpholino alone. MII spindle destabilization in the treated oocytes was not due to cyclin B1 degradation or global drop in histone H1 kinase activity, as shown in Fig. 8 H.

The fact that we observed the same phenotype using three different types of molecules directed against endogenous MISS mRNA, and not with control molecules, is a strong argument in favor of the specificity of the observed spindle defects. This is further demonstrated by the rescue experiment using Myc-MISS RNA in morpholino-injected oocytes.

Altogether our results using three different approaches demonstrate that MISS maintains a bipolar MII spindle during the CSF arrest of mouse oocytes.

MISS does not induce mitotic spindle destabilization in early embryos

Considering the severe phenotypes observed on MII spindles, we can assume that if such spindle defects are observed after injection of dsMISS into early embryos, they should block cell cycle progression. Indeed, similar defects are observed in *mos*^{-/-} oocytes (Fig. 8 F) and induce an MIII arrest. To test this hy-

pothesis and therefore see whether MISS also stabilizes mitotic spindles, we microinjected dsMISS into either zygotes or two cell embryos and checked whether cell cycle progression was inhibited. The injection of dsMISS into zygotes does not block the division from the one to two cell stage: 99% ($n = 38$) of dsMISS-injected zygotes undergo the one to two cell division like the control ($n = 36$) dsFz-injected ones. Also, dsMISS injection does not block the two to four cell division: 79% ($n = 68$) of dsMISS-injected two cell blastomeres divided to four cell blastomeres, comparable to 81% ($n = 70$) of dsFz-injected blastomeres. We checked that our dsMISS were indeed efficient by coinjecting them together with MISS-GFP RNA (Fig. 9). As for zygotes in interphase (Fig. 4 C), the MISS-GFP protein accumulated in the nuclei of the injected blastomeres (Fig. 9 B). However, the MISS-GFP accumulation was very weak when coinjected with dsMISS, compared with its coinjection with dsFz (Fig. 9, B and D). We confirmed this by immunoblotting with an anti-GFP antibody (Fig. 9 E). The MISS-GFP protein accumulated in dsFz- but not in dsMISS-injected blastomeres.

These experiments demonstrate the specificity and high efficiency of our dsMISS; it can almost completely abolish expression of a protein from an abundant exogenous and normally overexpressed RNA. These experiments are consistent

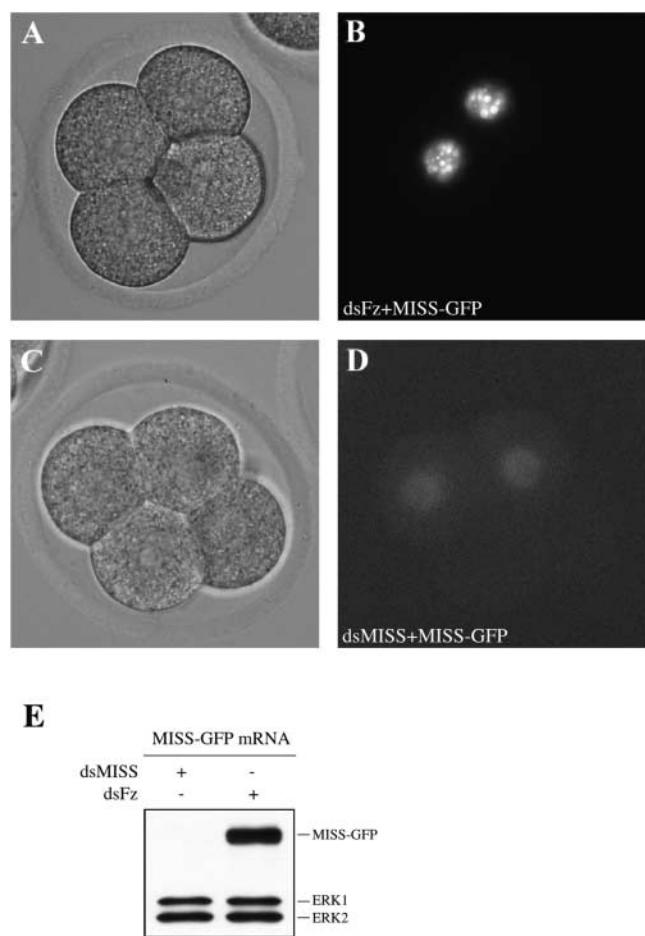


Figure 9. Injection of dsMISS does not block early mitotic divisions. Late two cell embryos were coinjected into one blastomere either with dsRNA against *Xenopus* frizzled 7 (dsFz; A and B) or dsRNA against MISS (dsMISS; C and D) together with the MISS-GFP RNA, and were collected after one division. Live embryos were first observed using a video microscope equipped with a CCD camera (transmitted light on the left; GFP staining on the right), and then embryos were analyzed by immunoblotting using an anti-GFP (top) and an anti-ERK (bottom) antibody (E). The anti-ERK immunoblot serves as a loading control.

with the lack of endogenous MISS staining observed in early mouse embryos and suggest that MISS does not regulate early mitotic divisions.

Discussion

Construction of the cDNA library and isolation of MISS

When we started this project, two two-hybrid screens had been performed using MAPK as a bait (Cook et al., 1996; Waskiewicz et al., 1997). However, no screen had been performed with a mammalian library prepared from synchronized cells where MAPK is known to play an important role. We therefore chose mouse immature oocytes for construction of our cDNA library. These oocytes do not contain mRNA involved in the support of the whole development, as is the case for *Xenopus* oocytes, but they present only mRNA essential for supporting meiotic maturation as well as the first zygotic division. Despite the low amount of RNA present in a mouse oocyte (~ 1 pg of polyA per oocyte), we

were able to construct a cDNA library. To our knowledge our cDNA library is the sole library of this kind available. It provides an opportunity for the functional screening and discovery of mouse genes involved in meiotic maturation as well as early development.

From the screen performed using ERK2 as bait, we isolated a novel protein, MISS, to which, except for a potential human homologue, we cannot find any obvious homologues in the databases. MISS is very rich in proline residues in its NH₂-terminal end and has four potential ERK2 phosphorylation sites, a perfect PEST sequence, and a bipartite NLS that contains a potential MAPK docking site. We confirmed biochemically the two-hybrid interaction by showing that MISS coimmunoprecipitates with endogenous MAPK.

We show by RT-PCR that the mRNA is present in immature oocytes as well as early mouse embryos. We also show by immunoblotting and immunofluorescence using an affinity-purified antipeptide antibody that MISS protein is present in mouse mature oocytes.

MISS is stabilized only in MII and is phosphorylated by the Mos/.../MAPK pathway

Both by immunoblotting and immunofluorescence, we show that although the mRNAs are present in immature oocytes, MISS protein is absent from these oocytes. The endogenous protein starts to accumulate late in MI, around the first polar body extrusion. RNA encoding MISS, fused either to a Myc epitope in an NH₂-terminal position or to a GFP epitope in a COOH-terminal position, cannot induce MISS accumulation in GV or early MI oocytes, whereas RNA encoding Myc-ERK2 is typically associated with similar accumulation of Myc-ERK2 in GV and MII oocytes. Moreover, treatment of injected oocytes with nocodazole induces accumulation of the protein in MI, where it normally does not accumulate. Altogether, these data show that MISS is unstable in MI. The stabilization of the protein occurs in MII, after the first polar body extrusion. After parthenogenetic activation, the Myc-MISS protein does not accumulate and is, therefore, probably degraded. This observation is consistent with the fact that we cannot detect endogenous MISS in early embryos by immunofluorescence. The regulation of MISS stability during meiosis is in agreement with the presence of a true PEST sequence in the protein.

The activity that is involved in MISS degradation during MI and disappears in MII does not depend on the Mos/.../MAPK pathway because Myc-MISS also accumulates in *mos*^{-/-} oocytes.

From studies in *Xenopus* oocytes, we know that MISS is phosphorylated by active MAPK in vitro (unpublished data), and we show that *in vivo*, MISS is partly phosphorylated by the Mos/.../MAPK pathway. First, we show that MISS is hyperphosphorylated in MII oocytes. Indeed, both endogenous and Myc-tagged MISS migrate at an apparent molecular weight much higher than the calculated one (45 instead of 29 kD), suggesting the presence of posttranslational modifications. Second, Myc-MISS protein migrates as discrete spots in 2D gel electrophoresis, which suggests different phosphorylation states. Third, treatment of Myc-MISS from MII oocytes with λ -phosphatase induces a severe downshift of the protein. Eventually, we show by 1D and

2D electrophoresis that Myc–MISS is in part phosphorylated by the Mos/.../MAPK pathway.

As MISS is stable only in MII, it is reasonable to assume that the protein is regulated in two steps: (1) stabilization, which is independent of the Mos/.../MAPK pathway but might depend on phosphorylation events by other kinases, and, most likely, (2) full activation through phosphorylation by the Mos/.../MAPK pathway. This implies that the protein is mainly active in MII, when CSF activity is present (Masui and Markert, 1971).

MISS is localized in dots on the MII spindles and disappears after fertilization

The endogenous MISS accumulates in dots on the MII spindles. Also, a MISS–GFP fusion protein shows a strong localization of the protein as bigger patches along fibers that evoke kinetochore microtubules of the MII spindles. In interphase, although we cannot detect the endogenous MISS protein, the MISS–GFP protein concentrates into dots inside the nucleus and is excluded from the cytoplasm. This suggests that the NLS present in the protein is functional.

We cannot explain why the MISS–GFP protein accumulates in early embryos when the endogenous protein does not. One explanation could be that the activity that degrades MISS in GV, early MI, and activated oocytes is no longer present in early embryos, and therefore allows accumulation of an exogenous MISS–GFP protein, whereas it does not allow its accumulation in GV or early MI oocytes. This would imply that a mechanism specific to meiotic maturation controls MISS stability, and this mechanism disappears in early embryos. Alternatively, MISS could undergo other post-translational modifications during early development that prevent its recognition by the antipeptide antibody.

Nonetheless, we believe that MISS is no longer synthesized during early development. First, we showed that Myc–MISS, which behaves like endogenous MISS and can rescue the depletion of the endogenous protein, is no longer accumulated after parthenogenetic activation. Second, we showed that dsMISS has no effect on the first two mitotic divisions, although we demonstrated its activity on abundant exogenous MISS–GFP RNA.

MISS is involved in MII spindle stability during the CSF arrest of mouse oocytes

The localization of MISS and MISS–GFP to MII spindles is consistent with the phenotypes obtained after asRNA, dsRNA, and morpholino injection. Indeed, interfering with the endogenous mRNA by three different means induces severe spindle defects only in MII oocytes, where the protein is present, stable, and probably active. Moreover, we show that the phenotype is associated with a lack of accumulation of endogenous MISS protein in MII. Oocytes that do not possess MISS protein show disorganized spindles often lacking one pole, or have long microtubules emanating from both poles and numerous cytoplasmic asters, which are likely nucleated by cytoplasmic microtubule organizing centers (Maro et al., 1985). The phenotype is specific, because it is rescued by reintroducing Myc–MISS-encoding RNA into anti-MISS morpholino-injected oocytes. This phenotype is also very consistent with the micro-

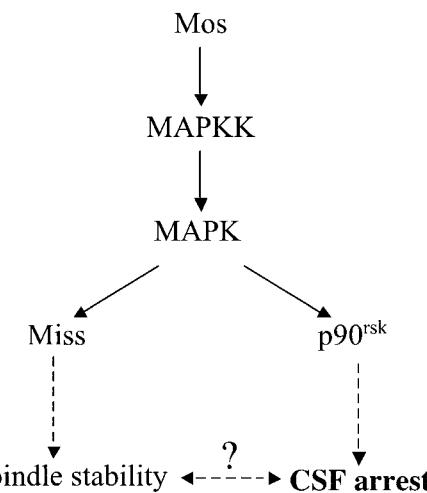


Figure 10. Proposed model for the role of MISS during mouse meiotic maturation. See text for details.

tubule defects observed in *mos^{-/-}* oocytes and with the localization of MAPK at spindle poles of mouse oocytes (Verlhac et al., 1994, 1996). The fact that *mos^{-/-}* oocytes present some spindle defects could be due to MISS, which is not fully phosphorylated in this strain and probably not active.

Our results suggest that MISS is a spindle-associated protein that is involved in the stabilization of the MII spindle during the CSF arrest. As mentioned in the introduction, it is puzzling that although the Mos/.../MAPK cascade is active in MI, it does not induce CSF arrest in MI. MISS could be an important target of the MAPK cascade that is only stable in MII (Fig. 10). Because we do not observe a significant drop in histone H1 kinase activity as well as a degradation of cyclin B1 in oocytes treated with dsMISS, we think that MISS plays a role in controlling microtubule dynamics, through an interaction with a microtubule associated protein, rather than a direct role in CSF arrest (Fig. 10).

The discovery of this new protein brings some very important insights concerning the CSF arrest in vertebrate oocytes: some substrate(s) of the Mos/.../MAPK pathway is only stable during MII and the Mos/.../MAPK pathway acts not only on the stabilization of maturation-promoting factor (MPF) activity but also on spindle stability. It will be interesting to analyze the relationships between MII spindle stability and CSF arrest.

Materials and methods

Collection and culture of mouse oocytes

Immature oocytes arrested at prophase I of meiosis were obtained by removing ovaries from 11-week-old OF1(WT) and *mos^{-/-}* female mice. Oocytes were removed and cultured as previously described (Verlhac et al., 1996). Immunofluorescence was performed as previously described (Polanski et al., 1998). Nocodazole was diluted in the culture medium at 10 µM. Activation by ethanol was performed as previously described (Kubiak, 1989).

Preparation of the mouse oocyte cDNA expression library

Immature oocytes were removed as previously described (Verlhac et al., 1996), collected in sterile PBS, frozen immediately in dry ice, and stored at –80°C. Samples corresponding to 1,200 oocytes were lysed by freezing and thawing. RNA was prepared using the Rneasy Mini Kit (QIAGEN). The genomic DNA was digested by adding 2 U of RQ1 Dnase (Promega) and treating with 40 U of RNase inhibitor (Promega). The RNA was precipi-

tated with ethanol and resuspended in water treated with 0.1% diethyl-pyrocarbonate (H_2O -DEPC). Double-stranded cDNA was synthesized from RNA using a commercial cDNA synthesis kit (SMART PCR cDNA Synthesis Kit; CLONTECH Laboratories, Inc.), as recommended by the manufacturer, and using 5'-AAGCAGTGTAAACAACCGCAGACTGAATTCCGGGG and 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATCTCGAG(T)₁₈ primers for the first strand cDNA synthesis. PCR amplification was performed as described in the cDNA synthesis kit using 5'-AAGCAGTGTAAACAACCGCAGACTGAATTCCGGGG and 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAC-TAGTCTCGAGTT primers. The cDNAs between 500 pb and 1 kb were gel purified and cloned into pYESTrp (Invitrogen) at EcoRI and Xhol sites. We estimated that the cDNA library consisted of $\sim 3 \times 10^6$ transformants.

Two-hybrid screen

A two-hybrid screen was performed using the Hybrid Hunter Kit (Invitrogen). The bait constructs were generated by PCR amplification from plexA-ERK2WT and plexA-ERK2KD (Waskiewicz et al., 1997) using 5'-TGAC-TAGGATCCGTATGCCGGCGGGCG and 5'-TGCATCGAGTTAAC-ATCTGTATCCTGG primers and cloned as a BamH1/Xhol fragment into pEG202. plexA-Su(Fu) (mouse suppressor of fused) was a gift of A. Plessis (Institut Jacques Monod, Paris, France). We thank J. Cooper for the gift of the pLexA-ERKWT and plexA-ERKKD plasmids.

The pEG202-lexA-ERK2WT construct was introduced into the yeast EGY48 (*MAT_a ura3 trp1 his3 6lexAop-LEU2*) strain transformed with pSH18-34. pEG202-lexA-ERK2WT was tested for spontaneous activation of the LEU2 and lacZ reporter genes. The EGY48 strain transformed with pEG202-lexA-ERK2WT and pSH18-34 was further transformed with the cDNA library cloned into pYESTrp. We screened 4×10^6 transformants.

The two-hybrid tests of specificity were performed using different baits in the strain RFY206 mated with the strain EGY48 containing the potential positive clones.

RT-PCR assay

RT-PCR was processed as previously described (Ledan et al., 2001). PCR amplification was performed using 5'-ATGTATCCCTCATCCCTCA and 5'-TCATTTAGACCCTTCACTTTC primers.

Plasmid construction and in vitro synthesis of RNA

pRN3Myc-MISS was constructed by RT-PCR amplification from mouse ovaries. Total RNA was extracted using the Rneasy Mini Kit (QIAGEN). The reverse transcription was performed on 500 ng of RNA. The PCR amplification was done on 50 ng of RNA/DNA using 5'-ATGCGAATTCAAATGATCT-CCTTCATCCCT and 5'-ATGCGCCGCCGCTTAAATTAAACTGTATT primers. The 814-bp PCR product was then cloned into pRN3Myc₂. pRN3MISSGF was obtained by PCR subcloning at Xhol/EcoRI sites using 5'-ATGCCCTGAGATGTATCCCTCATCCCTCC and 5'-ATGCGAATTCTTAGACCCTTCACTTCA primers. The in vitro synthesis of capped RNA was performed as previously described (Verlhac et al., 2000b).

Microinjection

Microinjection of in vitro-transcribed RNA was performed as previously described (Verlhac et al., 2000b). The sequence of the control morpholino oligonucleotide is 5'-CATACTTCTGCTGCTGCCGTAG and the sequence of the anti-Miss morpholino oligonucleotide is 5'-CATTCTGTTG-GTGTGCTCCGAAG.

Coimmunoprecipitation in *Xenopus* oocyte extracts

Xenopus oocyte microinjection as well as extraction were performed as previously described (Gavin et al., 1999). For the immunoprecipitation of xp42^{mpk1}, we used an anti-ERK2 antibody conjugated to agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). *Xenopus* oocyte extracts (300 μ l) were precleared with 20 μ l of protein A coupled to agarose beads for 30 min at 4°C. The cleared extracts were then incubated for 2 h at 4°C with the antibody coupled to agarose beads. The beads were washed four times in lysis buffer supplemented with 150 mM NaCl and then processed for immunoblotting.

Dephosphorylation assay

Just after collection and lysis, oocytes were incubated with or without 400 U of λ -phosphatase (New England Biolabs, Inc.) in λ -phosphatase buffer at 37°C for 1 h and then processed for immunoblotting.

2D gel electrophoresis

Oocytes were stored at -80°C in water containing 1 μ M okadaic acid (LC Laboratories) and 80 μ M β -glycerophosphate. They were then processed as previously described (Louvet-Vallee et al., 2001).

Immunoblotting

Oocytes at the appropriate stage of maturation were collected in sample buffer (Laemmli, 1970) and heated for 3 min at 100°C. We used the following antibodies: an affinity-purified anti-MISS antibody directed against the peptide TMLHVNSQHESEGSK; the 9E10 monoclonal antibody (sc-40; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for Myc-tagged MISS; the monoclonal antibody (no. 1814460, Boehringer) against GFP-tagged MISS; the monoclonal antibody (no. M3530; Dako) against cyclin B1; and the anti-ERK antibody (sc-94; Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

We thank all the members of the Maro laboratory for their support during the course of this work. We thank P. Hossenlopp (Université Paris 6, Paris, France) for his help with the design of the immunogenic peptide. We thank R. Schwartzmann (Université Paris 6) for his help with confocal microscopy. We thank A. Plessis and members of the C. Isnard (Institut Jacques Monod) laboratory for giving yeast strains and plasmids and for their precious advice with the two-hybrid screen.

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (9913 and 5792 to M.H. Verlhac). C. Lefebvre and M.E. Terret are recipients of fellowships from the Ministère de l'Education et de la Recherche Technologique.

Submitted: 12 February 2002

Revised: 3 April 2002

Accepted: 5 April 2002

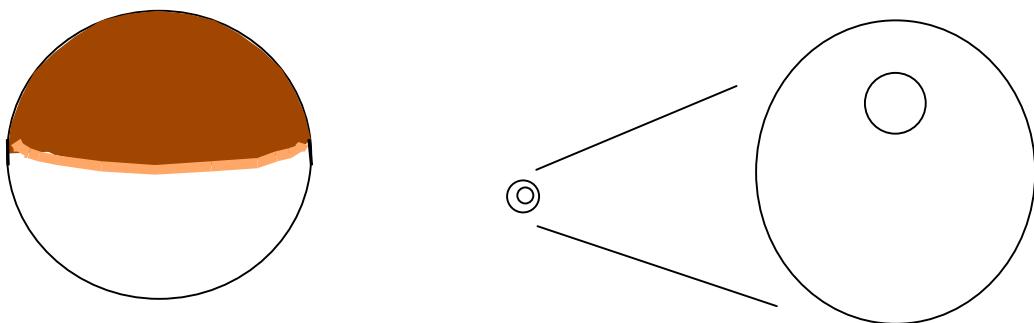
References

- Abrieu, A., M. Doree, and D. Fisher. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J. Cell Sci.* 114:257–267.
- Bhatt, R.R., and J.E. Ferrell, Jr. 1999. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*. 286:1362–1365.
- Choi, T.S., K. Fukasawa, R.P. Zhou, L. Tessarollo, K. Borror, J. Resau, and G.F. Vandewoude. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:7032–7035.
- Colledge, W.H., M.B.L. Carlton, G.B. Udy, and M.J. Evans. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370:65–68.
- Cook, J.G., L. Bardwell, S.J. Kron, and J. Thorner. 1996. Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10:2831–2848.
- Gavin, A.C., A. Ni Ainle, E. Chierici, M. Jones, and A.R. Nebreda. 1999. A p90(rsk) mutant constitutively interacting with MAP kinase uncouples MAP kinase from p34(cdc2)/cyclin B activation in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell*. 10:2971–2986.
- Gross, S.D., M.S. Schwab, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science*. 286:1365–1367.
- Gross, S.D., M.S. Schwab, F.E. Taieb, A.L. Lewellyn, Y.-W. Qian, and J.L. Maller. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90rsk. *Curr. Biol.* 10:430–438.
- Haccard, O., B. Sarcevic, A. Lewellyn, R. Hartley, L. Roy, T. Izumi, E. Erikson, and J.L. Maller. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*. 262:1262–1265.
- Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*. 370:68–71.
- Kawai, J., A. Shinagawa, K. Shibata, M. Yoshino, M. Itoh, Y. Ishii, T. Arakawa, A. Hara, Y. Fukunishi, H. Konno, et al. 2001. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature*. 409:685–690.
- Kubiak, J.Z. 1989. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev. Biol.* 136:537–545.
- Kubiak, J.Z., M. Weber, H. de Pennart, N. Winston, and B. Maro. 1993. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J.* 12:3773–3778.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Ledan, E., Z. Polanski, M.-E. Terret, and B. Maro. 2001. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.* 232:400–413.

- Louvet-Vallee, S., N. Dard, A. Santa-Maria, J. Aghion, and B. Maro. 2001. A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 231:190–200.
- Maro, B., S.K. Howlett, and M. Webb. 1985. Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *J. Cell Biol.* 101:1665–1672.
- Masui, Y., and C.L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129–145.
- Polanski, Z., E. Ledan, S. Brunet, S. Louvet, J.Z. Kubiak, M.-H. Verlhac, and B. Maro. 1998. Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development*. 125:4989–4997.
- Summerton, J., and D. Weller. 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187–195.
- Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida. 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2:110–116.
- Verlhac, M.-H., J.Z. Kubiak, H.J. Clarke, and B. Maro. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120:1017–1025.
- Verlhac, M.H., J.Z. Kubiak, M. Weber, G. Geraud, W.H. Colledge, M.J. Evans, and B. Maro. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*. 122:815–822.
- Verlhac, M.-H., C. Lefebvre, P. Guillaud, P. Rassinier, and B. Maro. 2000a. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr. Biol.* 10:1303–1306.
- Verlhac, M.H., C. Lefebvre, J.Z. Kubiak, M. Umbhauer, P. Rassinier, W. Colledge, and B. Maro. 2000b. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* 19:6065–6074.
- Waskiewicz, A.J., A. Flynn, C.G. Proud, and J.A. Cooper. 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16:1909–1920.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Figure 36: principales différences entre les ovocytes de xénope et de souris



Xénope

- 1,2mm
- Vitellus
- 30 mg protéines
- Expulsion du globule polaire invisible

Souris

- 70 μ m
- transparent
- 20 ng protéines
- Expulsion du globule polaire visible

I. TRANSITION MEIOSE I/MEIOSE II CHEZ LA SOURIS

J'ai montré que l'activité séparase est requise pour la ségrégation des chromosomes homologues en méiose I, suggérant que l'APC pourrait être requis dans ce processus. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Lee et collaborateurs, qui ont montré qu'en méiose mâle, la localisation de Rec8 est régulée de la même façon que celle de Rec8 de levure, suggérant que l'APC actif est requis pour faire la transition méiose I/méiose II en méiose mâle chez la souris (Lee et al., 2003). Ces résultats rapprochent la souris du nématode et de la levure chez lesquels l'APC et l'activité séparase sont requis pour effectuer la transition méiose I/méiose II. Chez le xénope en revanche, l'inhibition de l'APC ne bloque pas la transition méiose I/méiose II, qui peut se faire sans dégradation de la Cycline B et de la sécurine. Pourquoi une telle différence chez cette espèce ?

