



**HAL**  
open science

# Caractérisation du rôle des protéines phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de la protéine kinase Greatwall lors de la sortie de mitose

Sheng Ma

► **To cite this version:**

Sheng Ma. Caractérisation du rôle des protéines phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de la protéine kinase Greatwall lors de la sortie de mitose. Biologie cellulaire. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT007 . tel-01315940

**HAL Id: tel-01315940**

**<https://theses.hal.science/tel-01315940>**

Submitted on 13 May 2016

**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

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par L'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2  
Et de l'unité de recherche UMR 5237  
Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire  
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire, Biochimie

Présentée par **Sheng MA**

Caractérisation du rôle des protéines phosphatases  
impliquées dans la déphosphorylation de la protéine kinase  
Greatwall lors de la sortie de mitose

Soutenue le 9 octobre 2015 devant le jury composé de

M. Olivier COUX, CRBM	Président
M. Jean-Pierre TASSAN, IGDR	Rapporteur
M. Lionel PINTARD, IJM	Rapporteur
Mme. Anne-Marie GENEVIÈRE, BIOM	Examineur
Mme. Anna CASTRO, CRBM	Directrice de thèse
M. Thierry LORCA, CRBM	Co-Directeur de thèse



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Spécialité :  
Biologie Cellulaire et Moléculaire, Biochimie

Ecole Doctorale :  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présenté par  
Sheng MA

Le 9 octobre 2015

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Sujet de thèse :

**Caractérisation du rôle des protéines phosphatases impliquées  
dans la déphosphorylation de la protéine kinase Greatwall lors  
de la sortie de mitose**

Devant le jury composé de :

Dr. Olivier COUX	Président
Dr. Jean-Pierre TASSAN	Rapporteur
Dr. Lionel PINTARD	Rapporteur
Dr. Anne-Marie GENEVIERE	Examineur
Dr. Anna CASTRO	Directeur de thèse
Dr. Thierry LORCA	Directeur de thèse

« Entre le ciel et la terre, il n'y a qu'une demeure, temporaire. »  
Bouddha, soutra.

## Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mes parents.  
Et je voudrais remercier mes deux Maîtres : Liwu et Yongchao.  
Merci à mon amour Dandan.  
Merci à Adrien et Déborah.

Je remercie chaleureusement le Dr. Olivier COUX d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux Drs. Jean-Pierre TASSAN et Lionel PINTARD pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail de thèse et au Dr. Anne-Marie GENEVIÈRE pour avoir accepté de l'examiner.

Je voudrais remercier vraiment très chaleureusement mon co-directeur de thèse, M. Thierry LORCA, un chercheur vraiment excellent ! Un très grand merci pour m'avoir accueilli dans ton équipe, m'avoir fait découvrir le monde « phosphatase », m'avoir soutenu sans faillir et surtout pour tout ce que tu as fait pour moi. Ton esprit de recherche, ta connaissance des projets, ton attitude pour le travail, ta tolérance pour mes bêtises et ton « à fond, à fond », tout cela demeurera en moi toute ma vie et me permettra d'avancer et de lutter dans les difficultés.

Je voudrais remercier mon co-directeur de thèse Mme. Anna CASTRO, un chercheur très brillant. Un grand merci Anna pour tes conseils et ta disponibilité, ainsi que pour ta stimulation. Ton expérience et ton efficacité aussi resteront en moi toute ma vie,

Merci Suzanne pour avoir partagé tes connaissances et pour tes conseils quotidiens. Tu as été toujours très patiente devant mes questions et toujours prête à m'aider.

Merci Sophie, tu as vraiment joué un rôle important à des moments-clés. J'ai beaucoup apprécié ton caractère, surtout ta franchise et la grande valeur des conseils que tu m'as donnés.

Merci Coco, les discussions avec toi sont toujours riches et intéressantes.

Merci Khaled pour ton soutien quotidien, merci Julie pour tes conseils, merci Perle pour tes informations, merci Lena pour ta vitalité et ta bonne humeur.

Je voudrais remercier M. Claude ALBAN : merci pour ton soutien pendant mon Master 2 et pendant ma thèse. J'ai appris tellement de choses de ta part.

Je voudrais te remercier Jacques PIETTE, pour ta compréhension, ton soutien, ta gentillesse et surtout pour ton aide.

Merci Claude DELSERT pour tes conseils pratiques et ton soutien.

Merci à toi aussi Gabriel pour ton appui et ton aide.

Merci Marion, François, Thom, Barbara, Damien P. et Ilaria, pour toutes vos bonnes idées et votre aide.

Merci Alicia et Jabran, pour votre gentillesse et ça fait plaisir de prendre des pauses avec vous.

Merci aux personnes du 2ème étage : votre sourire et votre bonjour m'ont fait passer des journées ensoleillées. Merci à Géraldine et à Monique : votre rôle administratif a été crucial pour que je puisse me consacrer à ma thèse tranquillement. Et merci à toutes les autres personnes de l'institut CRBM pour leur gentillesse.

Je voudrais également remercier Patrick M. et Alain : c'est grâce à vous que j'ai pu bien démarrer ma thèse.

Je voudrais encore vous remercier Danielle, Monique T., Sylvie et Gilbert, Fr. Emmanuel, OUYANG Xin, pour votre aide touchante quand je m'étais cassé le bras alors que je travaillais à ma thèse.