Le xénope peut avoir évolué différemment et avoir mis en place une voie spécifique, indépendante de l'APC, qui contrôlerait la ségrégation des chromosomes en méiose I et le déclenchement de l'anaphase.

L'ovocyte de xénope est géant comparé à l'ovocyte de souris (1000 fois plus gros, figure 36), mais les fuseaux de division ont la même taille. On peut imaginer que les expériences d'inhibition de l'APC faites chez le xénope n'affectent pas tout le pool d'APC actif en méiose I. Une fraction active de l'APC, par exemple localisée au niveau du fuseau de méiose I, n'aurait pas été inhibée (car protégée ?). La Cycline B serait donc globalement protégée de la dégradation, mais serait dégradée très localement par exemple au niveau du fuseau de méiose I. Cette dégradation de la Cycline B locale pourrait être suffisante pour déclencher l'anaphase et la séparation des chromosomes homologues. En mesurant une activité globale de MPF, peut-on détecter une baisse localisée de l'activité MPF? Chez l'embryon de drosophile par exemple, les divisions syncytiales précoces se font sans oscillations détectables du niveau global de Cycline ou d'activité CDK1 (Edgar et al., 1994). Pourtant il est établi que l'inactivation de CDK1 est locale et s'effectue près des pôles des fuseaux dans ces embryons (Su et al., 1998). Ce pourrait être aussi le cas chez le xénope. De plus, dans les ovocytes de cette espèce, l'expulsion du globule polaire est très difficile à suivre ainsi que la réalisation d'expériences d'immunofluorescence afin d'examiner l'état des chromosomes. Les auteurs ont peut-être été dans l'impossibilité de détecter des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues survenues en méiose I, ou bien des défauts de cinétique de la maturation méiotique (avec un arrêt transitoire en métaphase I par exemple). Cependant les mêmes

expériences ont été réalisées en métaphase II dans des ovocytes de xénope, montrant que l'APC est nécessaire à la transition métaphase II/anaphase II.

Le xénope semble donc pour l'instant une exception. La compréhension de son mode de division original en méiose I est importante et pourra peut-être se rapprocher d'autres modèles encore peu étudiés à l'heure actuelle comme l'Axolotl (où l'expulsion du globule polaire est visible à l'œil nu).

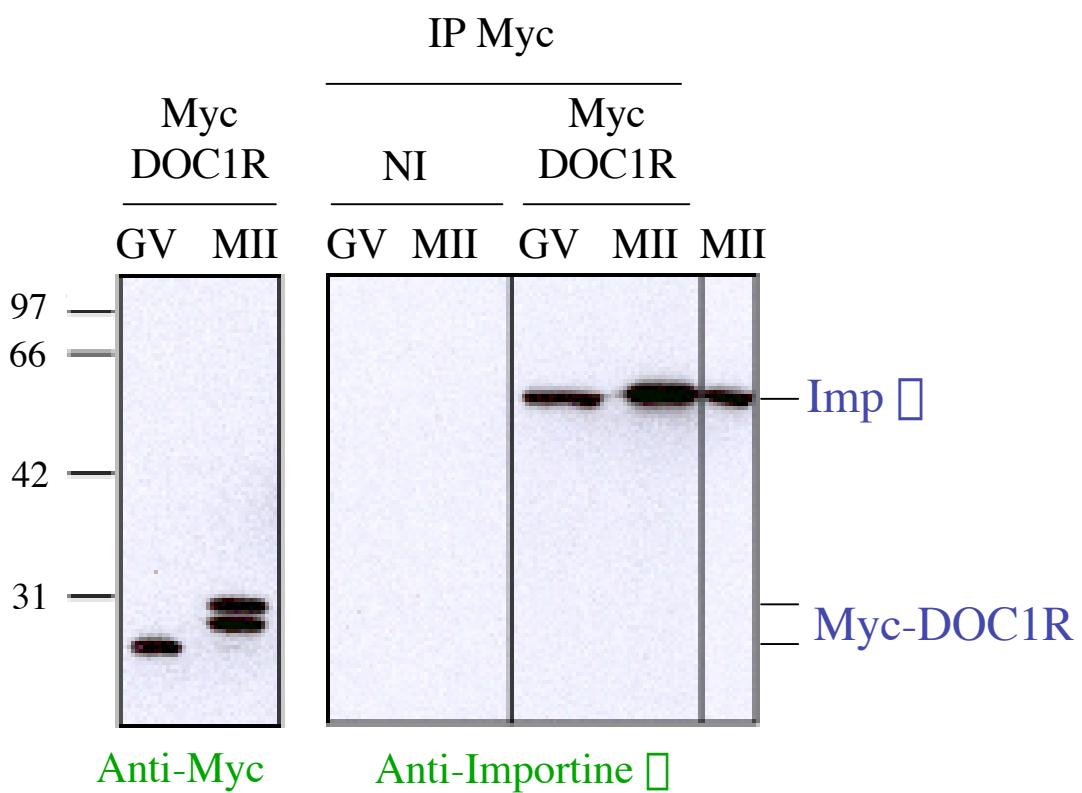
PERSPECTIVES

Des approches génétiques utilisant des souris transgéniques permettront de tester si l'APC est requis pour effectuer la méiose I, si Rec8 doit être clivée sur les bras des chromatides et protégée aux centromères et étudier le rôle de la séparase au cours de la transition méiose I/méiose II (souris invalidées pour le gène de la séparase, souris exprimant une cohésine Rec8 non dégradable).

Récemment, il a été montré que les souris invalidées pour la sous-unité APC2 de l'APC sont létales à l'état embryonnaire (Wirth et al., 2004). En croisant les souris APC2flox/Δ avec des souris Cre-ZP3 (ZP3 est le promoteur de la zona pellucida 3, spécifique de l'ovogénèse), il sera possible d'invalider APC2 uniquement dans la lignée germinale femelle afin d'appréhender le rôle de l'APC au cours de la méiose I.

Katja Wassmann a montré qu'il existait un point de contrôle du fuseau dépendant de Mad2 au cours de la méiose I chez la souris (Wassmann et al., 2003b) et Stéphane Brunet a montré que des altérations du fuseau empêchent la ségrégation des chromosomes en méiose I et l'inactivation du MPF. Bub1 se localise aux kinétochores et est phosphorylée jusqu'en anaphase des deux divisions méiotiques (Brunet et al., 2003). Ces résultats vont dans le sens d'un point de contrôle du fuseau fonctionnel en méiose I avec les mêmes acteurs qu'en mitose, suggérant que l'APC est requis pour la transition méiose I/méiose II. Pour prouver de façon directe que l'APC est impliqué dans la transition méiose I/méiose II, on peut penser à des stratégies visant à inhiber directement celui-ci (autres que la surexpression de Mad2 qui a déjà été réalisée, Wassmann et al., 2003b). Par exemple la microinjection d'ARN double-brins ciblant CDC27, la surexpression de Emi1 en méiose I, la surexpression d'une forme modifiée méthylée de l'ubiquitine, la microinjection d'ARN double-brins ciblant CDC20 ou la microinjection du peptide de la destruction box.

Figure 37: DOC1R co-immunoprécipite avec l'importine \square d'extraits d'ovocytes de xénope



II. NOUVEAUX SUBSTRATS DES MAPK DANS L'OVOCYTE DE SOURIS ET ARRET CSF

MISS et DOC1R jouent des rôles essentiels sur la stabilité du fuseau de métaphase II et sur l'organisation des microtubules durant l'arrêt CSF. L'arrêt CSF était jusqu'à présent caractérisé uniquement d'un point de vue moléculaire par une activité MPF élevée, passant par la voie Mos/.../MAPK et un effecteur unique, p90^{RSK}.

Ces travaux apportent une nouvelle vision de l'arrêt CSF. L'arrêt CSF se caractérise par une forte activité MPF, mais aussi par la présence d'un fuseau stable pendant des heures avec des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique. La stabilité du fuseau est essentielle au maintien de la fécondité du gamète et à la réussite du développement ultérieur du zygote. On peut penser que des ovocytes microinjectés avec des ARN double-brins ciblant MISS ou DOC1R auront des défauts de ségrégation des chromatides soeurs à l'anaphase.

Ces travaux suggèrent que la voie Mos/.../MAPK aurait des substrats autres que p90^{RSK}, impliqués dans le maintien de l'organisation du réseau de microtubules de l'ovocyte lors de l'arrêt CSF. Ces résultats sont à rapprocher de l'étude menée par Horne MM *et al* qui a montré que la MAPK permet la stabilité du fuseau de division mitotique via des cibles différentes de p90^{RSK}.

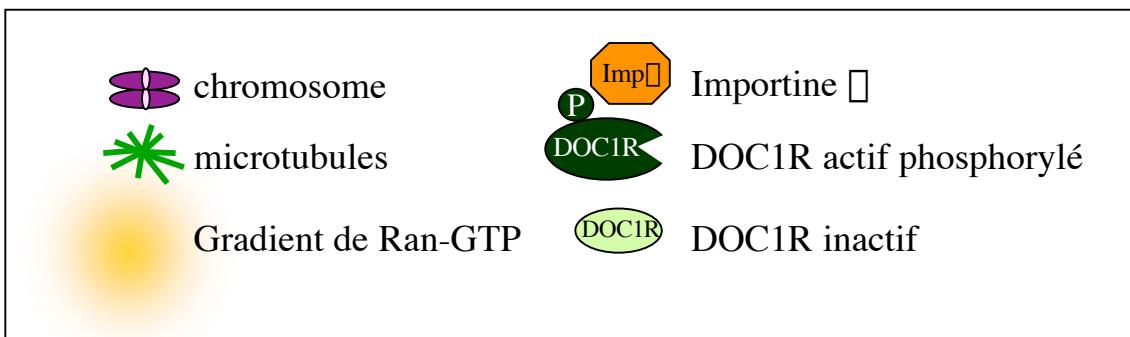
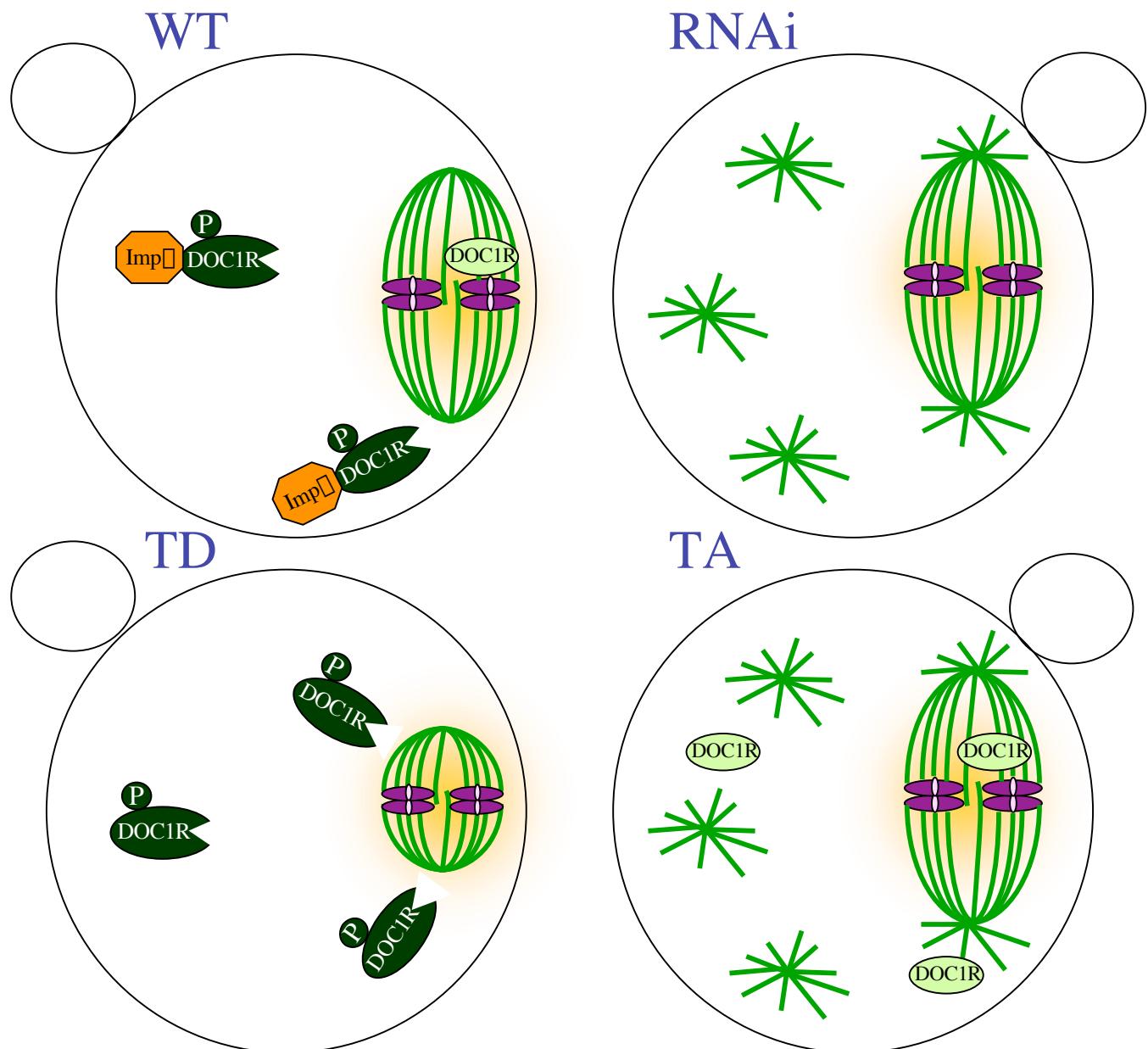
Enfin, DOC1R étant conservée entre le xénope et la souris, on peut imaginer que son rôle soit aussi conservé entre ces deux espèces.

PERSPECTIVES

1. Relation entre DOC1R et l'importine- α

Le phénotype obtenu après inhibition de la traduction de DOC1R pourrait s'apparenter à une diminution de l'influence stabilisatrice de la chromatine, des asters de microtubules se formant partout dans le cytoplasme. Ce phénotype est similaire de ce point de vue à la surexpression de Ran-GTP dans des extraits CSF de xénope. Nous avons donc émis l'hypothèse que le rôle de DOC1R sur l'organisation des microtubules pourrait passer par la voie Ran. De plus, DOC1R se comporte comme les cibles connues de la voie Ran: nucléaire en interphase et sur le fuseau au cours de la division cellulaire. De façon préliminaire, nous avons donc testé si DOC1R est capable d'interagir avec l'importine α . Par co-immunoprecipitation, j'ai mis en évidence une interaction de DOC1R avec l'importine- α .

Figure 38: hypothèse de travail



endogène d'extraits d'ovocytes de Xénope (figure 37). Ce résultat suggère que DOC1R régule l'organisation des microtubules peut-être par un mécanisme dépendant de la Ran-GTPase.

2. Relation entre DOC1R et les microtubules

J'aimerais comprendre comment DOC1R régule l'organisation des microtubules en métaphase II. Sachant qu'il ne ressemble ni à une MAPs ni à un moteur, son rôle sur le contrôle de l'organisation des microtubules pourrait être indirect. Cependant il sera important de déterminer si DOC1R interagit avec les microtubules directement ou non *in vitro*. Cette expérience sera effectuée en mettant en présence des microtubules polymérisés et de la protéine purifiée DOC1R puis par centrifugation des microtubules sur un gradient de sucrose. Si DOC1R n'interagit pas avec les microtubules directement, c'est que son rôle sur l'organisation des microtubules est indirect. Dans ce cas, il sera intéressant d'effectuer un crible double-hybride de la banque d'ADNc d'ovocytes de souris avec DOC1R comme appât. Les partenaires isolés nous permettront de mieux comprendre le rôle de DOC1R sur l'organisation des microtubules.

3. Relation entre fonction, régulation et localisation de DOC1R

Mon hypothèse de travail est que DOC1R, lorsqu'elle est active, déstabiliserait les microtubules (en se liant directement aux microtubules, ou de manière indirecte). Son état d'activation serait couplé à sa liaison ou non à l'importine α . DOC1R serait liée à l'importine α dans le cytoplasme et aux pôles du fuseau (hors du gradient de Ran-GTP). Cette interaction changerait la conformation de DOC1R et la rendrait accessible à la phosphorylation par la MAPK (et par d'autres kinases). Ces phosphorylations activeraient DOC1R. DOC1R liée à l'importine α et phosphorylée serait donc active et déstabiliserait les microtubules dans le cytoplasme et aux pôles du fuseau, impliquant l'absence de microtubules dans le cytoplasme et aux pôles des fuseaux dans des ovocytes contrôles (figure 38). A côté des chromosomes, dans le gradient de Ran-GTP, DOC1R et l'importine α se dissocieraient, DOC1R serait déphosphorylée et inactivée, permettant la stabilisation des microtubules autour de la chromatine et la formation du fuseau (figure 38). L'existence de ces différentes populations de DOC1R phosphorylée est confirmée par la présence de plusieurs points en électrophorèse bi-dimensionnelle en métaphase II au cours de l'arrêt CSF, indiquant que la population de

Figure 39: mutagénèse de DOC1R

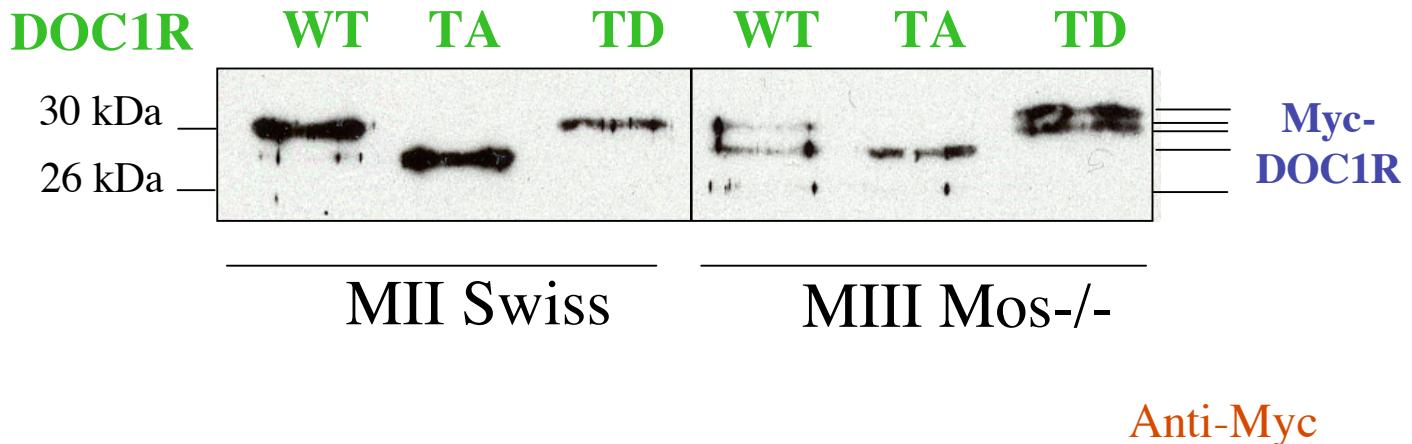
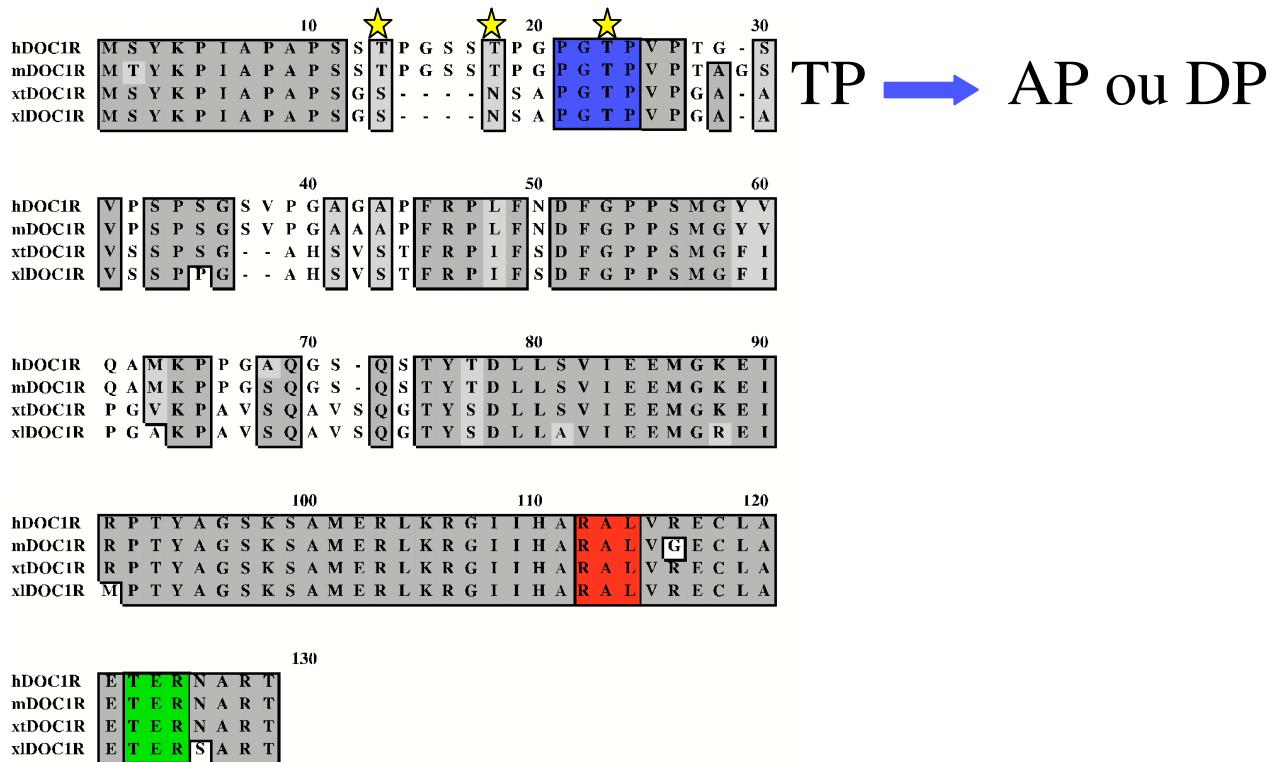
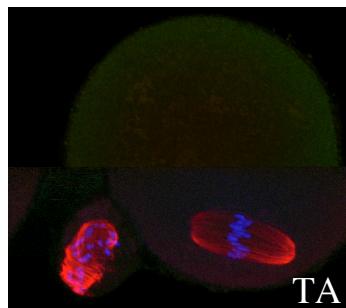
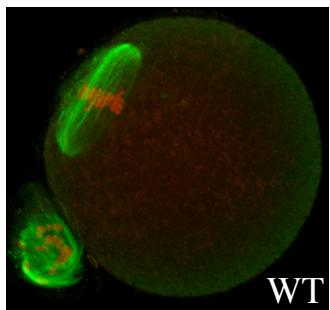
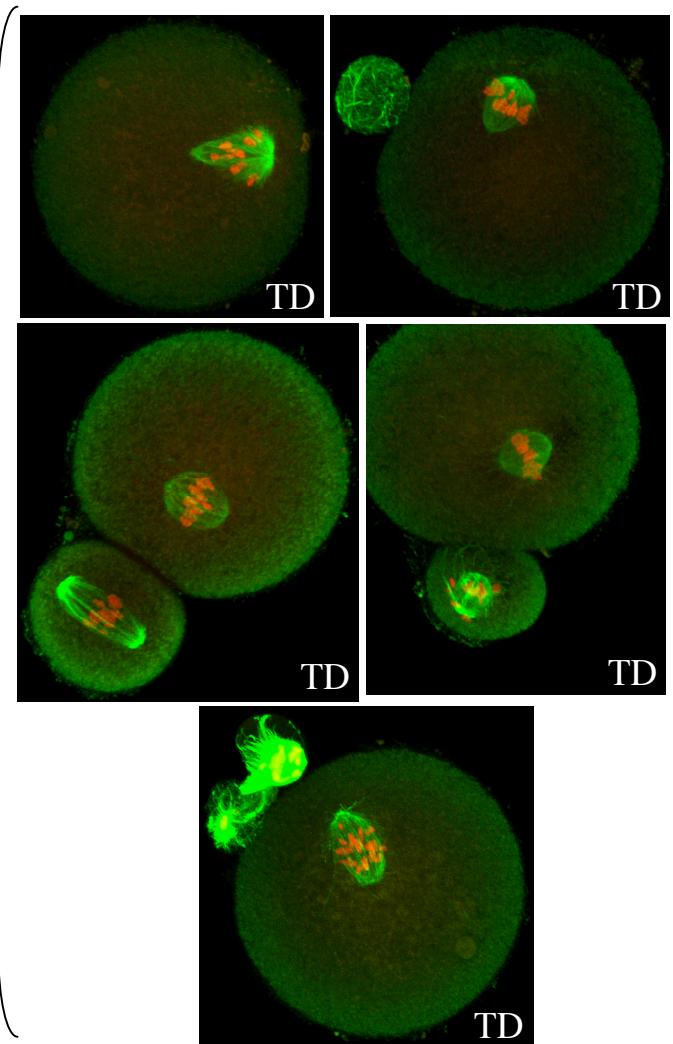
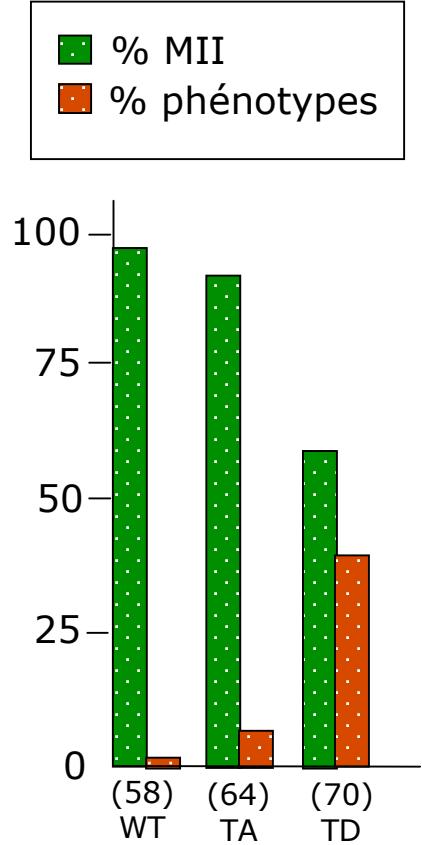


Figure 40: phénotypes obtenus après injection des mutants DOC1R de phosphorylation



Legend for fluorescence microscopy images:

- chromosomes (orange square)
- microtubules (green square)

DOC1R présente en métaphase II n'est pas phosphorylée de la même manière (Terret et al., 2003a).