Merci à mes chers amis choristes Gilda, Yves, Jean-Marc, Christine, Gaël, Damien A. et vous tous les autres que je n'ai pas nommés : vous êtes vraiment super ! Et merci de m'avoir soutenu moralement pendant les moments où j'étais plus faible.

Merci aux amis de la Croix Rouge, je suis très content d'avoir fait équipe avec vous.

Merci à Rémi, mon professeur de français et surtout mon ami pour toujours. C'est aussi grâce à toi que je suis venu en France.

Merci à tous mes amis de Caen, Paris et Grenoble : quelle chance dans ma vie que de vous connaître !

Merci à Mei, Xia, Wei, Xiaopeng, Kai et à quelques-uns de mes élèves en Chine pour votre aide infinie, je sais que vous êtes toujours là.

Merci à ceux qui m'ont blessé, j'ai grandi et suis devenu plus fort et plus résistant grâce à vous.

J'ai beaucoup d'autres amis que je n'ai pas nommés et qui pourtant eux aussi m'ont beaucoup apporté ; qu'ils soient tous chaleureusement remerciés.

Encore une fois, merci à vous M. Thierry LORCA et Mme. Anna CASTRO pour tout ce que vous avez fait pour moi.

## Résumé

L'entrée des cellules en mitose nécessite l'activation coordonnée de différentes protéines kinases et phosphatases qui ensemble activent des voies de signalisation séquentielles permettant l'entrée, la progression et la sortie de la mitose. L'étape limitante de cet événement repose sur l'activation de la kinase mitotique Cdk1-cycline B. Le modèle unanimement accepté propose qu'en fin de phase G2, la déphosphorylation de la Thr14 et de la Tyr15 de Cdk1 par une fraction active de Cdc25 induit une activation initiale du complexe Cdk1-cycline B, qui à son tour active pleinement Cdc25 et inactive Myt1 et Wee1 par phosphorylation. Ces événements rapides induisent une activation maximale du complexe Cdk1-Cycline B permettant la phosphorylation de nombreux régulateurs mitotiques et une entrée irréversible en mitose. Ce mécanisme de régulation est communément appelé boucle d'amplification du MPF. Toutefois, ce modèle a récemment évolué grâce à de nouvelles données montrant qu'en plus du complexe Cdk1-Cycline B, la protéine kinase Greatwall est requise pour entrer en et maintenir la mitose. Le rôle principal de Greatwall réside dans l'inhibition de la phosphatase PP2AB55 qui déphosphoryle les substrats du complexe Cdk1-cycline B. Ce nouveau concept établit que l'entrée en mitose repose dorénavant sur l'activation conjointe de deux kinases, Cdk1-cycline B et Greatwall, la première permettant la phosphorylation massive des substrats mitotiques requise pour l'entrée en mitose, la deuxième inhibant la phosphatase PP2AB55 qui déphosphoryle ces mêmes substrats. Toutefois, le mécanisme par lequel Greatwall inhibe PP2AB55 requiert la phosphorylation des protéines Arpp19/Ensa qui une fois phosphorylées par Greatwall s'associent et inhibent PP2AB55. Afin de s'activer, Greatwall est tout d'abord phosphorylé par Cdk1-Cycline B sur sa T-loop en position T194. Il s'ensuit une auto-phosphorylation sur la S875 située en C terminal de la protéine. Ensemble ces deux sites sont nécessaires pour une pleine activité de la protéine kinase. Lors de la sortie de mitose, Greatwall se déphosphoryle et s'inactive permettant ainsi la réactivation de la phosphatase PP2AB55 et la déphosphorylation de l'ensemble des substrats mitotiques. L'objectif de mon travail de thèse s'est attaché à caractériser les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation et l'inactivation de la kinase Greatwall. Mes résultats montrent que les phosphatases PP2AB55 et PP1 sont impliquées dans ce mécanisme. La première cible la T194 alors que la deuxième est impliquée dans la déphosphorylation de la S875. En utilisant des extraits d'œufs de xénope, j'ai pu montrer que l'inhibition de l'une ou de l'autre des deux phosphatases empêche une sortie de méiose/mitose correcte. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces phosphatases régulent négativement l'activité de Greatwall en déphosphorylant les sites T194 et S875. Le modèle que nous proposons à la lumière de nos résultats, met en évidence que la diminution de l'activité de Cdk1-Cycline B par dégradation de la cycline B, permet l'activation de la phosphatase PP1 qui déphosphoryle la S875 de Greatwall. Ceci permet une diminution de l'activité kinase de Greatwall et une activation de PP2AB55. Cette dernière est ensuite capable de déphosphoryler la T194 de Greatwall et ensemble PP1 et PP2AB55 achèvent le processus de déphosphorylation conduisant à l'inactivation de Greatwall et à une sortie correcte de la division cellulaire.

## Table des matières

Chapitre 1 : Le cycle cellulaire .....	8
I. Les différentes phases du cycle cellulaire .....	9
A. L'interphase .....	10
B. La division cellulaire .....	10
II. Les acteurs de la progression cellulaire.....	13
A. Les complexes cyclines/Cdk.....	13
a. Synthèse des cyclines.....	14
b. Activation des cyclines/Cdk .....	16
c. Inactivation des cyclines/Cdk .....	16
B. Les points de contrôle du cycle cellulaire .....	18
Chapitre 2 : Entrée en mitose : activation du complexe cycline B/Cdk1 ou MPF .....	22
I. La découverte du MPF .....	23
II. Régulation de Cdk1 par phosphorylation/déphosphorylation.....	23
A. Wee1/Myt1.....	25
B. Cdc25 .....	27
a. Les isoformes de Cdc25 sont redondants durant le cycle cellulaire .....	27
b. Régulation de Cdc25C pendant la transition G2/M.....	28
C. Plk1 .....	29
D. Greatwall.....	31
E. PP2A.....	32
a. Structure de PP2A.....	32
b. Fonctions de PP2A au cours de la mitose.....	33
III. Régulation du MPF en fonction de sa localisation subcellulaire.....	33
Chapitre 3 : La protéine kinase Greatwall .....	35
I. Généralités sur les AGC kinases .....	36
A. Structure des AGC kinases .....	36
B. Fonctions des AGC kinases.....	37
II. La kinase Greatwall ou MASTL .....	39
A. Structure.....	39
B. Localisation subcellulaire.....	39
C. Fonctions de Greatwall.....	40
a. Entrée et progression de la mitose .....	40
b. Point de contrôle du dommage à l'ADN .....	42
c. Activation de la transcription .....	43
D. Greatwall et pathologies.....	43
Chapitre 4 : Les Protéines Phosphatases.....	45
I. Fcp1 .....	50
A. Généralités .....	50
B. Le rôle de Fcp1 in vivo .....	51
C. Fcp1, une phosphatase qui contrôle et déphosphoryle Ensa ? .....	51
II. Les protéines phosphatases de type 1.....	52
A. Généralités .....	52
B. La PP1 chez les mammifères .....	54
C. Les PP1 chez les autres organismes .....	59
a. La PP1 chez <i>S. pombe</i> .....	59
b. La PP1 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59

III. PP2A .....	61
A. Structure des protéines phosphatases de la famille PP2A.....	62
a. La sous-unité catalytique C.....	62
b. La sous-unité structurale PR62/A .....	64
c. Les sous-unités régulatrices B.....	65
B. Régulation de la PP2A .....	68
a. Par la composition propre de l'holoenzyme.....	68
b. Par des modifications post-traductionnelles .....	68
C. Rôle de la PP2A au cours du cycle cellulaire.....	70
a. Transition G1/S .....	70
b. Transition G2/M.....	71
IV. La calcineurine.....	72
A. Structure .....	72
B. Localisations et rôles de la calcineurine.....	72
C. Régulation de l'activation de la calcineurine .....	73
V. Les extraits d'ovocyte de xénope comme modèle d'étude .....	73
Résultats.....	76
Discussion.....	106
Références.....	111

## **Chapitre 1 : Le cycle cellulaire**

Tous les eucaryotes supérieurs sont constitués de nombreuses cellules qui se multiplient par division cellulaire. En 1665 Robert Hooke découvre dans du liège des cavités délimitées par des parois qu'il nommera cellules. C'est en 1839 que la théorie cellulaire voit le jour grâce au zoologiste Théodore Schwann qui découvre que les plantes et les animaux sont tous composés de cellules, il en conclut que la cellule est l'unité de base du règne végétal et du règne animal.

En 1859-Rudolf Virchow réfute la croyance selon laquelle les formes de vie peuvent apparaître spontanément en suggérant que toute cellule provient d'une cellule préexistante « omnis cellula e cellula ». Par la suite, Louis Pasteur terminera de convaincre la communauté scientifique que les cellules viennent de cellules. Le concept de « cycle cellulaire » découle des travaux de Alma Howard et Stephen Pelc (1953). En effet, en faisant croître des plantes en présence de l'isotope  $P^{32}$ , ils ont montré que l'isotope était incorporé dans l'ADN uniquement durant la phase de croissance cellulaire, et qu'il se passait un délai de douze heures avant la réabsorption de l'isotope dans le nouvel ADN synthétisé. En analysant la population hétérogène des cellules méristématiques des plantes, ils en déduisirent que la synthèse d'ADN durait environ six heures, et que les cellules entraient en division huit heures après la fin de la synthèse de l'ADN. Howard et Pelc furent les premiers à proposer la notion de « délai » dans le cycle cellulaire et proposèrent l'existence de quatre périodes : une période de division des cellules ou mitose ; une période de synthèse d'ADN, qu'ils nommèrent phase S, une phase pré-S appelée la phase G1, et une période pré-mitotique pour la phase G2. Le concept de cycle cellulaire est ainsi né et depuis fait l'objet de très nombreuses études. Les scientifiques ont ainsi développé de nombreux modèles d'études du cycle cellulaire tels que les levures, les embryons d'oursins, les ovocytes d'étoiles de mer et d'amphibiens ou les cellules de mammifères en culture. En effet, la conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a permis des études croisées, de même que la complémentarité des résultats a permis l'établissement d'un modèle général de contrôle du cycle cellulaire.

## **I. Les différentes phases du cycle cellulaire**

Lorsqu'elle n'est pas en phase de croissance et de division, la cellule est dite en quiescence ou en phase G0. Celle-ci entrera dans le cycle cellulaire sous l'effet de signaux mitogènes, ce qui permettra d'obtenir à partir d'une cellule mère, deux cellules filles contenant le même

patrimoine génétique. Un cycle cellulaire comporte deux grandes parties : l'interphase et la division cellulaire (ou phase mitotique) (Figure 1).