Les résultats obtenus avec le RNAi vont dans le sens de cette hypothèse: lorsque DOC1R est déplétée de l'ovocyte, selon notre hypothèse, ça ne devrait rien changer près des chromosomes car dans le cas sauvage DOC1R serait inactive autour des chromosomes dans le gradient de Ran-GTP (figure 38). Dans le cytoplasme et aux pôles du fuseau en revanche, DOC1R active n'étant plus là pour déstabiliser les microtubules, ils devraient au contraire être stabilisés, d'où l'apparition d'asters dans le cytoplasme et de microtubules astraux. Nous observons en effet ce phénotype: asters dans le cytoplasme, microtubules astraux développés et fuseau normal (figure 38) (Terret et al., 2003a, article 2).

Afin de tester si les phosphorylations par la MAPK sont nécessaires à la fonction de DOC1R, j'ai effectué des mutagénèses dirigées des 3 sites potentiels de phosphorylation par la MAPK (mutant inactif S/T en A, ou mimant une phosphorylation S/T en D) (figure 39). Il faudra ensuite caractériser ces mutants en produisant les protéines purifiées correspondantes et en vérifiant qu'elles ne sont pas phosphorylables par la MAPK.

De manière préliminaire, j'ai injecté dans des ovocytes immatures de souris des ARN transcrits *in vitro* codant ces formes mutantes et j'ai analysé les effets sur la maturation méiotique.

- Selon notre hypothèse, le mutant des trois sites de phosphorylation par la MAPK (T13D, T18D, T23D que j'appellerai TD pour plus de commodité), s'il est constitutivement actif, devrait se comporter comme la fraction de DOC1R complexée avec l'importine α et phosphorylée par la MAPK dans le cas sauvage (figure 38). Dans le cytoplasme et près des pôles, ce mutant n'induirait pas de phénotype, car dans le cas sauvage la situation est la même, DOC1R étant active dans ces compartiments; il déstabiliseraient les microtubules (figure 38). Par contre près des chromosomes, ce mutant déstabiliseraient les microtubules indépendamment du gradient de Ran-GTP, induisant la formation de petits fuseaux (figure 38). C'est effectivement ce que j'observe dans les ovocytes de souris en métaphase II dans 40% des cas après microinjection des ARN codant pour la forme TD, sur un total de 70 ovocytes microinjectés (figure 40).

- Suivant notre raisonnement, le mutant des trois sites de phosphorylation par la MAPK (T13A, T18A, T23A que j'appellerai TA pour plus de commodité), s'il est constitutivement inactif, devrait se comporter comme la fraction de DOC1R libre et non phosphorylée par la MAPK. Si ce mutant se comporte comme un dominant négatif, on peut s'attendre à une stabilisation des microtubules autour des chromosomes comme dans le cas sauvage où DOC1R est inactive, mais aussi dans le cytoplasme et aux pôles du fuseau comme dans le cas du RNAi (figure 38). Par contre si ce mutant ne se comporte pas comme un dominant négatif, il restera toujours du DOC1R endogène actif dans le cytoplasme et aux pôles du fuseau, permettant d'avoir un ovocyte normal. C'est effectivement le cas, les ovocytes que j'ai injectés n'ont aucun phénotype, à part dans 7% des cas sur un total de 64 œufs microinjectés (figure 40). Pour m'affranchir de cette population de DOC1R endogène, je microinjecterai les ARN double-brins ciblant DOC1R endogène et ce mutant, ce qui devrait mimer du DOC1R inactif partout et induire le même phénotype que l'injection d'ARN double-brins ciblant DOC1R seule.

Finalement, ces résultats fourniront des réponses quant à l'importance de l'activité MAPK sur le contrôle de l'organisation des microtubules via DOC1R en métaphase II. Si notre hypothèse se confirme, DOC1R sera au carrefour de deux voies, la voie Mos/.../MAPK et la voie Ran.

4. Voie Ran et relation avec DOC1R

Avant tout, il s'agit de tester si Ran contrôle l'organisation (dynamique/nucléation) des fuseaux de division dans les ovocytes de souris comme c'est le cas dans divers organismes mitotiques et méiotiques. De manière préliminaire, j'ai microinjecté des ARN codant des formes mutantes de Ran liées au GDP (Ran T24N) ou au GTP (Ran Q69L) et j'ai analysé l'effet de ces injections sur la mise en place et l'organisation des fuseaux méiotiques. Ce projet continue actuellement et fait l'objet d'un sujet de thèse au laboratoire. Je n'en parlerai donc pas.

Ensuite, il faudra tester si l'interaction entre DOC1R et l'importine α est régulée par la voie Ran. Ces expériences seront réalisées en extraits d'œufs de xénopé, système de choix pour ce type de manipulations. Pour cela, des œufs de xénopé seront microinjectés avec de l'ARN codant pour DOC1R fusionnée avec un épitope Myc. Du Ran-GTP sera additionné dans les extraits d'œufs de xénopé obtenus (en utilisant un mutant de Ran, du Ran-Q69L). Des

expériences de co-immunoprecipitation entre DOC1R-Myc et l'importine α endogène seront ensuite réalisées. Si l'interaction entre DOC1R et l'importine α est régulée par la voie Ran, ces deux protéines ne devraient pas interagir dans un extrait additionné de Ran-GTP. La même expérience sera réalisée en ajoutant du Ran-T24N à l'extrait, permettant l'accumulation de Ran-GDP. Si l'interaction des deux protéines est régulée par la voie Ran, elles devraient interagir dans un contexte saturé en Ran-GDP.

Si l'interaction entre DOC1R et l'importine α est régulée par la voie Ran, une mutagénèse de DOC1R sera réalisée afin de déterminer son site d'interaction avec l'importine α . DOC1R ne possèdant pas de NLS évidente, cette mutagénèse sera indispensable pour déterminer le site d'interaction.

Une fois le site d'interaction de DOC1R avec l'importine α déterminé, un mutant de ce site sera injecté dans des ovocytes de souris. Selon notre hypothèse, ce mutant ne pouvant pas se lier à l'importine α devrait être inactif et se comporter comme le mutant de phosphorylation TA (figure 38).

A plus long terme, DOC1R étant conservée chez le xénope, il serait intéressant de tester si son rôle au cours de la maturation méiotique est conservé et d'effectuer toutes les expériences en extraits d'œufs de xénope avec DOC1R endogène de xénope. De plus, chez le xénope, les expériences de déplétion peuvent être réalisées (l'anticorps fabriqué contre DOC1R souris reconnaît potentiellement DOC1R xénope, le peptide étant contenu en C-terminal dans les deux séquences conservées), ce qui permettra par exemple de dépléter xDOC1R endogène et d'analyser le phénotype obtenu, puis de rajouter les formes xTD et xTA et d'analyser les résultats obtenus.

5. Rôle en mitose ?

Nous n'avons jamais testé la présence de DOC1R ailleurs que dans l'ovocyte de souris. Afin de déterminer si DOC1R est spécifique de la méiose, nous testerons la présence de la protéine DOC1R dans des cellules en culture et dans des embryons précoces de souris grâce à nos anticorps spécifiques. Si DOC1R est présente dans les cellules en culture ou dans les embryons de souris, nous testerons son rôle potentiel en microinjectant des ARN double-brins ciblant DOC1R dans un blastomère d'un embryon au stade deux cellules ou dans les cellules en culture. Nous vérifierons l'organisation des microtubules dans les blastomères injectés. Si un phénotype microtubulaire est observable, les mutants de phosphorylation de DOC1R nous permettront de disséquer le mécanisme d'action de cette protéine en mitose.

Enfin, l'ADN génomique de DOC1R étant cloné (Sheng et al., 2001), il serait intéressant de réaliser des souris transgéniques invalidées pour le gène DOC1R (des KO), ou exprimant une forme de DOC1R mutante (KI). Si DOC1R ne joue un rôle qu'en méiose, le KO sera viable et étudiable. Par contre si DOC1R a un rôle ubiquitaire, il faudra restreindre l'invalidation à l'ovocyte de souris, en plaçant par exemple sous contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée germinale (comme le promoteur ZP3) une séquence permettant de produire du double-brin DOC1R.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. and 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. *Journal of Cell Science* 111, 1751-7.

Abrieu, A., Kahana, J., Wood, K. and Cleveland, D. (2000a). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102, 817-26.

Abrieu, A., Kahana, J. A., Wood, K. W. and Cleveland, D. W. (2000b). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102, 817-26.

Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. and Labbe, J. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83-93.

Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M. and Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105, 459-72.

Alvarez, E., Northgood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abate, C., Curran, T. and Davis, R. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15277-15285.

Angell, R. (1994). Aneuploidy in older women. Higher rates of aneuploidy in oocytes from older women. *Human Reproduction* 9, 1199-200.

Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, A. and Vernos, I. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* 102, 425-35.

Ballantyne, S., Daniel, D. L., Jr. and Wickens, M. (1997). A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1633-48.

Bartholomew, C., Woo, S., Chung, Y., Jones, C. and Hardy, C. (2001). Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology* 21, 4949-59.

Basto, R., Gomes, R. and Karess, R. (2000). Rough deal and Zw10 are required for the metaphase checkpoint in Drosophila. *Nat Cell Biol* 2, 939-43.

Basu, J., Logarinho, E., Herrmann, S., Bousbaa, H., Li, Z., Chan, G., Yen, T., Sunkel, C. and Goldberg, M. (1998). Localization of the Drosophila checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* 107, 376-85.

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* 12, 851-62.

Belmont, L. D. and Mitchison, T. J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84, 623-31.

Berdnik, D. and Knoblich, J. (2002). *Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis.* *Curr Biol.* 12, 640-7.

Bergere, M., Lombroso, R., Gombault, M., Wainer, R. and Selva, J. (2001). *An idiopathic infertility with oocytes metaphase I maturation block: case report.* *Human Reproduction* 16, 2136-8.

Bhatt, R. R. and Ferrell, J. E., Jr. (1999). *The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity.* *Science* 286, 1362-5.

Bhatt, R. R. and Ferrell, J. E., Jr. (2000). *Cloning and characterization of Xenopus Rsk2, the predominant p90 Rsk isozyme in oocytes and eggs.* *Journal of Biological Chemistry* 275, 32983-90.

Biggins, S. and Murray, A. (2001). *The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint.* *Genes and Development* 15, 3118-29.

Biggins, S., Severin, F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A. and Murray, A. (1999). *The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast.* *Genes and Development* 13, 532-44.

Biggins, S. and Walczak, C. (2003). *Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores.* *Curr Biol.* 13, R449-60.

Bilbao-Cortes, D., Hetzer, M., Langst, G., Becker, P. and Mattaj, I. (2002). *Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms.* *Curr Biol.* 12, 1151-6.

Bischoff, F., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I. and Ponstingl, H. (1995). *Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1749-53.

Bischoff, F. and Ponstingl, H. (1991). *Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1.* *Nature.* 354, 80-2.

Blangy, A., Arnaud, L. and Nigg, E. A. (1997). *Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynein subunit p150.* *Journal of Biological Chemistry* 272, 19418-24.

Blangy, A., Lane, H. A., Dherin, P., Harper, M., Kress, M. and Nigg, E. A. (1995). *Phosphorylation by p34(cdc2) regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo.* *Cell* 83, 1159-1169.

Bodart, J., Bechard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J. and Flament, S. (1999). *Activation of Xenopus eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(mos) proteolysis.* *Experimental Cell Research* 253, 413-21.

Booher, R., Holman, P. and Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *Journal of Biological Chemistry* 272, 22300-6.

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., Depinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs - A Family of Protein-Serine/Threonine Kinases That Are Activated and Tyrosine Phosphorylated in Response to Insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.

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

Brunet, S., Pahlavan, G., Taylor, S. and Maro, B. (2003). Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction*. 126, 443-50.

Brunet, S., Polanski, Z., Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z. and Maro, B. (1998). Bipolar meiotic spindle formation without chromatin. *Current Biology* 8, 1231-1234.

Brunet, S., Santa Maria, A., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J. Z. and Maro, B. (1999). Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic metaphase. *Journal of Cell Biology* 146, 1-11.

Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F. and Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin [In Process Citation]. *Cell* 103, 387-98.

Burns, R. G. (1991). alpha-tubulin, beta-tubulin, and gamma-tubulins - sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 20, 181-189.

Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers [see comments]. *Nature* 392, 300-3.

Carazo-Salas, R. and Karsenti, E. (2003). Long-range communication between chromatin and microtubules in Xenopus egg extracts. *Curr Biol.* 13, 1728-33.

Carazo-Salas, R. E., Gruss, O. J., Mattaj, I. W. and Karsenti, E. (2001). Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nature Cell Biology* 3, 228-34.

Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 134-41.

Castro, A., Peter, M., Lorca, T. and Mandart, E. (2001). c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during Xenopus oocyte maturation. *Biology of the Cell* 93, 15-25.

Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T. and Labbe, J. (2003). Mitosis under control. *Med Sci* 19, 309-17.

Chan, G., Jablonski, S., Starr, D., Goldberg, M. and Yen, T. (2000). Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol* 2, 944-7.

Chan, G., Jablonski, S., Sudakin, V., Hittle, J. and Yen, T. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cycosome/APC. *Journal of Cell Biology* 146, 941-54.

Chen, L., Puri, R., Lefkowitz, E. and Kakar, S. (2000). Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 248, 41-50.

Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D. and Murray, A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242-246.

Chesnel, F. and Eppig, J. (1995). Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Molecular Reproduction and Development* 40, 503-8.

Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y. and Kohmoto, K. (1991). Activation of p34^{cdc2} protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113, 789-795.

Choi, T. S., Fukasawa, K., Zhou, R. P., Tessarollo, L., Borror, K., Resau, J. and Vandewoude, G. F. (1996). The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7032-7035.

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M. and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067-76.

Cleveland, D., Mao, Y. and Sullivan, K. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407-21.

Clute, P. and Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1, 82-7.

Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Udy, G. B. and Evans, M. J. (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 65-68.

Compton, D. (2000). Spindle assembly in animal cells. *Annual Review of Biochemistry* 69, 95-114.

Compton, D. and Cleveland, D. (1994). NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 343-6.

Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol.* 12, R502-8.

Davis, E., Wille, L., Chestnut, B., Sadler, P., Shakes, D. and Golden, A. (2002). Multiple subunits of the *Caenorhabditis elegans* anaphase-promoting complex are required for chromosome segregation during meiosis I. *Genetics* 160, 805-13.

de Saint Phalle, B. and Sullivan, W. (1998). Spindle assembly and mitosis without centrosomes in parthenogenetic *Sciara* embryos. *J Cell Biol* 141, 1383-91.

De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaïskou, A., Jessus, C. and Ozon, R. (2002). Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28592-600.

de Vant'ery, C., Gavin, A., Vassalli, J. and Schorderet-Slatkine, S. (1996). An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Developmental Biology* 174, 335-44.

Desai, A. and Hyman, A. (1999). Microtubule cytoskeleton: No longer an also Ran. *Curr Biol.* 9, R704-7.

Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.

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

Dobie, K., Hari, K., Maggert, K. and Karpen, G. (1999). Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair. *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 206-17.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R. and Sorger, P. K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635-45.

Dogterom, M., Felix, M. A., Guet, C. C. and Leibler, S. (1996). Influence of M-phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters. *Journal of Cell Biology* 133, 125-140.

Doree, M. (1990). Control of M-phase by maturation-promoting factor. *Current Opinion in Cell Biology* 2, 269-73.

Dorée, M. (2003). Triggering cell mitosis in higher eukaryotes. *Med Sci* 19, 299-307.

Duckworth, B., Weaver, J. and Ruderman, J. (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., Choi, T., Brown, K. D., Wood, K. W., Resau, J., Fukasawa, K., Cleveland, D. W. and Vande Woude, G. F. (1997). CENP-E is an essential kinetochore motor in maturing oocytes and is masked during mos-dependent, cell cycle arrest at metaphase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9165-70.

Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R. and Haccard, O. (2002). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal* 21, 4026-36.

Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T. and Vallee, R. B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynein reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *Journal of Cell Biology* 132, 617-33.

Edgar, B. A., Sprenger, F., Duronio, R. J., Leopold, P. and O'Farrell, P. H. (1994). Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes and Development* 15, 440-452.

Eichenlaub-Ritter, U., Chandley, A. C. and Gosden, R. G. (1988). The CBA mouse as a model for age related aneuploidy in man: studies of oocyte maturation, spindle formation and chromosome alignment during meiosis. *Chromosoma* 96, 220-226.

Eyers, P. and Maller, J. (2004). Regulation of *Xenopus* Aurora A activation by TPX2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9008-15.

Fan, H. and Sun, Q. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction* 70, 535-47.

Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Molecular Biology of the Cell* 13, 755-66.

Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes and Development* 12, 1871-1883.

Ferby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R. and Nebreda, A. R. (1999). A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes and Development* 13, 2177-89.

Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M. and 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 Journal* 12, 3111-3121.

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

Fisher, D. L., Brassac, T., Galas, S. and Doree, M. (1999). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* 126, 4537-46.

Frank-Vaillant, M., Haccard, O., Ozon, R. and Jessus, C. (2001). Interplay between Cdc2 kinase and the c-Mos/MAPK pathway between metaphase I and metaphase II in Xenopus oocytes. *Developmental Biology* 231, 279-88.

Frank-Vaillant, M., Jessus, C., Ozon, R., Maller, J. L. and Haccard, O. (1999). Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in Xenopus oocytes in response to progesterone. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3279-88.

Funabiki, H. and Murray, A. (2000). The Xenopus chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* 102, 411-24.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381, 438-441.

Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic division in Xenopus oocytes. *The Embo Journal* 13, 2399-2410.

Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N. and Sagata, N. (1997). Meiotic cell cycle in Xenopus oocytes is independent of cdk2 kinase. *The Embo Journal* 16, 3860-3865.

Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A. M. and Greenstein, D. (2000). EMB-30: an APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1401-19.

Gabrielli, B. G., Lee, M. S., Walker, D. H., Piwnica-Worms, H. and Maller, J. L. (1992). Cdc25 regulates the phosphorylation and activity of the *Xenopus* cdk2 protein kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* 267, 18040-18046.

Gabrielli, B. G., Roy, L. M. and Maller, J. L. (1993). Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *Science* 259, 1766-1769.

Gaglio, T., Dionne, M. A. and Compton, D. A. (1997). Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *Journal of Cell Biology* 138, 1055-66.

Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J., Hasbani, M., Gill, S., Schroer, T. and Compton, D. (1996). Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *Journal of Cell Biology* 135, 399-414.

Gaglio, T., Saredi, A. and Compton, D. (1995). NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *Journal of Cell Biology* 131, 693-708.

Gard, D. and Kirschner, M. (1987). A microtubule-associated protein from Xenopus eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol* 105, 2203-15.

Gard, D. L. (1992). Microtubule organization during maturation of xenopus oocytes - Assembly and rotation of the meiotic spindles. *Developmental Biology* 151, 516-530.

Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P. and Maller, J. (1989). Dephosphorylation and activation of Xenopus p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* 339, 626-9.

Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M., Raff, J., Prigent, C. and Glover, D. (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *Journal of Cell Biology* 156, 437-51.

Giet, R. and Prigent, C. (2000). The Xenopus laevis aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Experimental Cell Research* 258, 145-51.

Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Le Guellec, K. and Prigent, C. (1999). The Xenopus laevis aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIeg5. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15005-13.

Glotzer, M., Murray, A. W. and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.

Glover, D., Leibowitz, M., McLean, D. and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.

Golan, A., Yudkovsky, Y. and Hershko, A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15552-7.

Golden, A., Sadler, P. L., Wallenfang, M. R., Schumacher, J. M., Hamill, D. R., Bates, G., Bowerman, B., Seydoux, G. and Shakes, D. C. (2000). Metaphase to Anaphase (mat) Transition-defective Mutants in Caenorhabditis elegans. *Journal of Cell Biology* 151, 1469-1482.

Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W. (1989). Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in Xenopus laevis oocytes. *FEBS Letters* 245, 91-94.

Goshima, G. and Vale, R. (2003). The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line. *Journal of Cell Biology* 162, 1003-16.

Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K. and Nishida, E. (1995). Initiation of Xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen- activated protein kinase cascade. *Journal of Biological Chemistry* 270, 25898-904.

Gotoh, Y., Nishida, E., Matsuda, S., Shiina, N., Kosako, H., Shiokawa, K., Akiyama, T., Ohta, K. and Sakai, H. (1991). In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349, 251-254.

Gross, S., Lewellyn, A. and Maller, J. (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.

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

Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y.-W. and Maller, J. L. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in Xenopus oocytes is mediated by p90rsk. *Current Biology* 10, 430-438.

Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guardaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, J. W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104, 83-93.

Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M. and Maro, B. (1993). γ -tubulin is present in acentriolar MTOCs during mouse early development. *Journal of Cell Science* 105, 157-166.

Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R. S., Erikson, E. and Maller, J. L. (1995). Induction of Xenopus Oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Developmental Biology* 168, 677-682.

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

Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H., Waizenegger, I., Peters, J. and Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* 157, 1125-37.

Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. and Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology* 9, 680-9.

Hampl, A. and Eppig, J. J. (1995). Translational regulation of the gradual increase in histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 40, 9-15.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* 155, 1109-16.

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.

Hauf, I., Waizenegger, I. C. and Peters, J.-M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320-1323.

Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382, 420-425.

Heck, M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y., Spradling, A. and Goldstein, L. (1993). The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol* 123, 665-679.

Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A. and McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat Cell Biol* 5, 1023-5.

Hershko, A., Ganoth, D., Pehrson, J., Palazzo, R. E. and Cohen, L. H. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *Journal of Biological Chemistry* 266, 16376-16379.

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

Hinkle, B., Slepchenko, B., Roll, s. M., Walther, T., Stein, P., Mehlmann, L., Ellenberg, J. and Terasaki, M. (2002). Chromosomal association of Ran during meiotic and mitotic divisions. *J Cell Sci.* 115, 4685-93.

Hirano, T. (2000). Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annual Review of Biochemistry* 69, 115-44.

Hochegger, H., Klotzbucher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M. and Hunt, T. (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development* 128, 3795-807.

Hoffman, D., Pearson, C., Yen, T., Howell, B. and Salmon, E. (2001). Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Molecular Biology of the Cell* 12, 1995-2009.

Horne, M. and Guadagno, T. (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *Journal of Cell Biology* 161, 1021-8.

Howell, B., Hoffman, D., Fang, G., Murray, A. and Salmon, E. (2000). Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol.* 150, 1233-50.

Hoyt, M. (2001). A new view of the spindle checkpoint. *Journal of Cell Biology* 154, 909-11.

Hoyt, M. A., Totis, L. and Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.

Hsu, J., Reimann, J., Sorensen, C., Lukas, J. and Jackson, P. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4, 358-66.

Hsu, J., Sun, Z., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D., Grushcow, J., Brame, C., Caldwell, J., Hunt, D. et al. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-91.

Huang, C. K., H., C., Stevens, T. and Liang, L. (1994). Rapid modification of ribosomal S6 kinase II (S6KII). in rabbit peritoneal neutrophils stimulated with chemotactic factor fMet-Leu-Phe. *Journal of Leukocyte Biology* 55, 430-436.

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

Huchon, D., Rime, H., Jessus, C. and Ozon, R. (1993). Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: Effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biology of the Cell* 77, 133-141.

Hunt, P. A. and LeMaire-Adkins, R. (1998). Genetic control of mammalian female meiosis. *Current Topics in Developmental Biology* 37, 359-81.

Inoue, S. and Salmon, E. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1619-40.

Ivanovska, I., Lee, E., Kwan, K., Fenger, D. and Orr-Weaver, T. (2004). The Drosophila MOS ortholog is not essential for meiosis. *Current Biology* 14, 75-80.

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T., Sawada, W. and Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *EMBO Journal* 19, 4513-23.

Izumi, T., Walker, D. H. and Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Molecular Biology of the Cell* 3, 927-939.