### **A. L'interphase**

L'interphase est une période de croissance cellulaire. Elle comprend trois phases :

La phase G1 (G pour « gap » ou intervalle) est la plus longue du cycle cellulaire. C'est une phase de croissance qui prépare la cellule à la phase S. La transition G1/S est contrôlée à différents niveaux, entre autres aux niveaux de l'intégrité de l'ADN, de la présence de facteurs de croissance et de l'adhérence cellulaire. C'est seulement pendant la phase G1 que la cellule peut se diriger vers la phase G0, phase durant laquelle elle peut rester un certain temps avant de reprendre le cycle cellulaire ou se différencier.

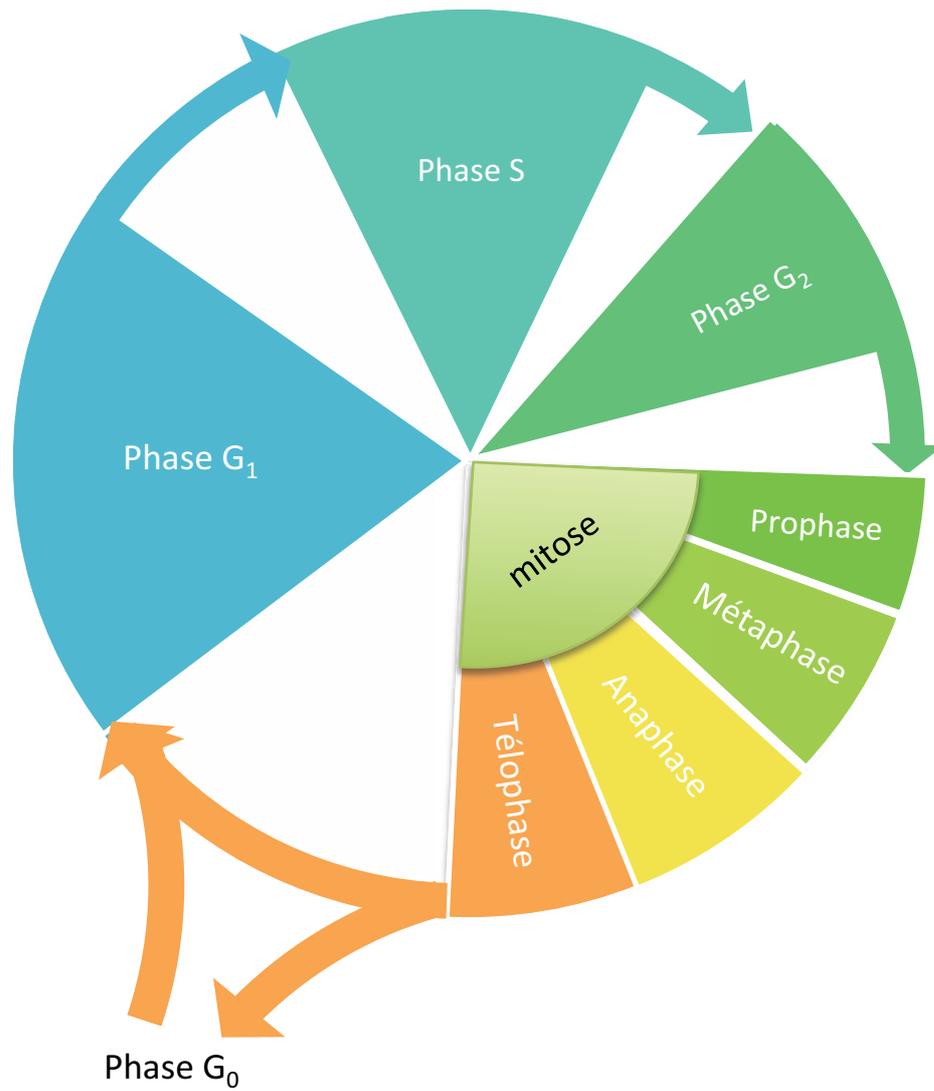
La phase S est la phase de synthèse d'ADN qui se déroule selon un mécanisme de réplication semi-conservatif, permettant la duplication de la totalité de l'information génétique. La cellule commence également la duplication de son centrosome au cours de cette phase. Le centrosome est une structure cytoplasmique constituée d'une paire de centrioles entourée d'une masse dense appelé matériel péricentriolaire.

La phase G2 prépare la cellule à entrer en division cellulaire. La réplication de l'ADN et la duplication des centrosomes sont vérifiées, et la plupart des protéines nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire sont synthétisées pour effectuer la transition G2/M.

### **B. La division cellulaire**

La division cellulaire comprend la mitose et la cytodierèse. La mitose est marquée par le cycle de condensation-séparation-décondensation des chromosomes. Elle est composée de cinq étapes de la prophase à la télophase. En parallèle de cette division chromosomique se fait la division cytoplasmique et centrosomique. La cytodierèse est, quant à elle, l'étape finale de la division cellulaire. Elle conduit à l'individualisation des deux cellules filles.

La mitose peut être décrite de manière morphologique en six étapes différentes :



**Figure 1 : Cycle cellulaire** : L'interphase: la phase G<sub>1</sub> (bleu), la phase S (turquoise), la phase G<sub>2</sub> (vert). La mitose (vert pâle) et les étapes de la mitose.