Jablonski, S., Chan, G., Cooke, C., Earnshaw, W. and Yen, T. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* 107, 386-96.

Jager, H., Herzig, A., Lehner, C. and Heidmann, S. (2001). Drosophila separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. *Genes and Development* 15, 2572-84.

Jallepalli, P., Waizenegger, I., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M., Peters, J., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105, 445-57.

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

Joseph, J., Tan, S., Karpova, T., McNally, J. and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *Journal of Cell Biology* 156, 595-602.

Kalab, P., Kubiak, J. Z., Verlhac, M.-H., Colledge, W. H. and Maro, B. (1996). Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and dependent activation. *Development* 122, 1957-1964.

Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic Xenopus egg extracts. *Science* 295, 2452-6.

Kapoor, T. and Compton, D. (2002). Searching for the middle ground: mechanisms of chromosome alignment during mitosis. *Journal of Cell Biology* 157, 551-6.

Karaïskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C. and Ozon, R. (1998). MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Experimental Cell Research* 244, 491-500.

Karaïskou, A., Jesus, C., Brassac, T. and Ozon, R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of Cell Science* 112, 3747-56.

Karaïskou, A., Perez, L. H., Ferby, I., Ozon, R., Jesus, C. and Nebreda, A. R. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36028-34.

Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984a). Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *Journal of Cell Biology* 98, 1763-1776.

Karsenti, E., Newport, J., Hubble, R. and Kirschner, M. (1984b). Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays as studied by the injection of centrosomes and nuclei into Xenopus eggs. *Journal of Cell Biology* 98, 1730-1745.

Karsenti, E., Newport, J. and Kirschner, M. (1984c). Respective roles of centrosomes and chromatin in the conversion of microtubule arrays from interphase to metaphase. *Journal of Cell Biology* 99, 47s-54s.

Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. and Sen, S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem* 276, 46219-24.

Kerrebrock, A. W., Moore, D. P., Wu, J. S. and Orr-Weaver, T. L. (1995). Mei-S332, a Drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions [see comments]. *Cell* 83, 247-56.

Keryer, G., Di Fiore, B., Celati, C., Lechtreck, K., Mogensen, M., Delouvee, A., Lavia, P., Bornens, M. and Tassin, A. (2003). Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4260-71.

Khodjakov, A., Cole, R., Oakley, B. and Rieder, C. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol.* 10, 59-67.

Khodjakov, A. and Rieder, C. (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require. *Journal of Cell Biology* 146, 585-96.

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

Kitajima, T., Kawashima, S. and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427, 510-7.

Kitajima, T., Miyazaki, Y., Yamamoto, M. and Watanabe, Y. (2003). Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO Journal* 22, 5643-53.

Kobayashi, H., Golsteyn, R., Poon, R., Stewart, E., Gannon, J., Minshull, J., Smith, R. and Hunt, T. (1991a). Cyclins and their partners during Xenopus oocyte maturation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 56, 437-47.

Kobayashi, H., Minshull, J., Ford, C., Golsteyn, R., Poon, R. and Hunt, T. (1991b). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *Journal of Cell Biology* 114, 755-765.

Kosako, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1994a). Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *Journal of Biological Chemistry* 269, 28354-28358.

Kosako, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1994b). Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in xenopus oocyte maturation. *EMBO Journal* 13, 2131-2138.

Kotani, S., Tanaka, H., Yasuda, H. and Todokoro, K. (1999). Regulation of APC Activity by Phosphorylation and Regulatory Factors. *The Journal of Cell Biology* 146, 791-800.

Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P. M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P. and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1, 371-80.

Kramer, E., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A., Mann, M. and Peters, J. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1555-69.

Kubiak, J. Z., Weber, M., de Pennart, H., Winston, N. and Maro, B. (1993). The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO Journal* 12, 3773-3778.

Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G. and Maro, B. (1992). Cell cycle modification during the transition between meiotic M-phases in mouse oocytes. *Journal of Cell Science* 102, 457-467.

Kufer, T., Sillje, H., Korner, R., Gruss, O., Meraldi, P. and Nigg, E. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *Journal of Cell Biology* 158, 617-23.

Kuge, H., Brownlee, G., Gershon, P. and Richter, J. (1998). Cap ribose methylation of c-mos mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* 26, 3208-14.

Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., Funabiki, H., Nakagawa, T. and Yanagida, M. (1998). Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Current Biology* 8, 633-41.

Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 70, 139-151.

Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273, 1377-1380.

Kumagai, A., Yakowec, P. and Dunphy, W. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Biology of the Cell* 9, 345-54.

Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J. and Hershko, A. (1995). Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9303-7.

Lane, H. A. and Nigg, E. A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *Journal of Cell Biology* 135, 1701-13.

Lazar, S., Galiani, D. and Dekel, N. (2002). cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Molecular Endocrinology* 16, 331-41.

Leader, B., Lim, H., Carabatsos, M. J., Harrington, A., Ecsedy, J., Pellman, D., Maas, R. and Leder, P. (2002). Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nature Cell Biology* 4, 921-927.

Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.-E. and Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology* 132, 400-413.

Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. and Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 116, 2781-2790.

Lefebvre, C., Terret, M.-E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B. and Verlhac, M.-H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *The Journal of Cell Biology* 157, 603-613.

LeMaire-Adkins, R. and Hunt, P. (2000). Nonrandom segregation of the mouse univalent X chromosome: evidence of spindle-mediated meiotic drive. *Genetics* 156, 775-83.

LeMaire-Adkins, R., Radke, K. and Hunt, P. A. (1997). Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *Journal of Cell Biology* 139, 1611-9.

Lemaitre, JM, Bocquet, S, Terret, ME, Namdar, M, Aît-Ahmed, O, Kearsey, S, Verlhac, MH, Méchali, M. (2004). The regulation of competence to replicate in meiosis by Cdc6 is conserved during evolution. In press in Mol Rep Dev

Lemaitre, J., Bocquet, S. and Mechali, M. (2002). Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation. *Nature* 419, 718-22.

Lemaitre, J., Geraud, G. and Mechali, M. (1998). Dynamics of the genome during early Xenopus laevis development: karyomeres as independent units of replication. *J Cell Biol.* 142, 1159-66.

Lengauer, C., Kinzler, K. and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-9.

Lenormand, J. L., Dellinger, R. W., Knudsen, K. E., Subramani, S. and Donoghue, D. J. (1999). Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO Journal* 18, 1869-77.

Levesque, A. and Compton, D. (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *Journal of Cell Biology* 154, 1135-46.

Lew, D. J. (2002). Formin' actin filament bundles. *Nature Cell Biology* 4, E29-E30.

Li, H. and Zheng, Y. (2004). Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. *Genes and Development* 18, 512-27.

Li, R. and Murray, A. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.

Li, X. and Nicklas, R. B. (1997). Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. *Journal of Cell Science* 110, 537-45.

Lincoln, A., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R., Palko, M., De Miguel, M., Tessarollo, L. and Donovan, P. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics* 30, 446-449.

Littlepage, L. and Ruderman, J. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes and Development* 16, 2274-85.

Longo, F. J. and Chen, D. Y. (1985). Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Developmental Biology* 107, 382-394.

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

Lorca, T., Cruzalequi, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J.-C., Méry, J., Means, A. and Dorée, M. (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates Ca²⁺-dependent inactivation of MPF and CSF activities upon the fertilization of Xenopus eggs. *Nature* 366, 270-273.

Losada, A. and Hirano, T. (2001). Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *BioEssays* 23, 924-35.

Luo, X., Tang, Z., Rizo, J. and Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell* 9, 59-71.

Maney, T., Hunter, A. W., Wagenbach, M. and Wordeman, L. (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *Journal of Cell Biology* 142, 787-801.

Maniotis, A. and Schliwa, M. (1991). Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell* 67, 495-504.

Maro, B., Howlett, S. K. and Webb, M. (1985). Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *Journal of Cell Biology* 101, 1665-1672.

Maro, B., Johnson, M. H., Webb, M. and Flach, G. (1986). Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 92, 11-32.

Mastronarde, D., McDonald, K., Ding, R. and McIntosh, J. (1993). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *Journal of Cell Biology* 123, 1475-89.

Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 117, 129-146.

Matheos, D., Metodiev, M., Muller, E., Stone, D. and Rose, M. (2004). Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p. *Journal of Cell Biology* 165, 99-109.

Mattaj, I. and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual Review of Biochemistry* 67, 265-306.

Matten, W., Daar, I. and Vande Woude, G. (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit Xenopus oocyte maturation. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4419-26.
McKim, K. and Hawley, R. (1995). Chromosomal control of meiotic cell division. *Science* 270, 1595-601.

McNally, F. (1996). Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 23-9.

Mei, J., Huang, X. and Zhang, P. (2001). Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Biol.* 11, 1197-201.

Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W. and Cleveland, D. (2000). Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *Journal of Cell Biology* 149, 851-62.

Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. and Cleveland, D. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447-58.

Minshull, J., Murray, A., Colman, A. and Hunt, T. (1991). Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *Journal of Cell Biology* 114, 767-772.

Minshull, J., Sun, H., Tonks, N. K. and Murray, A. W. (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in Xenopus egg extracts. *Cell* 79, 475-486.

Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B. and Agard, D. A. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-40.

Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando , A., Schatten, G. and Compton, D. (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *Journal of Cell Biology* 147, 351-66.

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

Mueller, P. R., Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1995b). Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Molecular Biology of the Cell* 6, 119-134.

Mulner, O., Huchon, D., Thibier, C. and Ozon, R. (1979). Cyclic AMP synthesis in Xenopus laevis oocytes: inhibition by progesterone. *Biochim Biophys Acta* 582, 179-84.

Murakami, M. S. and Vande Woude, G. F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos. *Development* 125, 237-48.

Murray, A. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-34.

Murray, A. W., Solomon, M. J. and Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280-286.

Musacchio, A. and Hardwick, K. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-41.

Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. and Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* 104, 95-106.

Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K. and Sagata, N. (2000). Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes and Development* 14, 328-38.

Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual Review of Genetics* 35, 673-745.

Nebreda, A., Gannon, J. 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 Journal* 14, 5597-607.

Nebreda, A. R. and Hunt, T. (1993). The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extract of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO Journal* 12, 1979-1986.

Nemergut, M., Mizzen, C., Stukenberg, T., Allis, C. and Macara, I. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292, 1540-3.

Nicklas, R. B. (1989). The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *Journal of Cell Biology* 109, 2245-2255.

Nicklas, R. B. and Gordon, G. W. (1985). The total length of spindle microtubules depends on the number of chromosomes present. *Journal of Cell Biology* 100, 1-7.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17, 471-480.

Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. and Sagata, N. (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal* 11, 2433-2446.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry* 69, 277-302.

O'Connell, M., Meluh, P., Rose, M. and Morris, N. (1993). Suppression of the bimC4 mitotic spindle defect by deletion of klpA, a gene encoding a KAR3-related kinesin-like protein in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology* 120, 153-62.

Pahlavan, G., Polanski, Z., Kalab, P., Golsteyn, R., Nigg, E. A. and Maro, B. (2000). Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 220, 392-400.

Palazzo, R., Vogel, J., Schnackenberg, B., Hull , D. and Wu, X. (2000). Centrosome maturation. *Current Topics in Developmental Biology* 49, 449-70.

Palmer, A., Gavin, A. C. and Nebreda, A. R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1 [published erratum appears in EMBO J 1999 Feb 15;18(4):1092]. *EMBO Journal* 17, 5037-47.

Patra, D. and Dunphy, W. (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.

Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991). Identification of the Regulatory Phosphorylation Sites in pp42/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase). *EMBO Journal* 10, 885-892.

Peter, M., Castro, A., Lorca, T., Peuch, C. L., Magnaghi-Jaulin, L., Doree, M. and Labbe, J. C. (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in Xenopus oocytes. *Nat Cell Biol* 3, 83-87.

Peter, M., Labbe, J., Doree, M. and Mandart, E. (2002a). A new role for Mos in Xenopus oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development* 129, 2129-39.

Peter, M., Le Peuch, C., Labbe, J., Meyer, A., Donoghue, D. and Doree, M. (2002b). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* 3, 551-6.

Peters, J. (1999). Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Experimental Cell Research* 248, 339-49.

Peters, J. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-43.

Peters, J. (2003). Emi1 proteolysis: how SCF(beta-Trcp1) helps to activate the anaphase-promoting complex. *Mol Cell* 11, 1420-1.

Peters, J. M., King, R. C., Höög, C. and Kirschner, M. W. (1996). Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 274, 1199-1201.

Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E. and McIntosh, J. R. (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* 345, 263-265.

Pfleger, C. and Kirschner, M. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes and Development* 14, 655-65.

Phillips, K., Petrunewich, M., Collins, J., Booth, R., Liu, X. and Baltz, J. (2002). Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos(-/-) parthenogenotes. *Developmental Biology* 247, 210-23.

Pidoux, A., LeDizet, M. and Cande, W. (1996). Fission yeast pkl1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1639-55.

Pines, J. and Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *Journal of Cell Biology* 115, 1-17.

Pines, J. and Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO Journal* 13, 3772-81.

Pommier, Y. and Kohn, K. (2003). Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets. *Med Sci* 19, 173-86.

Poon, R., Yamashita, K., Adamczewski, J., Hunt, T. and Shuttleworth, J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO Journal* 12, 3123-32.

Posada, J. and Cooper, J. A. (1992). Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* 255, 212-215.

Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. (1993). Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 13, 2546-2553.

Putkey, F., Cramer, T., Morphew, M., Silk, A., Johnson, R., McIntosh, J. and Cleveland, D. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* 3, 351-65.

Qian, Y., Erikson, E. and Maller, J. (1999). Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *Molecular and Cellular Biology* 19, 8625-32.

Qian, Y., Erikson, E., Taieb, F. and Maller, J. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell* 12, 1791-9.

Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C. and Maller, J. L. (1998a). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4262-71.

Qian, Y. W., Erikson, E. and Maller, J. L. (1998b). Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science* 282, 1701-4.

Rabitsch, K., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J., Eisenhaber, F. and Nasmyth, K. (2004). Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Current Biology* 14, 287-301.

Reimann, J. D., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F. and Jackson, P. K. (2001). Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes and Development* 15, 3278-85.

Reimann, J. D. and Jackson, P. K. (2002). Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* 416, 850-4.

Rempel, E. R., Sleight, S. B. and Maller, J. L. (1995). Maternal *Xenopus* Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 6843-6855.

Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *Journal of Cell Biology* 130, 941-8.

Rieder, C. L., Khodjakov, A., Paliulis, L. V., Fortier, T. M., Cole, R. W. and Sluder, G. (1997). Mitosis in vertebrate somatic cells with two spindles: implications for the metaphase/anaphase transition checkpoint and cleavage [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5107-12.

Rieder, C. L. and Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Tr Cell Biol* 8, 310-318.

Rieder, C. L., Schultz, A., Cole, R. and Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *Journal of Cell Biology* 127, 1301-1310.

Rime, H., Huchon, D., Desmedt, V., Thibier, C., Galaktionov, K., Jessus, C. and Ozon, R. (1994). Microinjection of cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biology of the Cell* 82, 11-22.

Rime, H., Huchon, D., Jessus, C., Goris, J., Merlevede, W. and Ozon, R. (1990). Characterization of MPF activation by okadaic acid in *Xenopus* oocyte. *Cell Differentiation and Development* 29, 47-58.

Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. and Prigent, C. (1998). The *Xenopus* protein kinase pEg2

associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci.* 111, 557-72.

Rudner, A. and Murray, A. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol.* 149, 1377-90.

Sadler, S. and Maller, J. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in Xenopus oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry* 256, 6368-73.

Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S. D. and Vande Woude, G. F. (1989a). The product of the mos proto-oncogene as a candidate initiator for oocyte maturation. *Science* 245, 643-646.

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

Sagata, N., Watanabe, N., Van de Woude, G. F. and Ikawa, Y. (1989b). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342, 512-518.

Sassoon, I., Severin, F., Andrews, P., Taba, M., Kaplan, K., Ashford, A., Stark, M., Sorger, P. and Hyman, A. (1999). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes and Development* 13, 545-55.

Saunders, W., Lengyel, V. and Hoyt, M. (1997). Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1025-33.

Saunders, W. S. and Hoyt, M. A. (1992). Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* 70, 451-458.

Sawin, K. E. (2002). Cell polarity: following formin function. *Current Biology* 12, R6-R8.

Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M. and Mitchison, T. J. (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* 359, 540-543.

Sawin, K. E. and Mitchison, T. J. (1991). Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *Journal of Cell Biology* 112, 925-940.

Schaar, B. T., Chan, G. K., Maddox, P., Salmon, E. D. and Yen, T. J. (1997). CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *Journal of Cell Biology* 139, 1373-82.

Schatz, C., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I., Gruss, O. and Carazo-Salas, R. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO Journal* 22, 2060-70.

Schumacher, J., Golden, A. and Donovan, P. (1998). AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Journal of Cell Biology* 143, 1635-46.

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

Schwab, M., Roberts, B., Gross, S., Tunquist, B., Taieb, F., Lewellyn, A. and Maller, J. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol.* 11, 141-50.

Shapiro, P. S., Vaisberg, E., Hunt, A. J., Tolwinski, N. S., Whalen, A. M., McIntosh, J. R. and Ahn, N. G. (1998). Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *Journal of Cell Biology* 142, 1533-45.

Sharp, D., McDonald, K., Brown, H., Matthies, H., Walczak, C., Vale, R., Mitchison, T. and Scholey, J. (1999a). The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of Drosophila embryonic mitotic spindles. *Journal of Cell Biology* 144, 125-38.

Sharp, D., Rogers, G. and Scholey, J. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41-7.

Sharp, D., Yu, K., Sisson, J., Sullivan, W. and Scholey, J. (1999b). Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in Drosophila early embryos. *Nat Cell Biol* 1, 51-4.

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

Sheng, X., Jiang, L., Zhou, W., Wang, T. and Zhang, X. (2001). [Cloning of the mouse Doc-1R gene by genomic walking]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 18, 314-6.

Siomos, M. F., Badrinath, A., Pasierbek, P., Livingstone, D., White, J., Glotzer, M. and Nasmyth, K. (2001). Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 11, 1825-1835.

Siracusa, G., Whittingham, D. G., Molinaro, M. and Vivarelli, E. (1978). Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 43, 157-166.

Sironi, L., Melixetian, M., Faretta, M., Prosperini, E., Helin, K. and Musacchio, A. (2001). Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *EMBO Journal* 20, 6371-82.

Skoufias, D., Andreassen, P., Lacroix, F., Wilson, L. and Margolis, R. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4492-7.

Sluder, G., Rieder, C. L. and Miller, F. (1985). Experimental separation of pronuclei in fertilized sea urchin eggs: chromosomes do not organize a spindle in the absence of centrosomes. *Journal of Cell Biology* 100, 897-903.

Smirnova, E. A. and Bajer, A. S. (1992). Spindle poles in higher plant mitosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton and the cytoskeleton* 23, 1-7.

Smits, V., Klompmaker, R., Vallenius, T., Riksen, G., Makela, T. and Medema, R. (2000). p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30638-43.

Solomon, M., Harper, J. and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO Journal* 12, 3133-42.

Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S., Gygi, S. and Kirschner, M. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107, 715-26.

Stern, B. and Murray, A. (2001). Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol.* 11, 1462-7.

Steuer, E. R., Wordeman, L., Schroer, T. A. and Sheetz, M. P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature* 345, 266-268.

Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R., Sandalinas, M. and Brenner, C. (2001). Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 7, 49-55.

Stratmann, R. and Lehner, C. F. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the Drosophila pimel product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* 84, 25-35.

Su, T. T., Sprenger, F., Digregorio, P. J., Campbell, S. D. and O'Farrell, P. H. (1998). Exit from mitosis in Drosophila syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation. *Genes and Development* 15, 1495-1503.

Sudakin, V., Chan, G. and Yen, T. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *Journal of Cell Biology* 154, 925-36.

Sudakin, V., Ganot, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V. and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell* 6, 185-97.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. and Peters, J. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 9, 515-25.

Summerton, J. (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489, 141-58.

Summerton, J. and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7, 187-95.

Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T. and Kishimoto, T. (2000). c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14301-6.

Taieb, F., Chartrain, I., Chevalier, S., Haccard, O. and Jessus, C. (1997). Cyclin D2 arrests Xenopus early embryonic cell cycles. *Experimental Cell Research* 237, 338-46.

Taieb, F. E., Gross, S. D., Lewellyn, A. L. and 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. *Current Biology* 11, 508-513.

Takizawa, C. and Morgan, D. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 658-65.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. and Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2, 110-116.

Tavormina, P. and Burke, D. (1998). Cell cycle arrest in cdc20 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of Ndc10p and kinetochore function but requires a subset of spindle checkpoint genes. *Genetics* 148, 1701-13.

Taylor, S. S., Ha, E. and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *Journal of Cell Biology* 142, 1-11.

Taylor, S. S. and McKeon, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89, 727-735.

Terret, M.-E., Ferby, I., Nebreda, A. and Verlhac, M.-H. (2001). Ringo efficiently triggers meiosis resumption in mouse oocytes and induces cell cycle arrest in embryos. *Biology of the Cell* 93, 89-97.

Terret, M. E., Lefebvre, C., Djiane, A., Rassinier, P., Moreau, J., Maro, B. and Verlhac, M.-H. (2003a). DOC1R: a MAP kinase substrate that controls microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 130, 5169-5177.

Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I. C., Maro, B., Peters, J.-M. and Verlhac, M.-H. (2003b). The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Current Biology* 13, 1797-1802.

Theurkauf, W. E. and Hawley, R. S. (1992). Meiotic spindle assembly in Drosophila females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *Journal of Cell Biology* 116, 1167-80.

Thibier, C., De Smedt, V., Poulhe, R., Huchon, D., Jessus, C. and Ozon, R. (1997). In vivo regulation of cytostatic activity in Xenopus metaphase II- arrested oocytes. *Developmental Biology* 185, 55-66.

Tsai, M., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 5, 242-8.

Tulu, U., Rusan, N. and Wadsworth, P. (2003). Peripheral, non-centrosome-associated microtubules contribute to spindle formation in centrosome-containing cells. *Curr Biol.* 13, 1894-9.

Tunquist, B., Eyers, P., Chen, L., Lewellyn, A. and Maller, J. (2003). Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *J Cell Biol.* 163, 1231-42.

Tunquist, B., Schwab, M. S., Chen, L. G. and Maller, J. L. (2002). The spindle checkpoint kinase Bub1 and cyclin E/Cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by Cytostatic Factor. *Current Biology* 12, 1027-1033.

Uhlmann, F., Lottspeich, F. and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37-42.

Van Blerkom, J. and Bell, H. (1986). Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of cytoplasm and plasma membrane. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 93, 213-238.

Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J. and Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120, 1017-1025.

Verlhac, M.-H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P. and Maro, B. (2000a). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology* 10, 1303-1306.

Verlhac, M.-H., Lefebvre, C., Terret, M.-E., Pahlavan, G., Rassinier, P. and Maro, B. (2001). L'ovocyte de souris et les particularités des divisions méiotiques. *Médecine/Sciences* 17, 1046-1052.

Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H. and Clarke, H. J. (1993). MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology* 158, 330-340.

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

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

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

Waizenegger, I. C., Gimenez-Abian, J. F., Wernic, D. and Peters, J.-M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Current Biology* 20, 1368-78.

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. and Peters, J.-M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.

Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A. (1996). XKCM1: A Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* 84, 37-47.

Walczak, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E. and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Current Biology* 8, 903-13.

Walter, A., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906-16.

Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. (2001). Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes and Development* 15, 1361-72.

Wang, Y. and Burke, D. (1995). Checkpoint genes required to delay cell division in response to nocodazole respond to impaired kinetochore function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* 15, 6838-44.

Wang, Z., Moro, E., Kovacs, K., Yu, R. and Melmed, S. (2003). Pituitary tumor transforming gene-null male mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 3428-32.

Wasserman, W. J. and Masui, Y. (1975). Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Experimental Cell Research* 91, 369-375.

Wassmann, K., Liberal, V. and Ben Ezra, R. (2003a). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO Journal* 22, 797-806.

Wassmann, K., Niault, T. and Maro, B. (2003b). Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. *Current Biology* 13, 1596-608.

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

Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W. and Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *Journal of Cell Biology* 141, 1181-91.

Weaver, B., Bondy, Z., Putkey, F., Kops, G., Silk, A. and Cleveland, D. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol.* 162, 551-63.

Weiss, E. and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *Journal of Cell Biology* 132, 111-23.

Whitmire, E., Khan, B. and Coue, M. (2002). Cdc6 synthesis regulates replication competence in Xenopus oocytes. *Nature* 419, 722-5.

Wiese, C., Wilde, A., Moore, M., Adam, S., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* 291, 653-6.

Wilson, P., Fuller, M. and Borisy, G. (1997). Monastral bipolar spindles: implications for dynamic centrosome organization. *Journal of Cell Science* 110, 451-64.

Winston, N. (1997). Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first meiotic cell cycle division in mouse oocyte. *Biology of the Cell* 89, 211-219.

Wirth, K., Ricci, R., Gimenez-Abian, J., Taghybeeglu, S., Kudo, N., Jochum, W., Vasseur-Cognet, M. and Nasmyth, K. (2004). Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation. *Genes and Development* 18, 88-98.

Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E. and Vernos, I. (1998). Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *Journal of Cell Biology* 143, 673-85.

Wittmann, T., Hyman, A. and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* 3, E28-34.

Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. and Vernos, I. (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *Journal of Cell Biology* 149, 1405-18.

Wolstenholme, J. and Angell, R. (2000). Maternal age and trisomy--a unifying mechanism of formation. *Chromosoma* 109, 435-8.

Wood, K. W., Sakowicz, R., Goldstein, L. S. and Cleveland, D. W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* 91, 357-66.

Wu, H., Lan, Z., Li, W., Wu, S., Weinstein, J., Sakamoto, K. and Dai, W. (2000). p55CDC/hCDC20 is associated with BUBR1 and may be a downstream target of the spindle checkpoint kinase. *Oncogene* 19, 4557-62.

Yamada, H., Kumada, K. and Yanagida, M. (1997). Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. *J Cell Sci.* 110, 1793-804.

Yamaguchi, R. and Newport, J. (2003). A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell* 113, 115-25.

Yamamoto, A., Guacci, V. and Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 133, 85-97.

Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H. and Hunt, T. (2004). Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in Xenopus egg extracts. *Mol Cell* 13, 137-47.

Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T. et al. (2004). ATF4 Is a Substrate of RSK2 and an EssentialRegulator of Osteoblast Biology:Implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387-398.

Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F. and Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* 2, 484-91.

Yen, T. and Schaar, B. (1996). Kinetochore function: molecular motors, switches and gates. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 381-8.

Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C. and Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO Journal* 10, 1245-54.

Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes and Development* 13, 2039-2058.

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

Zecevic, M., Catling, A. D., Eblen, S. T., Renzi, L., Hittle, J. C., Yen, T. J., Gorbsky, G. J. and Weber, M. J. (1998). Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *Journal of Cell Biology* 142, 1547-58.

Zhang, D. H. and Nicklas, R. B. (1995). The impact of chromosomes and centrosomes on spindle assembly as observed in living cells. *Journal of Cell Biology* 129, 1287-1300.

Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-83.

Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. and Kirschner, M. W. (1999). Identification of a Vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285, 418-422.

ANNEXES

Annexe 1

L'ovocyte de souris et les particularités des divisions méiotiques

Verlhac M.-H, Lefebvre C, Terret M.-E, Pahlavan G,
Rassinier P, Maro B

Médecine/Sciences 2001. 17 (10): 1046-1052

Annexe 2

**Meiotic maturation of the mouse oocyte
requires an equilibrium between cyclin B
synthesis and degradation**

Ledan E, Polanski Z, Terret M.-E, Maro B

Developmental Biology 2001. 132 (400-413)

Annexe 3

**Ringo efficiently triggers meiosis
resumption in mouse oocytes and induces
cell cycle arrest in embryos**

Terret M.-E, Ferby I, Nebreda A, Verlhac M.-H

Biology of the Cell 2001. 93 (1): 89-97

RINGO efficiently triggers meiosis resumption in mouse oocytes and induces cell cycle arrest in embryos

Marie-Emilie Terret^a, Ingvar Ferby^b, Angel R. Nebreda^b, Marie-Hélène Verlhac^{a*}

^a Biologie Moléculaire et Cellulaire du Développement, UMR 7622, CNRS/Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard-Bat C- 5^e, 75252 Paris cedex 05, France

^b European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

Received 30 June 2001; revised 1 August 2001; accepted 15 August 2001

RINGO was identified as a Cdc2-binding and activating protein which is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes. We have investigated whether the function of RINGO is conserved in mouse oocytes. We show that RINGO induces Germinal Vesicle BreakDown (GVBD) in mouse oocytes. Mos is known to induce GVBD in mouse oocytes, and is also involved in the metaphase II arrest, which is due to the CSF (CytoStatic Factor) activity. We found that RINGO also has CSF activity and induces cleavage arrest after injection into one blastomere of a late two-cell mouse embryo, like Mos. However, RINGO also inhibits polar body extrusion of wild type mouse oocytes. The same effect of RINGO on first and second polar body extrusion was observed in Mos^{-/-} mouse oocytes. The injection of RINGO mimics Mos effects: GVBD induction and efficient cleavage arrest. However, our results in mouse oocytes suggest that RINGO may have additional functions in meiosis regulation. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

RINGO / meiosis / oocyte maturation / mitosis / CSF

1. INTRODUCTION

Vertebrate oocytes are arrested in the G2 phase in the ovaries. The period of time from meiosis resumption to the block in metaphase II is called meiotic maturation. Meiotic maturation is composed of two M-phases: during the first M-phase, which starts at Germinal Vesicle Breakdown (GVBD), a long prometaphase I takes place where spindle formation occurs and ends with the extrusion of the first polar body; during the second M-phase, oocytes are arrested in metaphase II until fertilization. This block in metaphase II is called

the Cytostatic Factor (CSF) arrest (Masui and Markert, 1971). There is no interphase between these two M-phases. At least, two kinases are very important in the control of oocyte maturation: MPF (M-phase Promoting Factor; Masui and Markert, 1971) and MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase; Boulton et al., 1990).

MPF is a key molecule that controls the entry and the exit of any eukaryotic cell into M-phase. This factor is composed of two sub-units: a catalytic subunit Cdc2, which has the kinase activity, and a regulatory subunit, Cyclin B. The activation of MPF allows cells to enter into mitosis or meiosis (Choi et al., 1991). The exit of M-phase is a consequence of the drop of MPF activity, due to Cyclin B degradation. In mouse oocytes, MPF is activated at GVBD (which corresponds to meiosis resumption) and allows the entry into the first M-phase

* Correspondence and reprints.

E-mail address: Marie-Helene.Verlhac@snv.jussieu.fr
(M.H. Verlhac).

of meiosis. MPF activity increases slowly and gradually during prometaphase, to reach a plateau at the end of the first division, 1 hour before the entry in metaphase I, corresponding to the formation of the kinetochore fibers (Brunet et al., 1999). The degradation of Cyclin B induces the drop of MPF activity, and the exit of the first M-phase (Leden et al., 2001; Polanski et al., 1998). Then MPF is reactivated, inducing the entry in the second M-phase. This activity stays high until fertilization. The rise in MPF activity during the first M-phase of meiosis is very different from the rise observed in mitosis: in mitosis, MPF activity increases abruptly, and stays high until the exit from metaphase. The difference in MPF activation between mitosis and meiosis could be a consequence of a control of the Cdc2² activity by molecules others than Cyclin B, and specific to meiosis. A new molecule, characterized in *Xenopus*, is a good candidate as a modulator of MPF activity: RINGO/Speedy (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). The RINGO protein contains 300 amino acids, which no previously characterised domains and has a potential nuclear export signal (NES) motif. Injection of mRNAs encoding RINGO in immature *Xenopus* oocytes induces meiosis resumption very rapidly without progesterone treatment, and injection of antisense oligonucleotides inhibits meiosis resumption induced by progesterone, suggesting that RINGO is synthesized during meiotic maturation (Ferby et al., 1999).

Finally, RINGO can bind and activate Cdc2 in vitro, in the absence of Cyclin B, but is not able to bind MPF, and associates weakly with Cyclin B1 (Ferby et al., 1999). In addition, overexpression of RINGO in *Xenopus* oocytes results in MAPK and MPF activation (Lenormand et al., 1999) (Ferby et al., 1999). Therefore, it has been proposed that RINGO controls meiosis resumption through its association with Cdc2.

We used Mos as a control in our study, because Mos is also able to induce G2/M progression in *Xenopus* (Sagata et al., 1989a) and in mouse oocytes (Verlhac et al., 2000b). Mos is a MAPKK that initiates the MAPK pathway in vertebrate and invertebrate oocytes (Nebreda and Hunt, 1993; Posada et al., 1993; Tachibana et al., 2000). The injection of RINGO mimics Mos injection on meiosis resumption in *Xenopus*. Mos phosphorylates MEK, a MAPKK that itself phosphorylates and activates MAPK. The MAPK are key regulators of meiotic maturation. In mouse oocytes, MAPK are activated after meiosis resumption, they induce the migration of the first meiotic spindle to the cortex during metaphase I (Verlhac et al., 2000a) and they are responsible for the CSF (CytoStatic Factor) arrest in metaphase II (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996).

We show here that the mRNA encoding a protein related to RINGO is present in immature mouse oo-

cytes. We also show that the effect of RINGO injection on meiosis resumption is conserved between *Xenopus* and mouse oocytes. In addition, the overexpression of RINGO induces a cleavage arrest after injection into one blastomere of a late 2-cell mouse embryo, and blocks first and second polar body extrusion in wild type and Mos^{-/-} oocytes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection and culture of mouse oocytes and embryos

Immature oocytes arrested in prophase I of meiosis were obtained by removing ovaries from 11-week-old OF1 and from Mos^{-/-} female mice. Oocytes were removed and cultured as previously described (Brunet et al., 1998).

Female OF1 mice were superovulated by intraperitoneal injection of 5 UI pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG; Intervet) and human chorionic gonadotrophin (hCG; Intervet) 48 h later. Then, females were mated overnight with OF1 males and checked for vaginal plugs the next morning (Louvet-Vallee et al., 2001). In these conditions, fertilization occurs about 12 h post-hCG. Embryos were collected by flushing oviducts in medium containing 4 mg/ml bovine serum albumin (M2+BSA), after which they were cultured in T6 medium containing BSA (T6+BSA) under paraffin oil in sterile culture dishes at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂ in air.

2.2. RT-PCR

For preparing RNA from mouse ovaries, total RNA were extracted using the Rneasy mini Kit (Qiagen). For mouse immature oocytes, the RNA were not extracted but directly used as template for the RT. Then 500 ng of RNA from ovaries, or 30 immature oocytes in sterile PBS were treated with 2U of RQ1 Dnase (Promega) for 20 min at 37°C, heated for 5 min at 85°C. The first strand cDNA synthesis was performed with 50 U of MuLV Superscript (Life Technologies) using 2.5 μM random hexamer (pdN6, Pharmacia), 1 mM dNTPs (Promega), in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl for 1 h at 37°C, followed by 5 min at 95°C. The PCR amplification was performed using 5'-GAAGCTAAATGCGGCATAATC and 5'-CTCACGTATCTCTTTTAC primers, at 55°C for 30 cycles.

2.3. Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as previously described (Brunet et al., 1998). To visualize the microtubules and the chromosomes, oocytes were first fixed for 10 min in 0.1% glutaraldehyde in PBS at 30°C, and

permeabilized for 30 min in 2% tritonX-100 in PBS, then washed in 0.1% Tween 20/PBS, incubated for 1 hour in the first antibody YL1/2 (1:100) in 3% BSA/0.1% Tween 20/PBS. They were then washed in 0.1% Tween 20/PBS, and further incubated for 1 hour in the second antibody anti-rat FITC (1:400) in 3% BSA/0.1% Tween 20/PBS. They were washed in 0.1% Tween 20/PBS, and finally incubated 5 min in Propidium Iodide ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 0.1% Tween 20/PBS), washed three times in PBS before mounting in Citifluor (Chem. Lab, UCK).

2.4. In vitro synthesis of RNA

The Mos mRNA were produced from the pRN3-Mos plasmid (Verlhac et al., 2000b). The Δ Raf mRNA were produced from the pKS: Δ Raf expression vector (Fabian et al., 1993), and the RINGO mRNA were produced from the FTX5-Ringo plasmid (Ferby et al., 1999). The in vitro synthesis of capped RNAs was performed using linearized plasmids with the mMessage mMACHINE kit (Ambion). The mRNAs were then purified on RNeasy columns (Qiagen) and eluted in injection buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) at a final concentration of $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Aliquots were then stored at -80°C .

2.5. Microinjection of synthetic RNA

The synthetic RNA were microinjected into the cytoplasm of immature oocytes using an Eppendorf pressure microinjector and sterile micro-pipettes. The oocytes were kept at 37°C in M2 medium supplemented with dbcAMP ($100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) during injection. They were further cultured for 5 hours at 37°C , in an atmosphere of 5% of CO_2 in air, in M2 medium supplemented with dbcAMP ($100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) to allow overexpression of the exogenous proteins. When GVBD did not occur in dbcAMP containing medium due to overexpression of proteins, the resumption of meiotic maturation was triggered by removal of the injected oocytes from the dbcAMP-containing medium and transfer into dbcAMP-free medium.

3. RESULTS

3.1. RINGO induces GVBD in oocytes maintained in a dbcAMP supplemented medium

RINGO is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). To test if the function of RINGO is conserved in *Xenopus* and mouse, we investi-

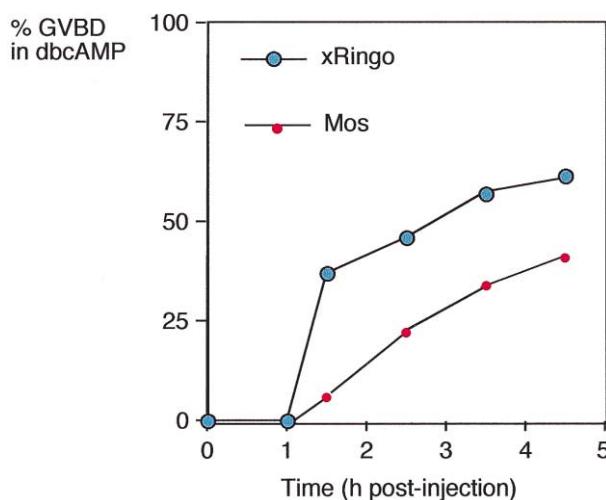


Figure 1. RINGO efficiently triggers GVBD in dbcAMP. Immature mouse oocytes were injected either with mRNA encoding RINGO, or with mRNA encoding Mos, and kept in a medium supplemented with dbcAMP (which inhibits spontaneous meiosis resumption). The percentage of injected oocytes undergoing GVBD in dbcAMP was plotted, relatively to the time spent by injected oocytes in the medium containing dbcAMP after mRNA injection.

tigated the effect of injecting mRNAs encoding RINGO on the resumption of meiosis in mouse oocytes. Mouse oocytes are arrested in prophase I in the ovaries, characterised by the presence of the germinal vesicle (GV), the oocyte nucleus. Oocytes undergo spontaneously meiotic maturation when separated from follicular cells, as evidenced by the rupture of the nuclear membrane, GVBD. To block meiosis resumption, mouse oocytes are cultured in a medium supplemented with dibutyryl-cAMP (dbc-AMP), which mimics a high concentration of AMPc (Bornslaeger et al., 1986).

Immature mouse oocytes were injected with mRNAs encoding RINGO, or with mRNAs encoding Mos as a control (Mos is known to induce GVBD in oocytes blocked in dbcAMP; Verlhac et al., 2000b), and GVBD was scored.

As shown in figure 1, 50% of mouse oocytes injected with mRNAs encoding RINGO undergo GVBD in dbcAMP during the first 3 hours after injection, whereas 5 to 6 hours are necessary for those injected with the Mos mRNAs.

These results suggest that the effect of RINGO on GVBD is conserved in *Xenopus* and mouse. Moreover, RINGO appears to be more efficient than Mos for triggering GVBD.

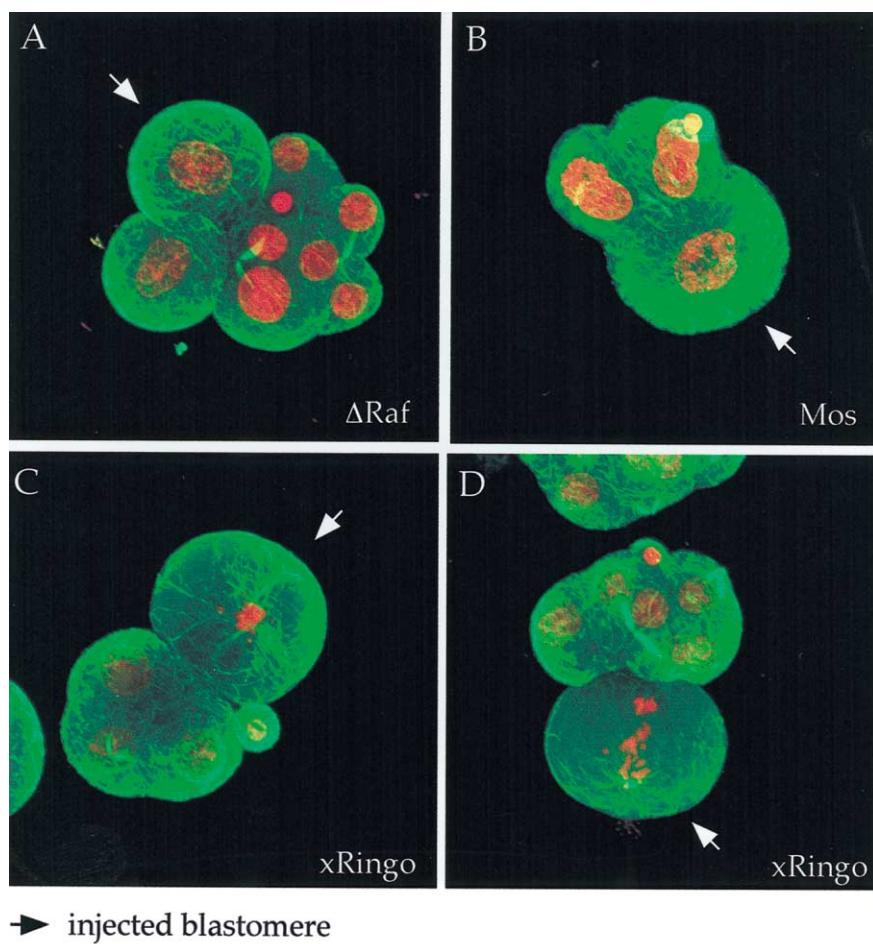


Figure 2. RINGO blocks the division of late two-cell blastomeres more efficiently than Mos or Δ Raf. Late two-cell mouse embryos were injected into one blastomere with mRNA encoding Δ Raf (A), Mos (B) or RINGO (C and D) and were cultured then fixed to examine the effect of mRNA injection on blastomere behavior (the non-injected blastomere serves as a control, and develops normally). Microtubules appear in green and chromatin in red. The white arrows indicate the position of the injected blastomere.

3.2. RINGO induces a cleavage arrest after injection into one blastomere of a late 2-cell mouse embryo

Injection of Mos and Δ Raf, which are both activators of the MAPK pathway, in one blastomere of a late 2-cell mouse embryo induces a cleavage arrest (Verlhac et al., 2000b). This cleavage arrest is caused by ectopic activation of MAPK. Differently from what is seen in *Xenopus* embryo (Haccard et al., 1993; Sagata et al., 1989b), the overexpression of Mos and Δ Raf induces an arrest in interphase in mouse, and not in metaphase as shown in figure 2A and B. Active MAPK also induces arrest in the G1 or G2 phases of the cell cycle in starfish embryos (Abrieu et al., 1997; Tachibana et al., 1997). This may be due to the fact that G1 and G2 phases of the cell cycle appear as soon as the first embryonic mitotic cycle in starfish and mouse, while they appear later in *Xenopus*. We tested the ability of RINGO to induce a cleavage arrest, by injecting mRNA encoding RINGO in one blastomere of a late 2-cell mouse embryo, using Mos and Δ Raf injections as control.

Blastomeres injected with RINGO arrest mainly (77% of the arrested blastomeres) as one cell, whereas the majority of blastomeres injected with Mos or Δ Raf arrest as two cells, as shown in table I. This result suggests that RINGO blocks the division of blastomeres at a step earlier than the arrest caused by Mos or Δ Raf injection. Blastomeres arrested after RINGO injection present an unusual aspect: chromosomes are condensed as in metaphase, but the microtubules are long as in interphase and there is no metaphase spindle (figure 2C and D).

The overexpression of RINGO induces a cleavage arrest in the mouse embryo, as does the activation of the MAPK signalling pathway. However the blastomeres arrested after RINGO injection appear to be in a different state, probably in prophase.

3.3. Overexpression of RINGO protein blocks first and second polar body extrusion

The injection of RINGO mimics Mos injection on GVBD and partially on blastomere division. We de-

Table I. The percentage of injected blastomeres blocked as one cell (before any division) was scored, in comparison with the total percentage of blastomeres blocked (as one cell before any division, and as two cells after one division). Numbers in brackets correspond to the number of blastomeres injected.

	% blocked	% blocked as one cell
Mos (43)	89	30
Δraf (31)	81	20
xRingo (30)	73	77

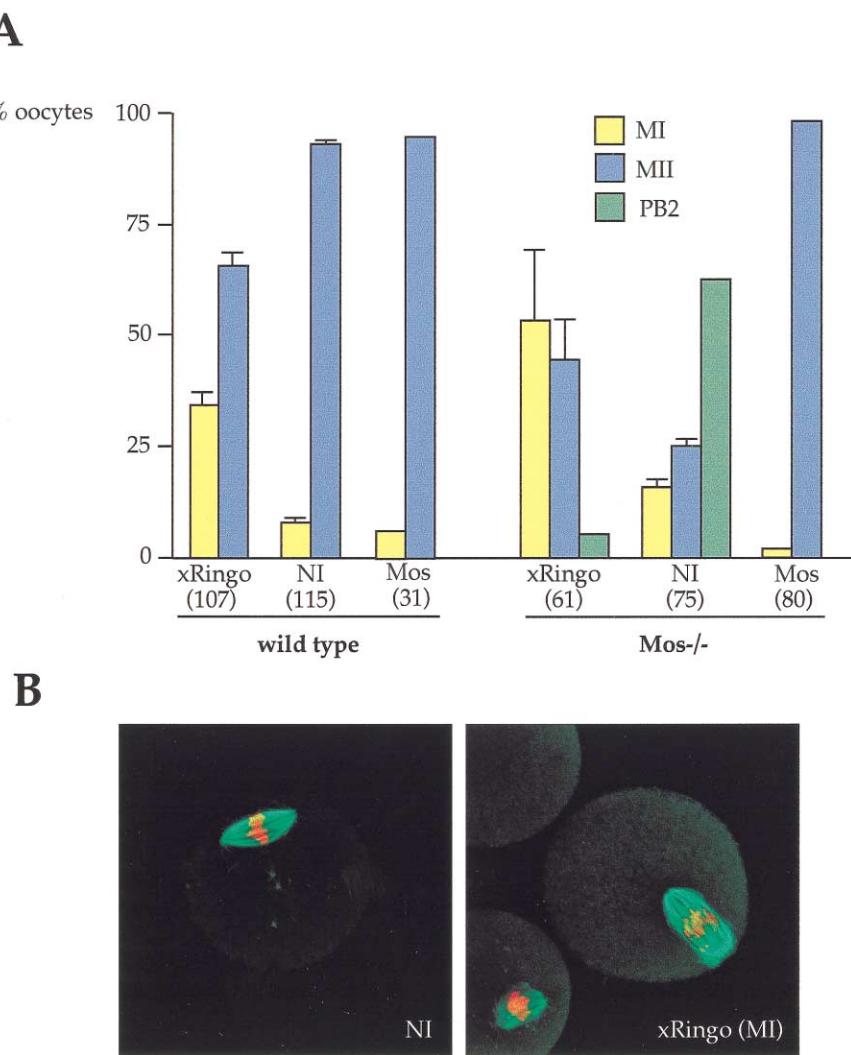
cided to determine whether RINGO could also have other roles in common with Mos. In *Xenopus*, Mos is involved not only in meiosis resumption, but also in the metaphase II arrest, which is due to the CSF activity (Haccard et al., 1993). We investigated whether

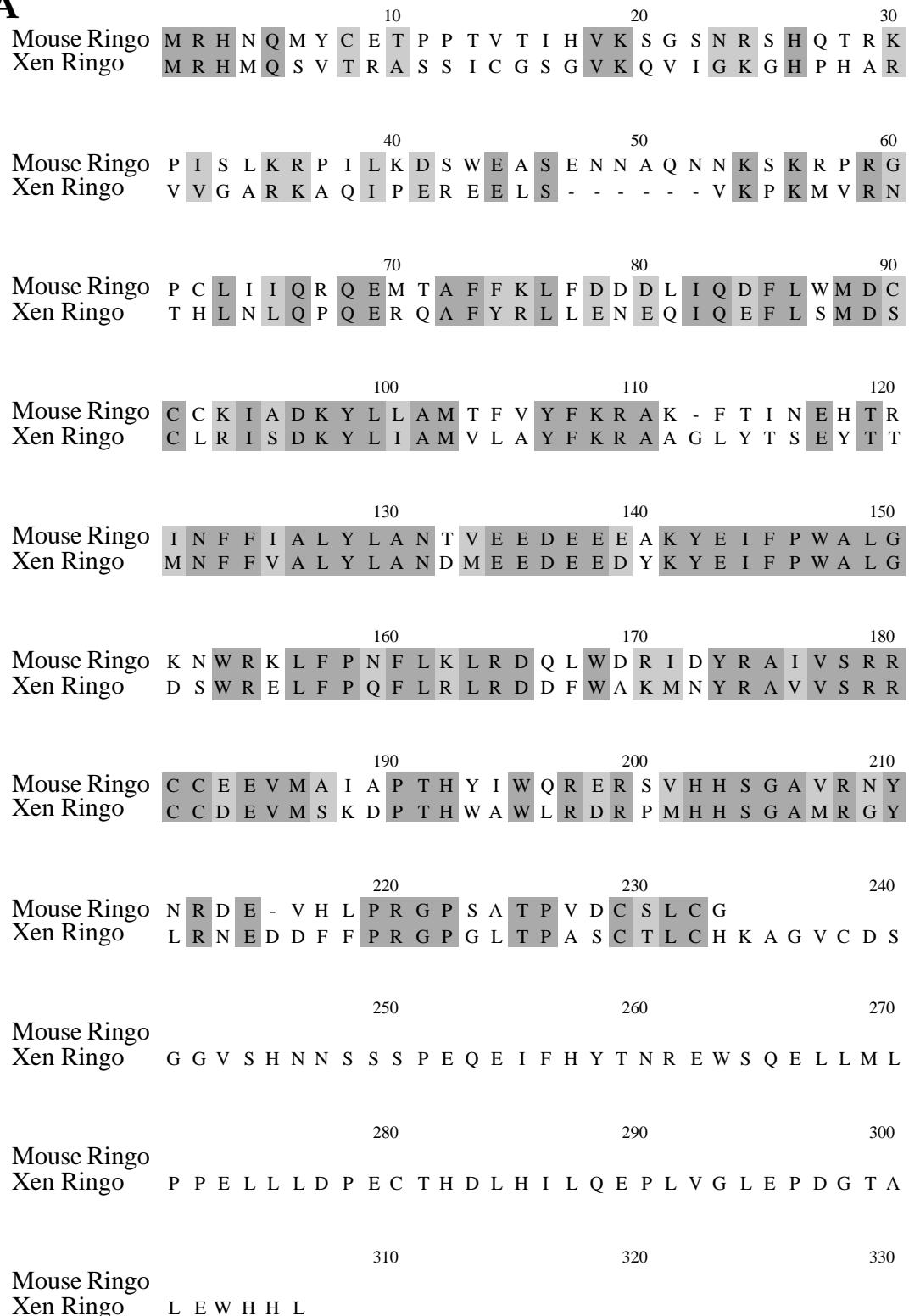
RINGO could also have CSF activity and could compensate for the lack of Mos and CSF arrest in Mos-/- oocytes (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994).