1 - Prophase : Durant la prophase les chromosomes commencent à se condenser, les deux centrosomes qui se sont dupliqués durant l'interphase forment avec les microtubules des asters qui migrent aux pôles de la cellule. Les asters vont définir les deux pôles de la cellule diamétralement opposés. Le fuseau mitotique commence à se former et l'enveloppe nucléaire à se désagréger.

2 - Prométaphase : A ce stade il n'y a plus de trafic nucléoplasmique étant donné la disparition du compartiment nucléaire (à l'exception de certains protistes qui réalisent des mitoses dites fermées, gardant cette structure intacte). L'enveloppe nucléaire se désagrège complètement sous formes de petites vésicules membranaires. Les chromosomes continuent de se condenser et le fuseau mitotique de s'organiser. Les microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique en formation commencent à fixer aléatoirement des chromosomes au niveau de leurs centromères par l'intermédiaire d'une structure protéique appelée le kinétochore. Cette étape nécessite la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules qui balayent la cellule de manière à capturer les kinétochores. Lorsque les deux kinétochores sont attachés à chacun des centrosomes, les forces de tensions tubulaires de part et d'autre du chromosome provoquent la migration (mouvement dit « de congression ») de tous les chromosomes à mi-distance des pôles pour former la plaque métaphasique.

3 - Métaphase : Les chromosomes sont sous tension maximale, chaque paire de chromatides sœurs est reliée à un pôle opposé du fuseau mitotique par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens. Chaque chromatide sœur est reliée par des complexes de cohésines présents sur les kinétochores. Les chromosomes ainsi configurés forment la plaque métaphasique. Cette étape est très brève.

4 - Anaphase : Les deux chromatides sœurs se séparent rapidement. Les microtubules kinétochoriens se dépolymérisent entraînant les chromatides vers un pôle (anaphase A). Les microtubules polaires se polymérisent augmentant la distance entre les deux pôles des deux futures cellules filles (Anaphase B). Entre les lots de chromosomes, de nouveaux microtubules interzonaux (ou fuseau central) se polymérisent *de novo* et/ou se forment à partir des microtubules polaires. Ils seront présents jusqu'à la cytotélorèse. Ce réseau de microtubules est très stable. Le sillon de division commence à se mettre en place sous la membrane plasmique à mi-distance entre les deux pôles.

5 - **Télophase** : Les chromosomes se décondensent, le noyau de chaque future cellule fille débute sa formation et les microtubules du fuseau central continuent de se polymériser. La distance entre les deux pôles continue d'augmenter et le sillon de division se contracte. La division du cytoplasme commence avec la contraction de l'anneau contractile composé principalement d'actine et de myosine.

6 - **La cytodiérèse** : Elle permet la séparation physique des deux futures cellules filles par un processus dynamique. Elle doit donc être strictement coordonnée avec la division cellulaire et régulée dans le temps et l'espace pour que chaque cellule fille hérite de sa population chromosomique intacte. La cytodiérèse peut être divisée en quatre phases en fonction de l'état du cytosquelette (réseau de microtubules et microfilaments d'actine) :

6.1. La détermination du plan de division reposant sur le positionnement du fuseau bipolaire de microtubules et sur l'organisation du cytosquelette d'actine.

6.2. La formation de l'anneau de contraction d'actomyosine.

6.3. La contraction de l'anneau d'actomyosine conduisant à l'élongation du sillon de division pour former un pont intercellulaire. Ce pont cytoplasmique est formé de microtubules antiparallèles et de protéines indispensables à la division cellulaire pour former le midbody.

6.4. L'abscission ou complétion aboutissant à la séparation physique des deux cellules filles (Eggert et al, 2006).

## **II. Les acteurs de la progression cellulaire**

La progression du cycle cellulaire est contrôlée de différentes manières. Tout d'abord par l'activation séquentielle des complexes cycline/ Cdk qui est réalisée par la synthèse des cyclines puis leur dégradation par la voie du protéasome. La progression du cycle cellulaire est également régulée par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation. Enfin, des mécanismes de surveillance appelés « points de contrôles » permettent d'interrompre la progression du cycle cellulaire lorsque des anomalies sont détectées.

### **A. Les complexes cyclines/Cdk**

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire se fait grâce à l'activation et l'inactivation successives de protéines appartenant à la famille des Sérine/Thréonine kinases,

très conservées au cours de l'évolution, les Cdk (Cyclin Dependent Kinases) (Morgan, 1995). Ces kinases sont régulées par leur association avec les cyclines qui s'expriment séquentiellement durant le cycle cellulaire (Figure 2). On peut distinguer deux types de cyclines : les cyclines mitotiques qui s'associent au Cdk pendant la phase G2 et sont nécessaires à l'entrée en phase M et les cyclines G1/S qui s'associent durant la phase G1 et qui sont nécessaires pour entrer et poursuivre la phase S.