Injection of mRNAs encoding Mos in wild type oocytes has no effect on the first polar body extrusion, and injection of mRNA encoding Mos in Mos-/- oocytes rescues the phenotype: all the injected oocytes arrest in metaphase II, and do not extrude a second polar body as shown in figure 3A (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Verlhac et al., 1996).

In wild type oocytes injected with RINGO, there is a strong inhibition of first polar body extrusion: more than 30% of oocytes are blocked in metaphase I. A similar effect on first and second polar body extrusion is observed in RINGO injected Mos-/- oocytes. A fraction of the oocytes is blocked in metaphase I (55% in oocytes injected with RINGO versus 15% in non-

Figure 3. Overexpression of RINGO into mouse oocytes inhibits polar body extrusion. Wild type and Mos-/- immature mouse oocytes were injected with mRNA encoding RINGO or Mos, and were cultured to evaluate the effect of the mRNA injection on meiotic maturation. **A.** The percentage of injected and non-injected oocytes blocked in Metaphase I (MI), blocked in Metaphase II (MII), and which have extruded a second polar body (PB2) were scored. Numbers in brackets correspond to the number of oocytes injected. **B.** Immunocytochemistry was performed on wild type non-injected oocytes blocked in Metaphase II (NI) and on wild type oocytes blocked in Metaphase I (MI) after injection with mRNA encoding RINGO. Microtubules appear in green, and chromatin in red.



A**Figure 4A.**

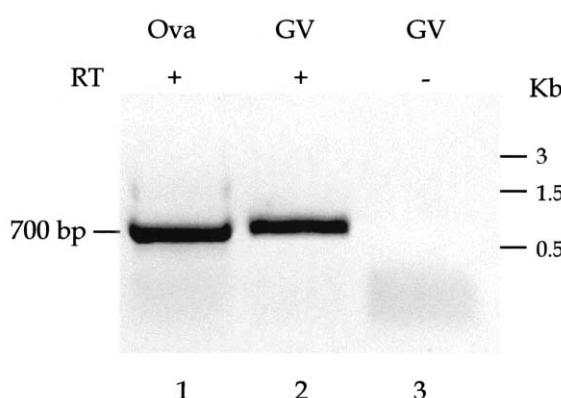
B

Figure 4B. A mouse homologue of RINGO. **A.** amino acid sequence conservation between mouse RINGO and *Xenopus* RINGO. Key to sequences: mouse RINGO (AK014910) and *Xenopus* RINGO (XLA133499). Identical amino acids are boxed in dark grey and homologous amino acids are boxed in light grey. **B.** RT-PCR from RNAs isolated from mouse ovaries (lane 1), from 30 immature mouse oocytes (lanes 2 and 3, + or - RT respectively). The band corresponding to the mouse RINGO mRNA is about 700 bp long. The molecular weight markers are on the right side in Kb.

injected ones) and II (45% in oocytes injected with RINGO versus 25% in non-injected ones) as shown in figure 3A.

The oocytes arrested in metaphase I or metaphase II after the injection of RINGO mRNA show a normal phenotype with condensed chromosomes and microtubule spindles (figure 3B).

The fact that overexpression of RINGO inhibits polar body extrusion suggests that RINGO may have other functions than Mos in the regulation of meiotic maturation.

3.4. The mRNA encoding a potential RINGO homologue is present in mouse immature oocytes

Since we overexpressed a *Xenopus* molecule into mouse oocytes, we wanted to check whether a potential homologue of RINGO could be present in our system. By looking in the DNA databases, we found a mouse EST, isolated from adult testis, which encodes a protein related to RINGO. As shown on figure 4A, this protein has 48% amino acids identical and 62% homologous to the *Xenopus* RINGO. This suggests that it may be a true homologue of *Xenopus* RINGO. By using specific primers for this mRNA, we show by RTPCR that the corresponding mRNA is present in mouse ovaries as well as mouse immature oocytes (figure 4B).

4. DISCUSSION

We show that RINGO injection partially mimics Mos injection: GVBD induction in mouse oocytes and efficient cleavage arrest in mouse embryos. However, our results in mouse oocytes and embryos suggest that RINGO acts at a different level than Mos during meiotic maturation, especially concerning the extrusion of the polar bodies: the overexpression of RINGO in mouse oocytes blocks first and second polar body extrusion.

4.1. RINGO and the Mos/.../MAPK pathway

It was proposed that RINGO, in a mos-independent fashion, could lead directly or indirectly to the activation of the MAPK pathway (maybe via a non-identified MAPKKK; Lenormand et al., 1999). To test this hypothesis, we investigated the possible role of RINGO in mouse oocytes and embryos, in comparison with Mos, which initiates the MAPK pathway. In mouse embryos, Mos injection induces a cleavage arrest of injected blastomeres in interphase with decondensed chromatin and interphase microtubules; RINGO induces also a cleavage arrest, but in a different state: blastomeres arrested after injection seem to be in prophase, with interphase microtubules and condensed chromatin. So the arrest due to RINGO injection occurs at a different cell cycle stage than the one induced by activation of the MAPK pathway. It may reflect that RINGO does not act through the MAPK pathway. Moreover, we show here that the injection of RINGO in wild type and mos-/− oocytes inhibits polar body extrusion, while Mos does not. RINGO is able to rescue partially the mos-/− phenotype (mos-/− oocytes injected with RINGO don't extrude a second polar body), but not by activating the MAPK pathway, just by inhibiting polar body extrusion during the first and second M phase of meiosis. These results suggest that RINGO blocks the meiotic cell cycle in M-phase and that it acts through a pathway different from the MAPK pathway in mouse oocytes and embryos.

4.2. RINGO and the MPF

RINGO can bind and activate Cdc2 (Ferby et al., 1999). Our results in mouse oocytes and embryos are consistent with the fact that blastomeres injected with RINGO arrest mainly at one-cell, before division, whereas blastomeres injected with Mos or ΔRaf arrest at two-cell, after one division. We can imagine that the injected RINGO can interact with Cdc2 in the blastomere and induce some MPF activity, blocking the blastomere at the entry in M-phase. On the contrary,

when Mos or Δ Raf are injected, they will be able to activate the MAPK pathway; which may take more time or be less efficient and could explain why blastomeres injected with activators of the MAPK pathway arrest after one division. The results obtained in mouse oocytes can also be explained by a direct interaction between RINGO and Cdc2. Overexpression of RINGO in wild type and mos $^{-/-}$ oocytes blocks first and second polar body extrusion. RINGO could interact directly with Cdc2 and maintain a high MPF activity despite the degradation of Cyclin B1 that occurs before the metaphase to anaphase transition. This high MPF activity could be responsible for the block in metaphase.

4.3. Potential role for RINGO during meiotic maturation

Overexpression of RINGO in mouse oocytes and embryos indicates that this molecule could play a role in meiotic maturation via its interaction with Cdc2, and not by activating the MAPK pathway. RINGO could be a modulator of MPF activity at critical events of meiotic maturation: entry into first and second M-phases, and exit from first and second M-phases. RINGO could play a role in meiosis resumption by initiating the increase in MPF activity before GVBD, and could contribute to the maintenance of a high level of MPF activity in oocytes arrested in the second M-phase by the CSF arrest.

4.4. Functional conservation between *Xenopus* and mouse

We have used a *Xenopus* protein in our experiments, performed in a mouse system. We first checked that a potential structural homologue of RINGO was present in mouse immature oocytes. We then checked that the effect known for RINGO in *Xenopus* oocytes is conserved in mouse oocytes. We show that indeed the effect of RINGO injection on GVBD is similar in *Xenopus* and Mouse. This result suggests that there is a functional conservation between these two species, and that RINGO could play a role during meiotic maturation.

Acknowledgments. We thank B. Maro for helpful discussion and critical reading of the manuscript. We thank Richard Scharzmann for his help with the confocal microscopy. This work was supported by grants ARC 9913 and ARC 5792 to MHV. MET is a recipient of a MERT fellowship.

REFERENCES

- Abrieu, A., Fisher, D., Simon, M.N., Dorée, M., Picard, A., 1997. MAPK inactivation is required for the G2 to M-phase transition of the first mitotic cell cycle. *The EMBO Journal* 16, 6407–6413.
- Bornslaeger, E.A., Mattei, P., Schultz, R.M., 1986. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 114, 453–462.
- Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M.H., 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64–67.
- Brunet, S., Polanski, Z., Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Maro, B., 1998. Bipolar meiotic spindle formation without chromatin. *Curr. Biol.* 8, 1231–1234.
- Brunet, S., Santa Maria, A., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J.Z., Maro, B., 1999. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic metaphase. *J. Cell Biol.* 146, 1–11.
- Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y., Kohmoto, K., 1991. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113, 789–795.
- Colledge, W.H., Carlton, M.B.L., Udy, G.B., Evans, M.J., 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 65–68.
- Fabian, J.R., Morrison, D.K., Daar, I.O., 1993. Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.*, 645–652.
- Forby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R., Nebreda, A.R., 1999. A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 13, 2177–2189.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J.L., 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262, 1262–1265.
- 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.
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.E., Maro, B., 2001. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.*, 132.
- Lenormand, J.L., Dellinger, R.W., Knudsen, K.E., Subramani, S., Donoghue, D.J., 1999. Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO J.* 18, 1869–1877.
- Louvet-Vallee, S., Dard, N., Santa-Maria, A., Aghion, J., Maro, B., 2001. A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 231, 190–200.
- Masui, Y., Markert, C.L., 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 117, 129–146.
- 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 extract of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 12, 1979–1986.
- Polanski, Z., Ledan, E., Brunet, S., Louvet, S., Kubiak, J.Z., Verlhac, M.H., Maro, B., 1998. Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development* 125, 4989–4997.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N.G., Vande Woude, G.F., Cooper, J., 1993. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2546–2553.
- Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S.D., Van de Woude, G.F., 1989a. The product of the mos proto-oncogene as a candidate initiator for oocyte maturation. *Science* 245, 643–646.

- Sagata, N., Watanabe, N., Van de Woude, G.F., Ikawa, Y., 1989b. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342, 512–518.
- Tachibana, K., Machida, T., Nomura, Y., Kishimoto, T., 1997. MAP kinase links the fertilization signal transduction pathway to the G1/S-phase transition in starfish eggs. *The EMBO Journal* 16, 4333–4339.
- Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T., Kishimoto, T., 2000. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14301–14306.
- Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., Maro, B., 2000a. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr. Biol.*, 10.
- Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W.H., Evans, M.J., Maro, B., 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122, 815–822.
- Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Kubiak, J.Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W., Maro, B., 2000b. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways [In Process Citation]. *EMBO J.* 19, 6065–6074.

Annexe 4

The regulation of competence to replicate in meiosis by CDC6 is conserved during evolution

Lemaitre JM, Bocquet S, Terret ME, Namdar M , Aît-Ahmed O, Kearsey S, Verlhac MH, Méchali M

In press in Mol Rep Dev

The regulation of competence to replicate in meiosis by Cdc6 is conserved during evolution

Jean-Marc Lemaître¹, Stéphane Bocquet¹, Marie-Emilie Terret², Mandana Namdar³, Ounissa Aït-Ahmed⁴, Stephen Kearsey³, Marie-Hélène-Verlhac², and Marcel Méchali^{1*}

¹Institute of Human Genetics, CNRS, Genome Dynamics and Development, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier, France

²Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, UMR 7622 CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

³Dept of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, England.

⁴ Institute of Human Genetics, CNRS, 141, rue de la Cardonille, Montpellier, France

* Corresponding author

Phone : +33 (0)4 99 61 99 17

Fax : +33(0)4 99 61 99 20

E-mail : mechali@igh.cnrs.fr

ABSTRACT

DNA replication licensing is an important step in the cell cycle at which cells become competent for DNA replication. When the cell cycle is arrested for long periods of time, this competence is lost. This is the case for somatic cells arrested in G0 or vertebrate oocytes arrested in G2. CDC6 is a factor involved in replication initiation competence which is necessary for the recruitment of the MCM helicase complex to DNA replication origins. In *Xenopus*, we have previously shown that CDC6 is the only missing replication factor in the oocyte whose translation during meiotic maturation is necessary and sufficient to confer DNA replication competence to the egg before fertilization (Lemaitre et al. 2002; Whitmire et al. 2002). Here, we report that this oogenesis control has been acquired by metazoans during evolution and conserved up to mammals. We also show that, contrary to eukaryotic metazoans, in *S. pombe* *cdc18* (the *S. pombe* CDC6 homologue), CDC6 protein synthesis is down regulated during meiosis. As such, the lack of *cdc18* prevents DNA replication from occurring in spores, whereas the presence of *cdc6* makes eggs competent for DNA replication.

INTRODUCTION

Cells have developed mechanisms to replicate their genome once and only once during S phase. This is achieved by mechanisms that allow the DNA to become competent to replicate just before S phase and prevent re-initiation of DNA replication during the same S phase and in G2. DNA replication initiation requires the regulated assembly of pre-replicative complexes (pre-RCs) onto DNA during G1 phase (Bell and Dutta 2002). Cdc18 in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* was identified as a temperature-sensitive cell-cycle mutant showing defects in the initiation of replication (Kelly et al. 1993). Cdc18 protein was later shown to be essential for the initiation of DNA replication, for loading of the MCM putative replication helicase onto chromatin (Nishitani et al. 2000; Nishitani and Nurse 1997). Cdc6 binding to mammalian and *Xenopus* chromatin in *in vitro* replication systems has also been shown to be a crucial early step in higher-eukaryotic DNA replication. Once the DNA has been licensed, S phase promoting factor, consisting of kinase activities including Cdc7 and cyclin-dependent kinases (CDKs), triggers the prereplication complexes to fire (Bell and Dutta 2002). Recent studies on control of DNA replication in different organisms have underlined the importance of carefully regulating the function of the replication protein

CDC6, not only during cell proliferation but also during cell death. Reduction in levels of CDC6 is commonly associated with loss of proliferative capacity in human cells.

Meiotic maturation, the final step of oogenesis, is a crucial stage of development in which an immature oocyte becomes a fertilizable egg. During meiosis, oocytes lose the ability to replicate during a period whose length depend on the organism (2 years in Xenopus oocyte and 15 to 50 years in women). After a single round of pre-meiotic S-phase, oocytes enter meiosis and rapidly arrest at prophase of meiosis I. Upon hormonal stimulation, arrested oocytes resume meiosis, and re-establish DNA replication competence but maintain repression of DNA replication until fertilization. We previously showed that in Xenopus, the acquisition of the ability to replicate DNA during maturation at the end of meiosis I was due to accumulation of CDC6, a factor essential for recruiting the MCM complex to the pre-replication complex. We showed that CDC6 protein is synthesized during maturation from mRNA stored in the oocyte and that CDC6 was the only missing replication factor whose translation was necessary and sufficient to confer DNA replication competence to the egg before fertilization. In this report, we show that this oogenesis control has been acquired by metazoans during evolution and conserved up to mammals to ensure rapid development. We also show that in contrast to metazoans, in *S. pombe*, protein synthesis of the CDC6 homologue cdc18 is down regulated during meiosis to prevent DNA replication from occurring in spores, whereas the presence of cdc6 makes eggs competent for DNA replication, activated by fertilization.

RESULTS

Vertebrates oocytes are arrested at the prophase stage of the first meiotic division (GV stage for Germinal Vesicle) and are not fertile at this stage. Various stimuli induce the resumption of meiotic maturation which starts with nuclear envelope breakdown (GVBD for Germinal Vesicle Breakdown) then completion of meiosis I (MI) with extrusion of the first polar body followed by an arrest in M-phase of meiosis II (MII) at metaphase (Figure 1A).

Figure 1B shows that in the mouse, as well as in Xenopus, MCM2 protein is already present in the fully grown immature oocyte, but CDC6, a factor involved in MCM loading at replication origins, is absent. CDC6 is synthesized during mouse oocyte maturation (Figure 1B) as previously observed in Xenopus (Lemaitre et al. 2002; Whitmire et al. 2002). Since no transcription is detectable during meiotic maturation in vertebrates, we conclude that, like in

Xenopus, translation of CDC6 in mouse oocyte occurs from messenger RNA already stored in the prophase I oocyte. The amount of protein accumulated at Metaphase I suggests that translation of CDC6 during maturation in mouse starts soon after GVBD, as in Xenopus. Immunolocalization analysis reveals that MCM2 is already stored in the germinal vesicle in mouse oocytes, as previously observed for Xenopus, and released into the cytoplasm at GVBD (Figure 1C). No staining was detected for CDC6 at the prophase I, either in cytoplasm or in GV, whereas CDC6 protein is detected at Metaphase I. Although CDC6 is synthesized at the end of meiosis I, no replication occurs between the two meiotic divisions and oocytes arrest at Metaphase II due to CSF (cytostatic factor). Repression of replication between meiosisI and meiosisII requires the mos/MAP kinase pathway for stabilisation of cdc2 kinase activity which inhibits licensing (Colledge et al. 1994; Dupre et al. 2002; Furuno et al. 1994; Hashimoto et al. 1994; Verlhac et al. 1996). This negative regulation of the license to replicate by CDK activity and (or) by the mos/MAPK pathway before fertilization can be generalized to vertebrates. Moreover a shift in electrophoretic mobility of CDC6 protein also suggests a posttranslational modification potentially involved in the regulation of its activity (Figure 1B).

We then investigated whether this regulation of CDC6 also applies to invertebrate organisms. Of the established model organisms, *Drosophila melanogaster* provides a particularly tractable system to study oogenesis and ovulation. As in mammals, female *D. melanogaster* generate oocytes arrested at the prophase I stage (from stage 2 to 10) during growth (Figure 2A). Oocytes then progress to metaphase I (stage 14) and are surrounded by a vitelline envelope and a chorion. Activation permits resumption of meiosis with the progression to metaphase II and the release of mature eggs from the ovaries (Bloch Qazi et al. 2003; Heifetz et al. 2001).

We first identified a CDC6-related protein in the *Drosophila* genome / EST database (Flybase and supplementary information). In vitro translation of the corresponding cDNA produces a 75 kDa protein that is present in embryos and recognized by Xenopus CDC6 antibody (supplementary Figure) as well as human CDC6 antibody (data not shown). The increased molecular weight when compared to mouse, human or Xenopus is explained by 5 blocks of supplementary sequences in the N-terminal of the protein (see supplementary Figure). Sequence analysis indicates that previously identified structural motifs are also conserved in the *Drosophila* homologue (Williams et al. 1997). The degree of sequence

identity between Mouse, *S. Pombe* and *Drosophila* CDC6-related protein is highest in the mid portion of the protein that contains the nucleotide binding/ATPase domains (Walker A, Walker B), sensor I, sensor II motifs that are hallmarks of AAA+ proteins (Takahashi et al. 2002). *Drosophila* CDC6-related also includes a conserved consensus site for phosphorylation by CDK at the N-terminus (Jans et al. 1995).

Immunolocalization experiments indicate that, CDC6 is present in the cytoplasm of nurse cells and follicle cells which surround the oocyte during growth (stage 2 to stage 10), but not in the oocyte blocked at the prophase I stage (Figure 2B). However, MCM2 is already present and localized in the nucleus of *Drosophila* oocytes, as observed in *Xenopus* and mouse oocytes, as well as in nuclei from nurse cells and follicle cells (Figure 2B). Figure 2C,(a) shows that CDC6 protein is present in eggs laid from both virgin and fertilized females. Whereas MCM2 is already present in stage14 oocytes at metaphase I, CDC6 is absent and is only synthesized during ovulation in *Drosophila*, between metaphase I and metaphase II (Figure 2C, b). Therefore, in the invertebrate *D. melanogaster*, as in *Xenopus* and the Mouse, CDC6 is absent from prophase I oocyte and translated between Metaphase I and Metaphase II.

Is CDC6 also synthesized during meiosis in a unicellular organism that does not couple meiosis to early embryogenesis? *S. Pombe* Cdc18 is the CDC6 homologue. In this species of yeast, meiosis is induced by nutrient deprivation, which promotes conjugation between haploid cells of opposite mating type, followed by premeiotic S phase and nuclear divisions leading to 4 spores (Figure 3A). Cdc18 expression was analyzed in a strain (P1279) where the protein was tagged with cyan fluorescent protein (CFP) and which also contained a conditional *pat1* temperatures mutation. Pat1 encodes a negative regulator of meiosis, and the *pat1ts* strain can be induced to enter meiosis synchronously by using a temperature shift from 25°C to 34°C (Bahler et al. 1991). In the experiment shown in Figure 3, cells were arrested in G1 by nitrogen starvation, then released from the block after the temperature shift to induce meiosis. Progress through meiosis was monitored by flow cytometry (Figure 3C) and DAPI staining of cells to monitor nuclear divisions (Figure 3B(b) “Dapi”; Figure 3B(d)). This showed that pre-meiotic S phase took place about 1.5-2 h after the temperature shift, meiosis I around 4-5 h and meiosis II around 5-7 h. Western blotting (Figure 3B(a)) and analysis of CFP by fluorescence microscopy (Figure 3B(b)”Cdc18”) showed that Cdc18 is not detectable in G1, but levels increase prior to pre-meiotic S phase, as expected. After this step in oocytes,

a block of variable length occurs (a few days in *Drosophila*, and 12-50 years in women) without synthesis of CDC6. In *S. pombe*, no prophase block occurs and Cdc18 is absent after pre-meiotic S phase, as in oocytes (Figure 3B). During *S. pombe* meiotic nuclear divisions, Cdc18 remains undetectable (Figure 3B), whereas it is synthesized, but is presumably not active in the presence of CDK activity, in maturing metazoan oocytes (Figures 1-2).

Therefore, two different modes of cdc6 regulation lead to a similar result: repression of CDC6 activity during meiosis, with the difference that eggs are competent to replicate whereas spores are not.

DISCUSSION

Under certain conditions, the cell cycle can be arrested for a long period of time. Vertebrate oocytes are arrested at G2 phase, while somatic cells arrest at G0 phase. In both cells, nuclei have lost the ability to initiate DNA synthesis due to the absence of CDC6.

CDC6 is absent in the nuclei of quiescent cells rendering them unable to form preRCs (Williams et al. 1998). In rat fibroblasts, Cdc6 expression has been shut off both transcriptionally and post-transcriptionally, when the cell ceases proliferation in the absence of anchorage (Jinno et al. 2002). Quiescent NIH 3T3 nuclei, devoid of CDC6, are incompetent to replicate their DNA in S-phase cytosol of HeLa cells (Stoeber et al. 1998). We recently reported that Xenopus oocytes prevent DNA synthesis during the long G2 arrest by preventing CDC6 translation (Lemaitre et al. 2002) and we show here that the regulation of cdc6 synthesis appears to be a common strategy used in the control of fertilization in both *D. melanogaster*, Xenopus and the Mouse. CDC6 protein is absent from prophase I oocytes in all these species. Cdc6 mRNA, accumulated during the prophaseI-block in oocytes is only translated during oocyte meiotic maturation in Xenopus (Lemaitre et al. 2002), and similarly, translation of Cdc6 mRNA occurs only after GVBD in the Mouse. In *D. melanogaster*, as in vertebrates, transcription is prevented during ovulation, indicating that the regulation of the acquisition of the competence to replicate by CDC6 synthesis before fertilization is under translational control. Strikingly, similar strategies for preventing the untimely replication in cells blocked in G2 for a long period of time or cells arrested in G0 suggest that the suppression of replication licensing due to lack of CDC6 could be a universal mechanism for securing a prolonged arrest of the cell cycle (Kubota and Takisawa 2003).