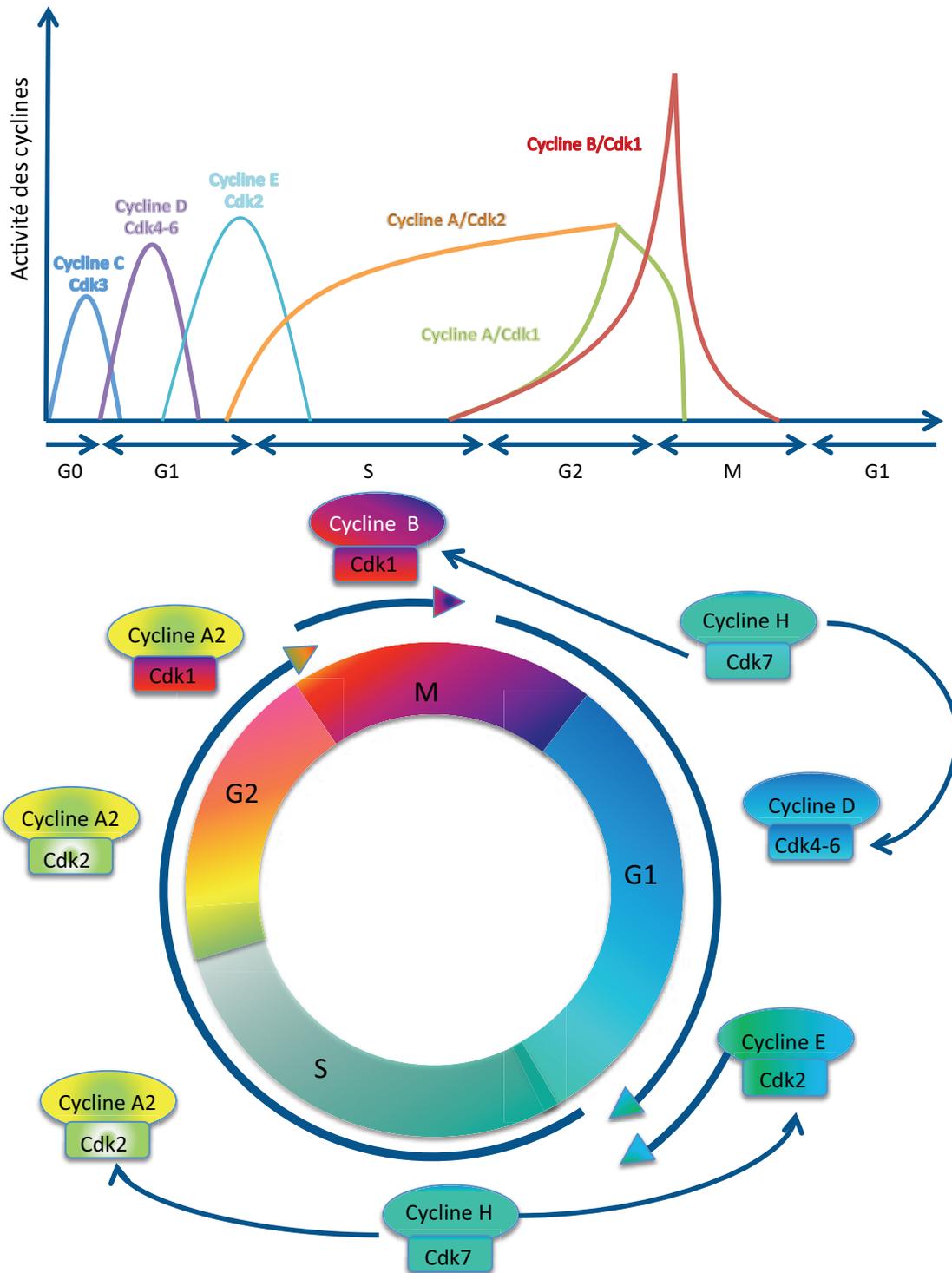
### **a. Synthèse des cyclines**

Lorsque les cellules quiescentes sont stimulées par des facteurs de croissance, les premières cyclines transcrites sont la cycline C associé à Cdk3 et la cycline D associée à Cdk4 ou Cdk6 en phase G1. Il existe plusieurs isoformes de la cycline D (D1, D2, D3) présentes à un taux d'expression relativement constant à travers les différentes phases du cycle cellulaire, excepté en phase G0 où elles sont absentes. Les complexes cycline D / Cdk4-6 sont localisés dans le noyau en phase G1 puis sont exportés dans le cytoplasme lors de l'entrée en phase S (Baldin et al, 1993). La cycline D permet l'activation de la transcription des protéines nécessaire à la division.

Les deux sous-types de cycline E (E1 et E2) sont exprimés juste après les cyclines D et ne s'associent qu'à une seule Cdk : Cdk2. Le complexe cycline E / Cdk2 est nécessaire à la transition G1/S, permettant d'initier l'entrée en phases S et la réplication de l'ADN (Dulic et al, 1992 ; Koff et al, 1992).

La cycline A est traduite peu après la cycline E et elle participe à l'entrée en phase S et à la transition G2/M. En effet, la micro-injection d'anticorps neutralisant la cycline A empêche le franchissement de ces deux transitions dans des cellules Hela (Pagano et al, 1992). La cycline A peut s'associer à Cdk1 et Cdk2 pour les activer de la transition G1/S à la prométaphase.

Enfin les cyclines B1 et B2 sont exprimées en phases S. Elles activent Cdk1 durant la mitose et sont dégradées en sortie de mitose, après la cycline A. Associée à Cdk1, la cycline B/Cdk1 constitue le complexe majoritaire de la mitose, il est aussi appelé MPF (M phase Promoting Factor).