When a G0 cell is released from quiescence to G1, replication competence is acquired, before

the cell enters S phase, by accumulating Cdc6 and MCM onto chromatin. In quiescent REF52 fibroblasts, overexpression of Cdc6 induces MCM binding to chromatin. Furthermore, coexpression of CyclinE/Cdk2 with Cdc6 is sufficient to initiate DNA replication in these cells (Cook et al. 2002). The absence or presence of CDC6 could thus be viewed as a switch for the competence to replicate.

During ovulation, CDC6 is synthesized conferring on the egg the competence to replicate before fertilization. Consequently, a second mechanism for preventing replication licensing before fertilization must be activated to prevent DNA replication before sperm entry. Phosphorylation, might mediate this second level of regulation of CDC6 activity. CDC6 contains several CDK phosphorylation sites involved in the regulation of its activity (Pelizon et al. 2000; Weinreich et al. 2001). In the Mouse and in Xenopus, we observed a shift in the electrophoretic mobility at Metaphase II (Figure 1), that could be due to phosphorylation by a CDK. This shift could not be experimentally detectable between metaphase I and II during drosophila ovulation, although among potential sites located in the N terminal of mouse and human CDC6, Ser/Thr 54, involved in the regulation of subcellular localisation in the mouse is conserved in Xenopus and *D. melanogaster* suggesting a similar regulation.

Recently, evidence for a similar regulation in the acquisition and repression of the competence to replicate before fertilization has been shown in echinoderm starfish *Asterina pectinifera* (Tachibana et al. 2000). Ablation of c-mos messenger RNA in starfish oocytes caused them to initiate DNA replication immediately after meiosis I and triggers parthenogenetic activation (Tachibana et al. 2000), as previously observed in Xenopus (Dupre et al. 2002; Furuno et al. 1994). This indicates that the competence to replicate is present between meiosis I and meiosis II but is normally repressed by the Mos/MAPK pathway directly or indirectly.

The regulation of CDC6 synthesis and activity appears to be a common strategy used both for cell proliferation and the control of fertilization (Figure 4). The lack of CDC6 in oocytes can be viewed as a safeguard strategy that will prevent any risk of recruiting the MCM helicase on DNA, thereby preventing illegitimate DNA synthesis during the long period of quiescence in female ovaries. Interestingly, CDC6 synthesis appears to be essential both for the license to replicate in the egg, and for sperm binding competence to the oocyte in

vertebrates (Tian et al. 1997). Immature prophase I oocytes do not bind sperm, and under normal physiological conditions sperm binding activity is acquired at meiotic maturation. Injection of Cdc6 can induce sperm binding in immature oocytes (Tian et al. 1997). The induction of two apparently unrelated events, competence for replication and sperm-binding ability (which are both essential for fertilization), by the same protein is unexpected, and reveals a link between DNA replication controls and developmental controls, which might be important in multicellular eukaryotes.

In fission yeast, *cdc18* is absent during meiosis, preventing DNA replication during the meiosis I-II interval (Lindner et al. 2002), whereas in Xenopus and mouse, CDC6 is present but its activity is negatively regulated by CDK activity and (or) the MAPK pathway. Ectopic expression or surrexpression of *cdc18* between meiosisI and meiosisII in *S. pombe* could indicate whether it is the only one to be missing to induce illegitimate DNA replication during this period. In yeast, *cdc18* remains absent from spores, whereas in Drosophila, Xenopus, and the mouse, CDC6 is present in the gamete prior to fertilization (Figure 4). In these species, however, the first cell cycles after fertilization occur without transcription and a store of CDC6 is therefore essential. In fission yeast, the absence of Cdc18 may be a safeguard against inappropriate re-replication during the later stages of meiosis in a manner that does not require additional controls (such as involving c-mos) to repress licensing. Fission yeast spores subsequently re-enter the cell cycle with new transcription of *Cdc18* as in somatic cells. CDC6 can be viewed therefore both as a security system for preventing unscheduled replication (Kubota and Takisawa 2003), and as a licensing signal to compensate the lack of transcription during early development.

MATERIAL AND METHODS

Collection and culture of mice and *Xenopus* oocytes

Immature oocytes arrested at prophase I of meiosis were obtained by removing ovaries from 5- to 6-week-old Swiss female mice. The ovaries were placed directly into warmed (37°C) M2 medium (Whittingham 1971), and ovarian follicles were punctured to release the

enclosed oocytes. Only those immature oocytes displaying a germinal vesicle (GV) were collected and cultured further in M2 medium under liquid paraffin oil at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. The resumption of meiotic maturation was typically observed 1 hour after release from the follicles. The oocytes were scored for GVBD, for the extrusion of the first polar body and for the extrusion of the second polar body.

Xenopus oocytes were sorted for stage 6 and maturation was triggered by progesterone addition as previously described (Lemaitre et al. 2002). Low-speed extracts of maturing oocytes were prepared as described for egg extracts in Eppendorf tubes (Menut et al. 1999). After the excess buffer was removed, the oocytes were centrifuged at 8,000g for 5 min at 4 °C, and then at 12,000g for 2 min at 4 °C. The upper phase was collected and centrifuged again at 12,000g for 2 min at 4 °C. The extract was adjusted in Laemmli Buffer for SDS PAGE analysis (Laemmli 1970).

Ovaries from flies were hand dissected and placed in ice cold PBS. *In situ* hybridization to whole-mount ovaries was carried out essentially as described above. Protein extracts with stage 14 and laid eggs from fertilized or virgin female were prepared directly by resuspending in Laemmli buffer immediately after dechorionation as described in (Tautz and Pfeifle 1989).

Immunoblotting

Oocytes at the appropriate stage of maturation were collected in sample buffer (Laemmli, 1970) and heated to 100°C for 3 minutes. The proteins were separated by 10% SDS PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Following transfer and blocking for 1 hour in 5% skimmed milk in PBS, containing 0.1% Tween-20, the membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted at the appropriate dilution in 1% BSA in PBS. We then used a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Amersham) diluted 1:1000 in 1% BSA in PBS/Tween. The membranes were washed three times in TBS/Tween and then processed using the ECL detection system (Amersham).

Immunofluorescence

Isolation, fixation and labelling of mouse oocytes were performed as described by (Kubiak et al. 1992) and as described by (Tautz and Pfeifle 1989) for *Drosophila* oocytes. In both cases specific primary antibodies were incubated at the appropriate dilution one hour at

room temperature in 1% BSA. We then used secondary antibodies, conjugated either to fluorescein or rhodamine (Miles). The chromatin was visualized using propidium iodide (Molecular Probes; 1 µg/ml in PBS) because DAPI was not suitable for confocal analysis. Samples were observed with a Bio-Rad MRC-600 confocal microscope.

Antibodies

CDC6 human/mouse antibody was provided by (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and Xenopus CDC6 antibody was prepared as previously described (Lemaitre et al. 2002). Both CDC6 antibodies directed against Human and Xenopus CDC6 protein recognized Drosophila CDC6 protein (supplementary datas). Antibody against MCM2 Drosophila protein was kindly provided by TT Sue (Su et al. 1996).

Yeast Strains and Methods

Cdc18 was tagged CFP in the background of a *pat1ts* allele (*pat1-114*) using the pSMUC2+ plasmid, to generate strain P1279, as described in (Gregan et al. 2003). Expression of Cdc18 expression during fission yeast meiosis was analyzed using G1 block and release as described in (Lindner et al. 2002). Basically, a *cdc18-CFP pat1ts* strain (p1279) was arrested in G1 by nitrogen starvation for 16 h at 25°C, after which cells were re-fed at 34°C to induce meiosis. Samples were taken every 30 minutes and analyzed by flow cytometry, fluorescence microscopy and Western blotting, as described previously (Grallert et al. 2000; Lindner et al. 2002), using anti-GFP monoclonal antibody 3E1 to detect Cdc18-CFP and α-tubulin was detected with Sigma T5168 used at a dilution of 1/10000. DNA was stained with sytox green for flow cytometry and DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) for fluorescence microscopy.

Figure Legends

Figure 1 : CDC6 control in meiosis in vertebrates

A Scheme for vertebrate meiosis.

B Extracts from 5 Xenopus maturing oocytes or 85 maturing mouse oocytes were separated by SDS PAGE and examined by immunoblotting with anti CDC6 and anti MCM2 antibodies as described in methods.

C Immunolocalization of CDC6 and MCM2 proteins in mouse maturing oocytes. The very weak signaldetected for CDC6 in prophaseI is due to background as non-immune IgG used as control give similarly weak signal.

Figure 2 : CDC6 control in meiosis in *D. melanogaster*

A schematic drawing of *Drosophila* meiosis.

B Immunolocalization of CDC6 and MCM2 during *D. melanogaster* oogenesis. Right panels are enlargements of the covering cells at the posterior end of the stage 14 oocyte.

C Western blot analysis. In (a) the proteins were prepared from eggs newly laid by 25 virgin (1), and fertilized female (2). In (b) the protein extracts were prepared from 25 stage 14 oocytes directly taken from ovaries (1), or 25 newly laid eggs from non fertilize females (2). The egg chorion and vitelline membrane were removed prior to protein extraction.

Figure 3 : Cdc18 regulation in meiosis in *S. pombe*, showing Cdc18 is repressed after pre-meiotic S phase.

A Scheme for meiosis in *S. pombe*.

B Cdc18 levels during meiosis. (a) Western analysis of Cdc18 levels during meiosis. A *pat1ts cdc18-CFP* strain (P1279) was arrested in G1 by transferring to EMM medium lacking nitrogen for 16h at 25°C, after which cells were re-fed and shifted to 34°C to induce meiosis. The blot shows Cdc18 levels (assessed using an anti-GFP antibody) at different times after the shift. The “nda3” lane is a control sample from an *nda3 cdc18-CFP* strain(P1280) arrested in mitosis when Cdc18 level is high. a-tubulin is shown as a loading control. (b) Analysis of Cdc18-CFP fluorescence during meiosis. Cells were fixed with ethanol before imaging for CFP (top panel) and DNA (DAPI staining). The lower DAPI-staining panels are merged with the phase images to show the positions of cells. The levels of fluorescence seen at 0, 3.5, 5

and 7 h are not higher than background levels seen in a non tagged strain (not shown). (c) Flow cytometric analysis showing execution of premeiotic S phase around 1.5-2 h after the shift. “exp” is an exponential mitotic culture. (d) The average number of nuclei per cell during the time course of meiosis was counted to indicate the timing of the meiosis I and II nuclear divisions.

Figure 4 : Acquisition of the competence to replicate by CDC6 during eukaryote meiosis. Synthesis of CDC6 during meiosis is described in vertebrates (*Xenopus*, mouse and invertebrates (*Drosophila* and starfish). In starfish, competence to replicate has been shown to be present after GVBD, implying that CDC6 is present at this stage (hatched bars). This reentry in the cell cycle is achieved at fertilization by the relief of CDC6 repression CDKs (Masui 2000; Sagata et al. 1989), whereas in *S. pombe*, Cdc18 remains absent until germination.

Supplementary Figure : Characterisation of *D.melanogaster* CDC6 homologue.

A Sequence alignment of *D.melanogaster* CDC6 homologue with *X. laevis*, mouse, and *S. pombe* yeast. Conserved functional motifs, the nucleotide binding/ATPase domains (Walker A, Walker B), sensor I, sensor II motifs that are hallmarks of AAA+ proteins (Takahashi et al. 2002) are underlined with dark line. A conserved consensus site in N-terminal for phosphorylation by CDK (Jans et al. 1995) is marked by a star.

B Immunoblot analysis of protein extracts from 5 *Xenopus* eggs (1), 25 *D.melanogaster* eggs and a S^{35} labelled in vitro translation of the *Drosophila* CDC6 cDNA (LD 25083 CDC6) (3)

Acknowledgments: We thank François Juge, Nader Ezzeddine for help and advice in the initial course of these experiments. We also thank N. Montel for technical assistance and Lautredou Nicole from the Center of Research in Imagerie (CRIC) in confocal assistance. S. Kearsey and M. Namdar work were supported by a grant from Cancer Research UK.

REFERENCES

- Bahler J, Schuchert P, Grimm C, Kohli J. 1991. Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with pat1-114 diploid cells. *Curr Genet* 19(6):445-451.
- Bell SP, Dutta A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71:333-374.
- Bloch Qazi MC, Heifetz Y, Wolfner MF. 2003. The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 256(2):195-211.
- Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370(6484):65-68.
- Cook JG, Park CH, Burke TW, Leone G, DeGregori J, Engel A, Nevins JR. 2002. Analysis of Cdc6 function in the assembly of mammalian prereplication complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1347-1352.
- 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.
- 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(10):2399-2410.
- Grallert B, Kearsey SE, Lenhard M, Carlson CR, Nurse P, Boye E, Labib K. 2000. A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *J Cell Sci* 113 (Pt 8):1447-1458.
- Gregan J, Lindner K, Brimage L, Franklin R, Namdar M, Hart EA, Aves SJ, Kearsey SE. 2003. Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding. *Mol Biol Cell* 14(9):3876-3887.
- 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(6484):68-71.
- Heifetz Y, Yu J, Wolfner MF. 2001. Ovulation triggers activation of *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* 234(2):416-424.
- Jans DA, Moll T, Nasmyth K, Jans P. 1995. Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells. *J Biol Chem* 270(29):17064-17067.
- Jinno S, Yageta M, Nagata A, Okayama H. 2002. Cdc6 requires anchorage for its expression. *Oncogene* 21(11):1777-1784.
- Kelly TJ, Martin GS, Forsburg SL, Stephen RJ, Russo A, Nurse P. 1993. The fission yeast cdc18+ gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* 74(2):371-382.
- Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Maro B. 1992. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *J Cell Sci* 102 (Pt 3):457-467.
- Kubota Y, Takisawa H. 2003. Block to DNA replication in meiotic maturation: a unified view for a robust arrest of cell cycle in oocytes and somatic cells. *Bioessays* 25(4):313-316.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.
- Lemaitre JM, Bocquet S, Mechali M. 2002. Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation. *Nature* 419(6908):718-722.
- Lindner K, Gregan J, Montgomery S, Kearsey SE. 2002. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol Biol Cell* 13(2):435-444.
- Masui Y. 2000. The elusive cytostatic factor in the animal egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3):228-232.

- Menut S, Lemaitre JM, Hair A, Méchali M. 1999. DNA replication and chromatin assembly using *Xenopus* egg extracts. In *Advances in Molecular Biology: A comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos*, Oxford University Press, Ed JD Richter.
- Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P. 2000. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404(6778):625-628.
- Nishitani H, Nurse P. 1997. The cdc18 protein initiates DNA replication in fission yeast. *Prog Cell Cycle Res* 3:135-142.
- Pelizon C, Madine MA, Romanowski P, Laskey RA. 2000. Unphosphorylatable mutants of Cdc6 disrupt its nuclear export but still support DNA replication once per cell cycle. *Genes Dev* 14(19):2526-2533.
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342(6249):512-518.
- Stoeber K, Mills AD, Kubota Y, Krude T, Romanowski P, Marheineke K, Laskey RA, Williams GH. 1998. Cdc6 protein causes premature entry into S phase in a mammalian cell-free system. *Embo J* 17(24):7219-7229.
- Su TT, Feger G, O'Farrell PH. 1996. Drosophila MCM protein complexes. *Mol Biol Cell* 7(2):319-329.
- Tachibana K, Tanaka D, Isobe T, Kishimoto T. 2000. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26):14301-14306.
- Takahashi N, Tsutsumi S, Tsuchiya T, Stillman B, Mizushima T. 2002. Functions of sensor 1 and sensor 2 regions of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc6p in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 277(18):16033-16040.
- Tautz D, Pfeifle C. 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98(2):81-85.
- Tian J, Thomsen GH, Gong H, Lennarz WJ. 1997. *Xenopus* Cdc6 confers sperm binding competence to oocytes without inducing their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):10729-10734.
- Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122(3):815-822.
- Weinreich M, Liang C, Chen HH, Stillman B. 2001. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11211-11217.
- Whitmire E, Khan B, Coue M. 2002. Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes. *Nature* 419(6908):722-725.
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl* 14:7-21.
- Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. 1998. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14932-14937.
- Williams RS, Shohet RV, Stillman B. 1997. A human protein related to yeast Cdc6p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1):142-147.

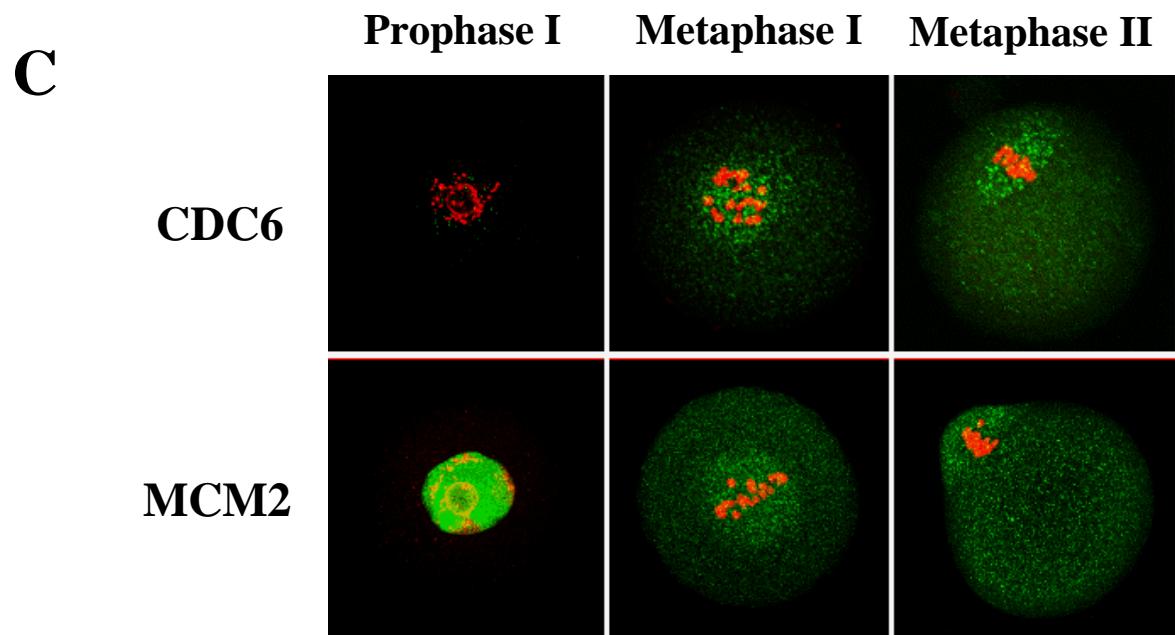
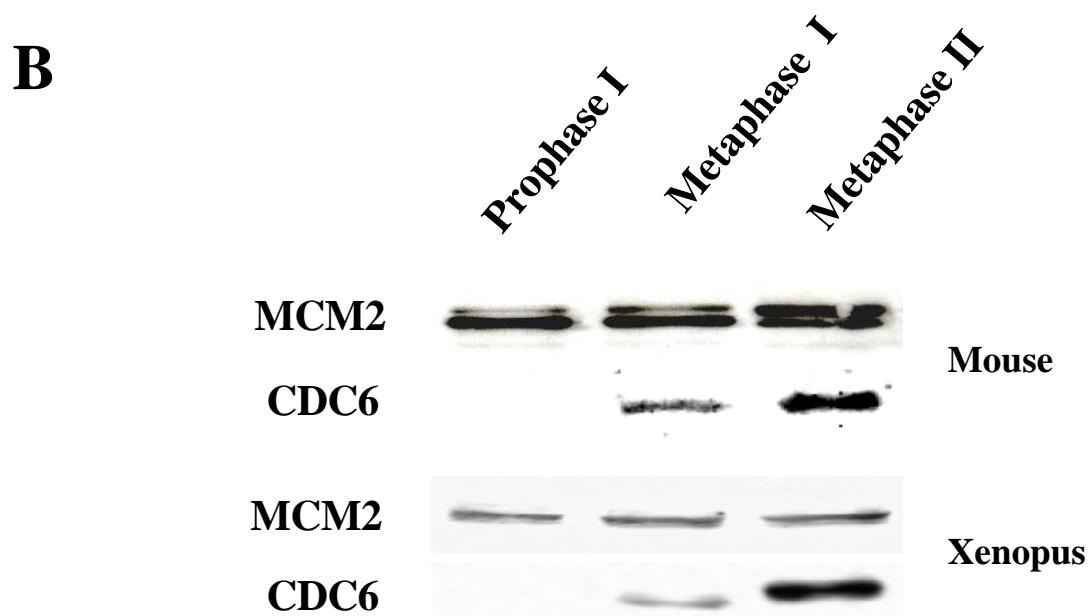
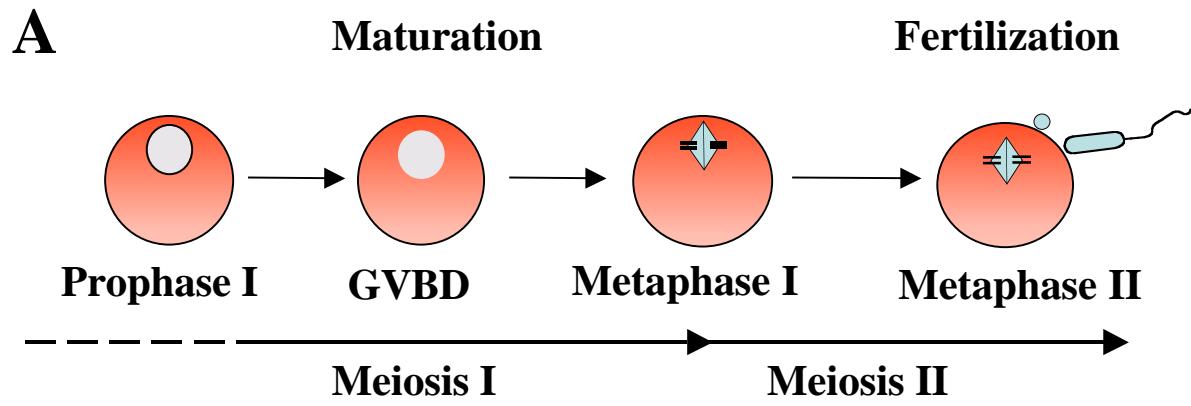


Figure 1

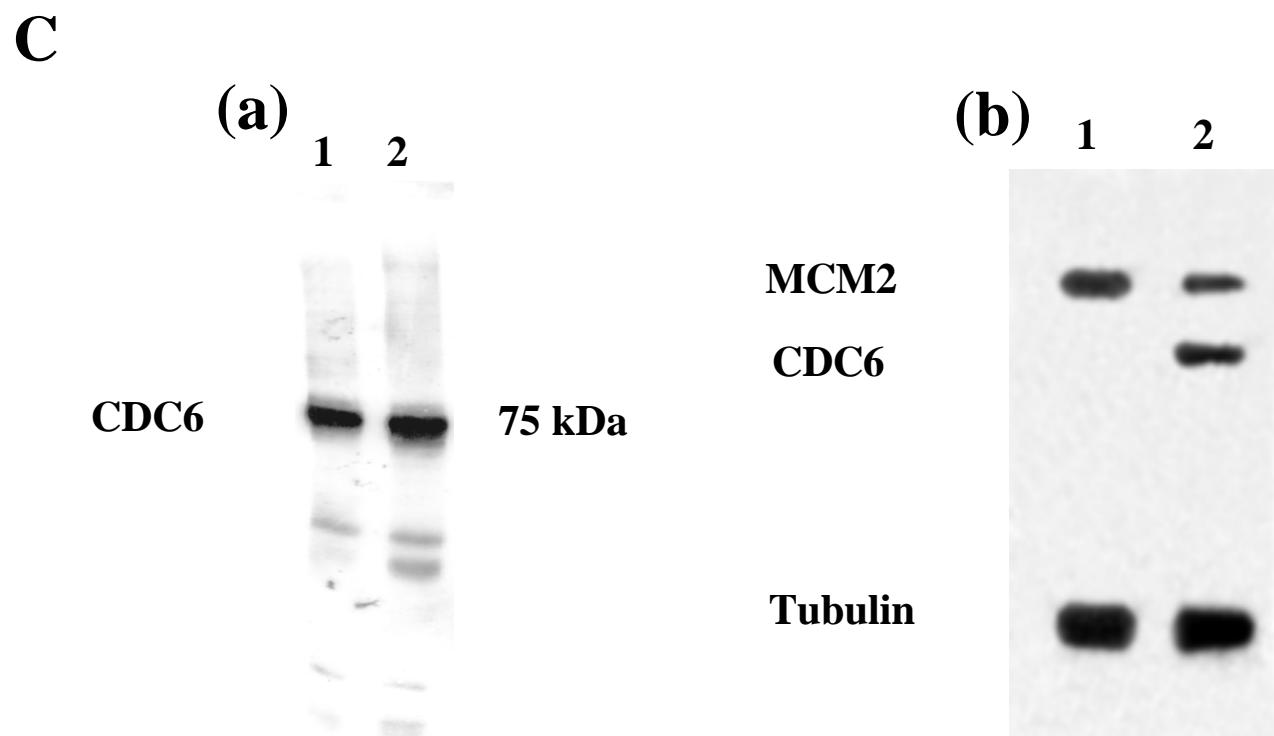
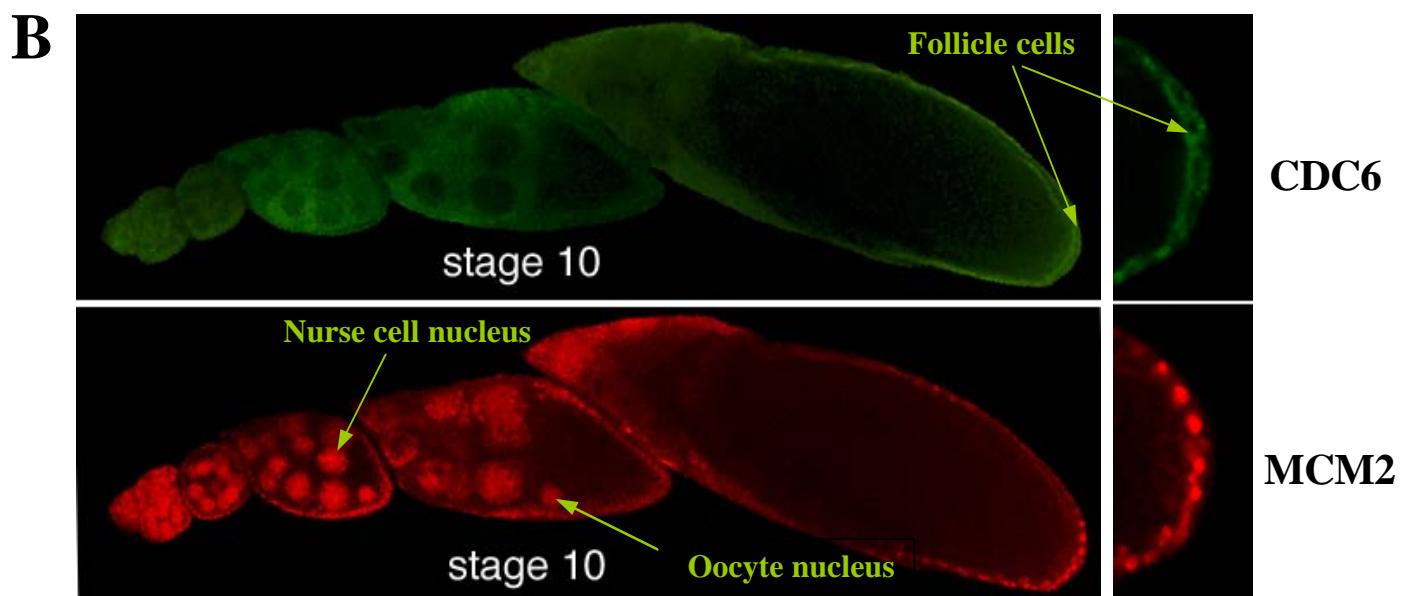
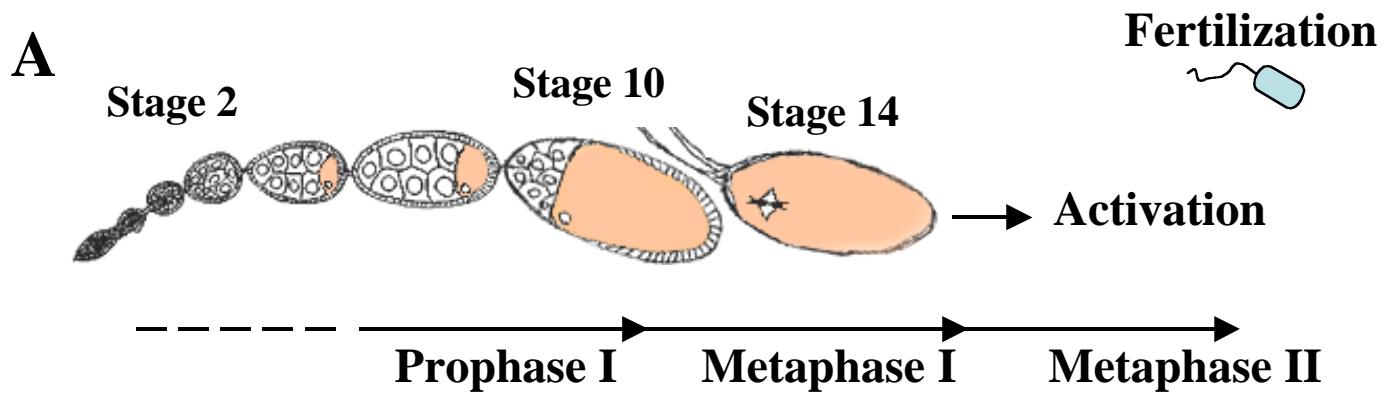


Figure 2

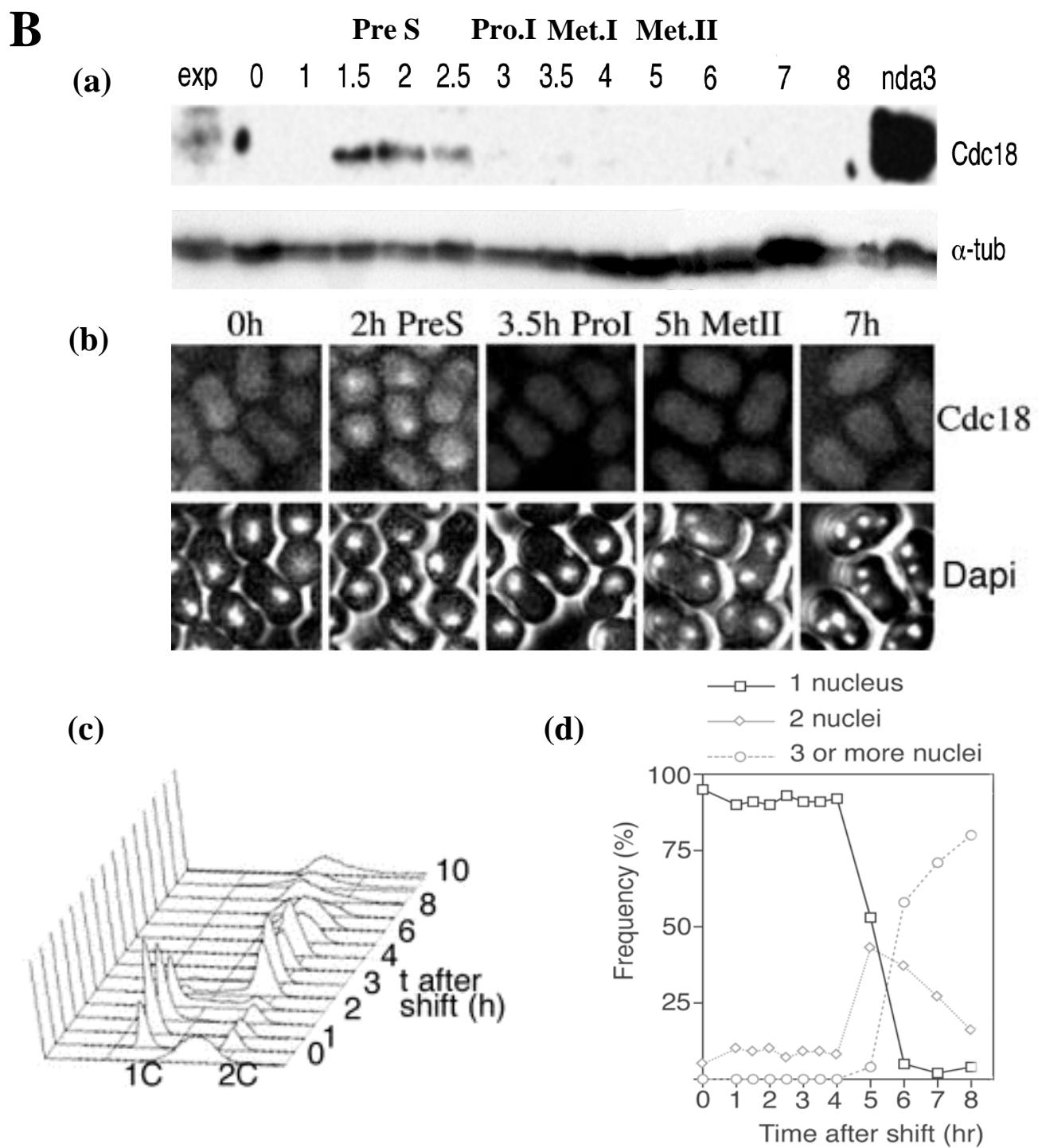
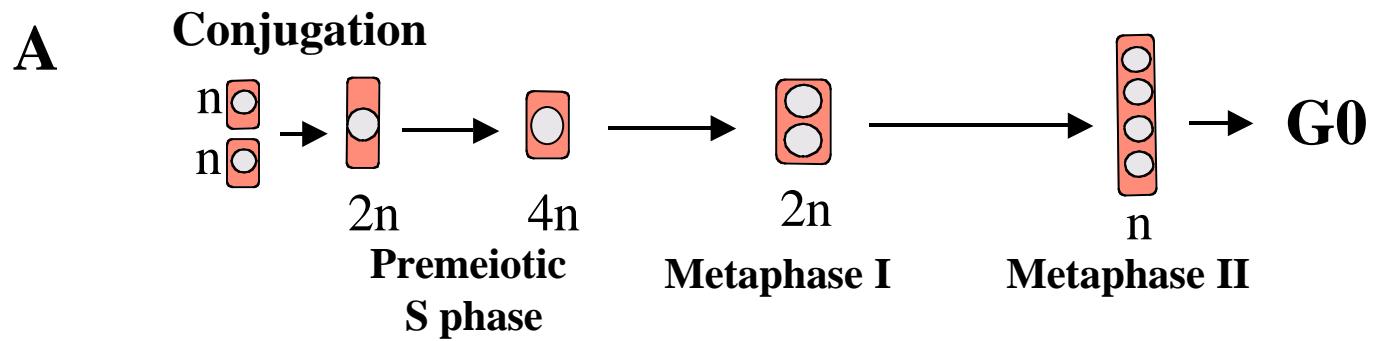
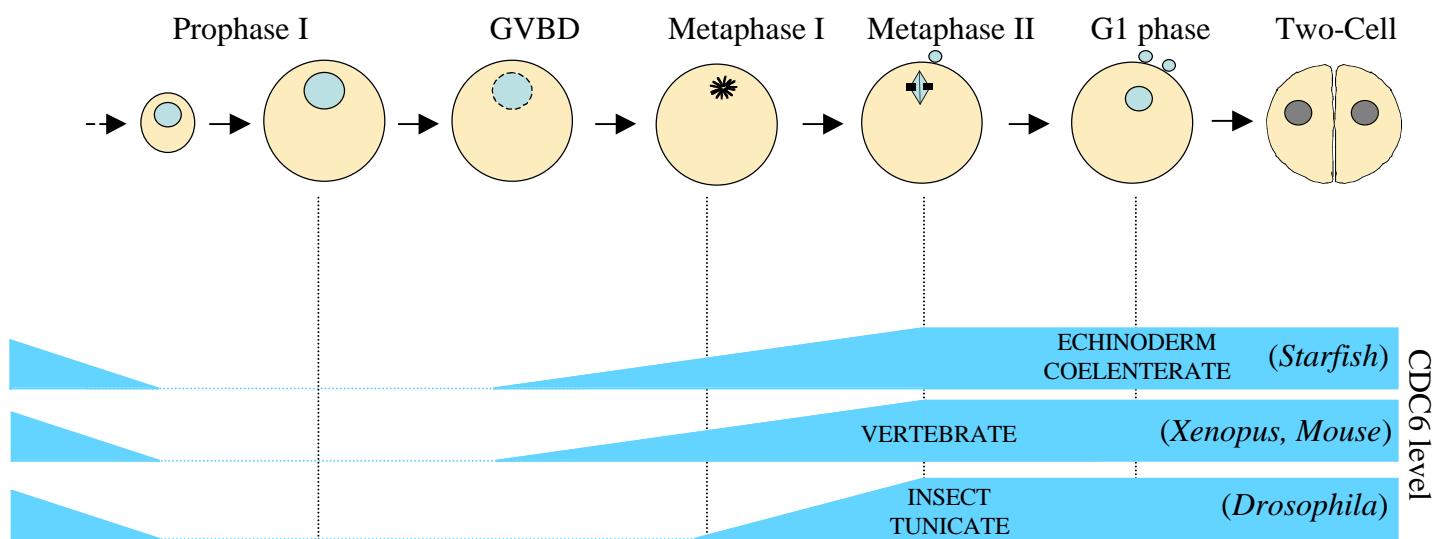


Figure 3

MULTICELLULAR EUKARYOTE



UNICELLULAR EUKARYOTE

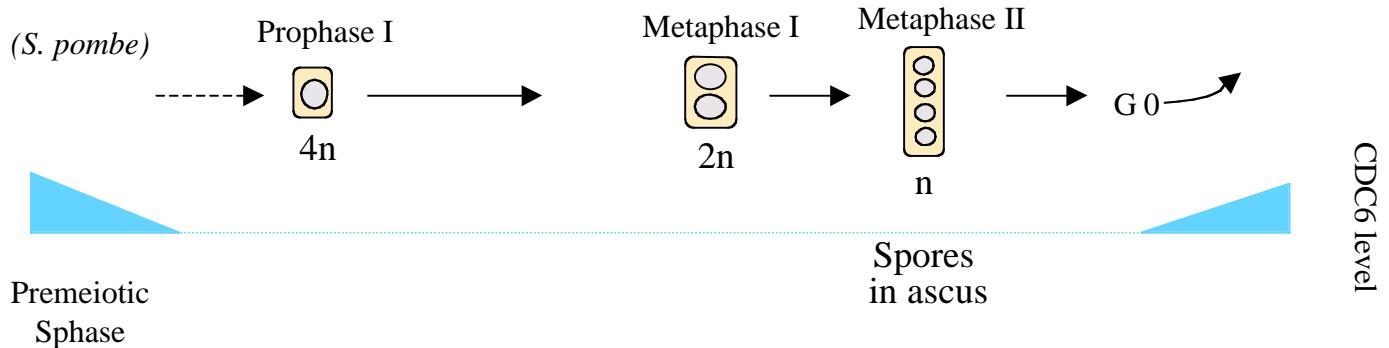
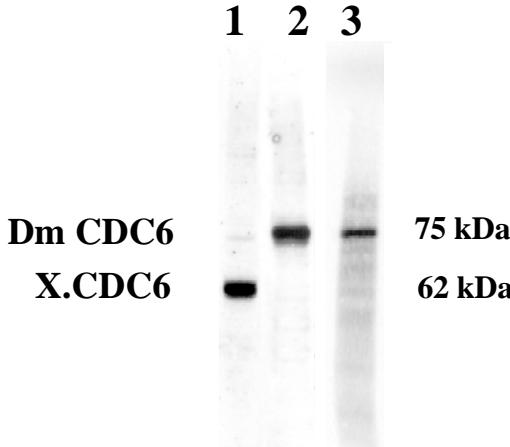


Figure 4

A

Mouse	-----	MPQTR	-----	SQTQATIGFPKKLSNTLKKPNSRD	-----
Xenopus laevis	-----	MPSTR	-----	SRSQSSIQFPKKKTSOTLAKEVSR	-----
Drosophila	-----	MAAVRRSTRLSSISKATAASPLPPSTQTPRRSEVWKRRQPKKVL	-----	-----	-----
S.pombe	-----	MCETF	-----	IGCHTPRRCNRFIDSAAI	-----
Mouse	-----	-----	-----	CEVKLRNVQPVPTTPCVDVLLPLSP	-----
Xenopus laevis	-----	-----	-----	AKSKSEICSSVSLPLSPLPKELPLSP	-----
Drosophila	ADSDEEEEVVTAIYDLTSPVSENNENRNLNKMDK	I	SRRRTSQVQAQSEL	PKTPRS TKK	-----
S.pombe	-----	-----	CTNKTNQREHSPSF	SIE IPTTPSRK	-----
Mouse	-----	RKRLGDDNL	CNT PRL	SPC SPPKLGKENGPPR	-----
Xenopus laevis	-----	RKRLGDDNRCN	I PPTL	SCSPPKQSRKE TGP	-----
Drosophila	TVQSAGSSRAKRE	EEN	CREA TARFLE	GE QDSEVDPHLGSPPKQRKLQPLPQHL	I SPSRLLD
S.pombe	-----	RTLASSHF	QTPTKRI	KYEL GELQEETDLYPN	F PAQLKENK
Mouse	RLVFDDEP	-----	-----	TFKAASP PKE QDRVRQHOI RISSSAQRSP	-----
Xenopus laevis	RLLFDENQ	-----	-----	AAAATELP SPLKKLQDPYQOLSPVVRKGQET	-----
Drosophila	RLSIDERQEEVEA	TTHKTE	TAE QQPKHQAKDE	AKPRPKQKQEDPLAQKQQE KPPTKQPNK	-----
S.pombe	KPKLPTTP	-----	-----	QTPKTPKR-TIQIVTPKSLNRTCNPV	-----
Mouse	SKADPPEOKCPPEKE	SVCIRLF	KQKGTCYQQAKLVLN	TAVPIDRLPAREQEMGVIRNFLK	-----
Xenopus laevis	PPSSRKQ-	RNSVGVQL	F KQEGSCYQAKHALN	TAIPERLLARESETAFIKTFLT	-----
Drosophila	NQTKESNIQTNF	ETQQNNLP	S P S R N K Y Q N A R R V L N	SAETQNLPGRESQLQELREFFS	-----
S.pombe	PFATRLLQSTPHQLFPPTP	S T P	P ST P S Y N I S T A K L S L R K	SYR SAG VV G R E N E K S I V E S F F R	-----
Walker A					
Mouse	EHIICGKKAGSLYL	S G A P G T	G K T A C L S R I L Q D F	K K E V K G F K S I L L N C M S R S A Q A V F P A I A	-----
Xenopus laevis	SHVSARKAGSLYI	S G A P G T	G K T A C L N K L L Q E S K D D L	K O C K I V Y I N C M S L R S I S Q A V F P A I A	-----
Drosophila	NHLESQTSGLYVS	S Q P G T	G K T A C L S L L R D	P D F S K R L Q R V Y I N C T S I A S V G A V Y K K L C	-----
S.pombe	QHLDANAGGALYVSGAPGT	G K T V L L H N V L D H V V S D Y	P K V N V C Y I N C M T I N E P K A I F E K I H	-----	-----
Walker B					
Mouse	QEIGREELCR	-----	PAGKDLMRKLEKHLTAEKGPML	V L V L D E M D Q L D S K G Q D V L Y T L F E	-----
Xenopus laevis	EEISGGKSS	-----	LAAKDMVRNLEKLVTS	K G P I I L L V L D E M D Q L D S R G Q D V L Y T V F E	-----
Drosophila	TELQLKVSG	-----	RTERDHLEAIQRHLTK	-AKRMILLVLDFTDQLCTS R Q E V L Y T L F E	-----
S.pombe	SKIVKEE	I L E N E D H H I	N F Q C E L E S H F T Q S A N E L Y N P V I	I V L D E M D H L I A R E Q Q V L Y T L F E	-----
Sensor I					
Mouse	WPWL SNSRL	L V L I G I A N T L D L	T D R I L P R L E A R E	N C K P Q L L N F P P Y T R N Q I A A I L Q D R L S Q V	-----
Xenopus laevis	WPWL PNSRML	I G I A N A L D L	T D R I L P R L Q A R P Q C K P Q L L N F	S P Y T K D Q I A T I L Q D R L N Q V	-----
Drosophila	WPALPCSR	I L L V G I A N S D L	T D R A L M R L N A R C E L K P R L M H F P P Y S K Q Q I V E I	F K S R L A E A	-----
S.pombe	WPSRPTSR	I L V G I A N A L D M T D R F L P R L R T	K H I T P K L L S F T P Y T A Q E I S T I I K A R L K T A	-----	Sensor II
Mouse	SKDQ	-----	-----	VLD SAAI Q F C A R K V S A V S G D I R K A L	-----
Xenopus laevis	SGDQ	-----	-----	VLD N A A I Q F C A R K I S A V S G D A R K A L	-----
Drosophila	EVLD	-----	-----	V F P P V T L Q L L A A K V S A I S G D V R R A L	-----
S.pombe	ATTSEKNNPFTPIKSI	SEVSDDS	I N V V S Q H A D E T P F I H P A A I E L C A R K V A A S S G D L R K A L	-----	-----
Mouse	DIVCRR	IAE I V E S D V R S	-----	SPVPKRVGLAH I S Q V I S E V D G	-----
Xenopus laevis	DICRR	RAVE I V E A D V R G	-----	Q T V L K P L T E C L S P S K E A P S N P V P K K V S L P H I S R V L S D V Y G	-----
Drosophila	DIGRR	V V E A B Q Q K R D G E K E	F N M K A L Q L E G K D A V E A K E	K Q D T L K P V Q V T Q V A A V L N K V Y G	-----
S.pombe	DICRH	A E L A B R E W K A	-----	Q H D N ----- T L S S D I P R A S I A H V V R A T	-----
Mouse	NRVTL	S Q E N T D S I L P L	Q Q K I L V C S L L L L	T R R L K I K E V T L G K L Y E A Y S S I C R K Q Q V T A V D Q	-----
Xenopus laevis	DKMASNG	-G S S D S F	P L Q Q K L L V C A L L I	I T R Q S K I K E V T L G K M H E A Y S K V C R K Q Q V P G V G Q	-----
Drosophila	A S O N E E	-D I E A S F	P L Q Q K L M L C T L V L M R N E R N K D I S M G R L H E V Y R R V C A K R N I L A L D Q	-----	-----
S.pombe	S A M S O S A S A R L K N L G L	Q Q K A I L C T L V V C E K T S	-----	L S V A D V F E K Y S S L C L R D R L I Y P L T S	-----
Mouse	SECL	S L S G Q L L E S R G	G L V G L K K N K	-----	E S R L T K V S L K I E E K E I E H V L N G K A F T G N I L A A G L P
Xenopus laevis	SECL	S L C Q L L E T R G	I L G L K K A K	-----	E E A R L T K V S L K I E E R D I E H A F K D K L L I G N V L N S G I
Drosophila	A E F T G T V D L	W E T R G I L R I M R K	-----	-----	-----
S.pombe	SEF	C D V A N S L E T L A I	I T R L R T K Q R N G K P Q D R I I S L L V P E M D V I T A V G D I G T L K R F F D R R	-----	-----
Mouse	---	---	---	---	---
Xenopus laevis	---	---	---	---	---
Drosophila	L SK	---	---	---	---
S.pombe	---	---	---	---	---

B

Contrôle de la transition méiose I/méiose II et rôle de DOC1R au cours de l'arrêt CSF lors de la maturation méiotique chez la souris

La maturation méiotique des vertébrés diffère de la mitose par plusieurs aspects. J'ai étudié deux de ces particularités. 1) En méiose I, les chromosomes homologues sont ségrégés, en mitose, les chromatides sœurs sont séparées. En mitose, un mécanisme de contrôle bloque la cellule en métaphase en inhibant l'APC/C tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur le fuseau. En méiose I, des résultats contradictoires existent selon les espèces quant à l'existence d'un mécanisme de contrôle de ce type. J'ai montré que l'activité séparase (activité indirectement régulée par l'APC/C) est requise pour effectuer la transition métaphase/anaphase en méiose I, suggérant qu'un mécanisme de contrôle de ce type est requis chez la souris, organisme proche de l'homme. 2) A l'issue de la maturation méiotique, l'ovocyte reste bloqué en métaphase de méiose II en attendant la fécondation, alors que la mitose s'achève toujours. Ce blocage est dû à l'activité CSF et requiert la voie Mos/.../MAPK. J'ai montré que DOC1R, un nouveau substrat des MAPK, contrôle l'organisation des microtubules au cours de l'arrêt CSF. Ces résultats font évoluer la vision de l'arrêt CSF qui était considéré comme une voie linéaire aboutissant à la stabilisation du MPF. L'arrêt CSF est une voie non linéaire contrôlant aussi la morphologie de l'ovocyte.

Control of the meiosis I to meiosis II transition and role of DOC1R during CSF arrest of meiotic maturation in mouse

Meiotic maturation of vertebrate oocytes differs from mitosis on many aspects. I was interested in two characteristics. 1) In meiosis I, homologous chromosomes are segregated, in mitosis sister chromatids are separated. In mitosis, a checkpoint blocks the cell in metaphase via APC/C inhibition until all chromosomes are properly aligned on the spindle. In meiosis, contradictory results exist, depending on the species, about the requirement of such a checkpoint in meiosis I. I have shown that separase activity (an activity indirectly regulated by APC/C) is required for metaphase to anaphase transition in meiosis I, suggesting that such a checkpoint is required in the mouse, an organism close of human. 2) At the end of meiotic maturation, oocytes are blocked in metaphase of meiosis II waiting for fertilization, whereas mitosis always ends. This block is due to a CSF activity and requires the Mos/.../MAPK pathway. I have shown that DOC1R, a new MAPK substrate, controls microtubule organization during the CSF arrest. These results establish a new view of the CSF arrest which was considered as a linear pathway responsible for MPF stabilization. The CSF arrest is a non linear pathway which also controls oocyte morphology.