**Figure 2: Les complexes cyclines/cdk au cours du cycle cellulaire :**

(A) Le déroulement du cycle cellulaire est assuré par l'activation séquentielle de complexes à activité sérine/thréonine : les cyclines/cdk. (B) Les cyclines peuvent s'associer à plusieurs Cdk et une Cdk peut fixer plusieurs cyclines. Le complexe cyclineH/cdk7 ou CAK participe à l'activation des Cdk

De plus, il existe une cycline dont le rôle principal est d'activer les autres complexes cycline/Cdk, il s'agit de la cycline H associée à Cdk7 que l'on nomme aussi CAK (Cdk Activating Kinase). Ce complexe associé à MAT1 (ménage à trois) est capable d'activer Cdk1, Cdk2, Cdk4 et Cdk6 (Fesquet et al, 1993 ; Devault et al, 1995).

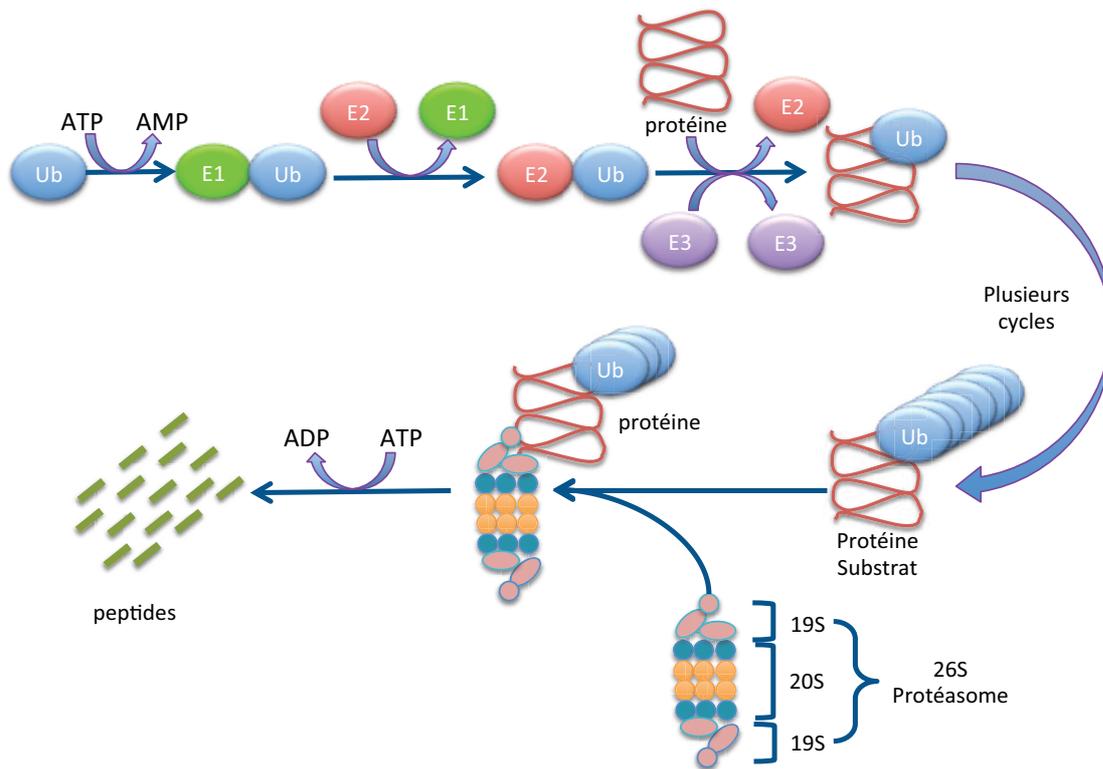
### **b. Activation des cyclines/Cdk**

L'accumulation, la stabilisation et l'association des cyclines avec les Cdk sont des étapes déterminantes de la régulation temporelle des Cdk. Néanmoins, la régulation des complexes cyclines/Cdk par phosphorylation/déphosphorylation par les kinases CAK, Wee1 et Myt1 et la phosphatase Cdc25, est également importante. La CAK phosphoryle les complexes cyclines/Cdk sur un résidu activateur de Cdk, alors que Wee1 et Myt1 phosphorylent les complexes sur deux résidus inhibiteurs Cdk. Les phosphorylations de Wee1 et Myt1 confèrent aux complexes cyclines/Cdk leur inactivité. C'est la déphosphorylation des résidus inhibiteurs de Cdk par la phosphatase Cdc25 qui permet l'activation des complexes cyclines / Cdk.

En plus de cette régulation par phosphorylation/déphosphorylation des petites molécules inhibitrices permettent d'inhiber les Cdk, ce sont les CKI (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor). Les CKI participent à la régulation de l'activité des complexes cycline/Cdk aux transitions G1/S et G2/M, en inhibant ces complexes jusqu'au moment de leur activation. Les CKI sont divisés en deux familles : la famille des INK4 (inhibiteurs de Cdk4 : p15<sup>ink4b</sup>, p16<sup>ink4a</sup>, p18<sup>ink4c</sup> et p19<sup>ink4d</sup>) et les CIP/KIP (protéines inhibitrices des Cdk4/Cdk6 : p21<sup>cip1</sup>, p21<sup>kip1</sup> et p57<sup>kip2</sup>). Les membres de la famille d'INK4 inactivent les Cdk4 et Cdk6, soit en se liant aux Cdk libres ce qui conduit à un changement de conformation et empêche la liaison aux cyclines, soit en se liant au complexe cycline/Cdk ce qui induit la déformation du site de liaison à l'ATP. Les CIP/KIP inhibent les Cdk en se liant au dimère de cycline/ Cdk et en bloquant la poche de liaison à l'ATP (pour revue, Vidal and Koff, 2000).

### **c. Inactivation des cyclines/Cdk**

L'inactivation finale des complexes cyclines/Cdk se produit grâce à la dégradation ubiquitine dépendante des sous-unités régulatrices, les cyclines.



**Figure 3: Voie ubiquitine-protéasome :**

L'ubiquitinylation nécessite trois étapes. Une première enzyme E1, active l'ubiquitine (Ub) en se liant de manière covalente. Puis, l'ubiquitine est transférée sur le site actif de l'enzyme E2 qui pourra alors la transférer sur une ou plusieurs lysines de la protéines cibles. Ce transfert nécessite la liaison de l'enzyme E3, qui agit comme une protéine adaptatrice en déterminant la spécificité des substrats. Plusieurs cycles de conjugaison aboutissent à la formation de chaînes poly-ubiquitine qui seront alors reconnues par le protéasome.

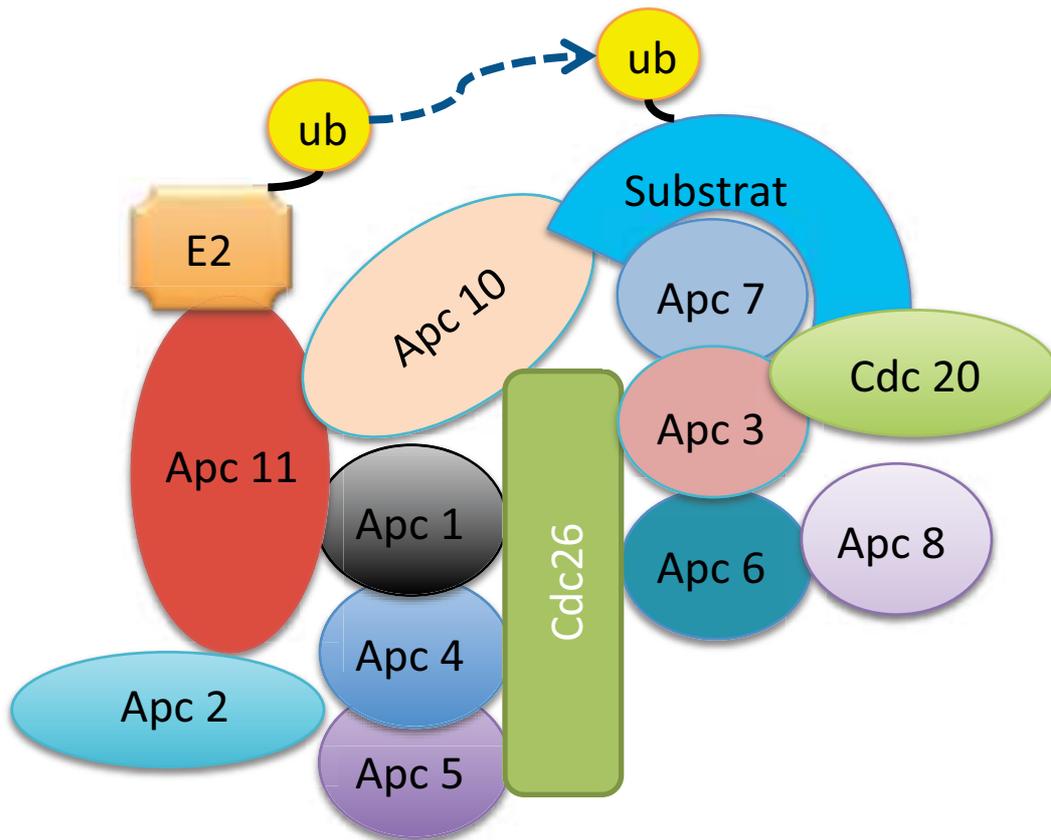
La réaction d'ubiquitylation fait intervenir trois types d'enzymes : une enzyme activatrice (E1) qui transfère le résidu ubiquitine à une enzyme de conjugaison (E2) qui catalyse, avec une ubiquitine ligase (E3), la formation de chaînes d'ubiquitine sur les résidus lysine des substrats. Une fois ubiquitinylées, les protéines sont reconnues et dégradées par le protéasome 26S (Figure 3).

Deux complexes à activité ubiquitine ligase participent au contrôle du cycle cellulaire : l'APC/C (Anaphase Promoting Complexe ou Cyclosome) et le SCF (Skp1/Cullin/F-box protein), mais seulement l'APC/C est nécessaire à la dégradation des cyclines (Peters, 1998).

L'APC/C a été découvert grâce à des études génétiques chez la levure (Irniger et al, 1995) et biochimiques chez le xénope et la palourde (King et al, 1995 ; Sudakin et al, 1995). L'APC/C est un complexe composé d'une douzaine de sous-unités chez les vertébrés et treize sous-unités chez la levure. Toutes ces sous-unités sont associées au cours du cycle cellulaire, suggérant que la régulation du complexe ne dépend pas de l'association/dissociation des sous-unités de l'APC/C. La reconnaissance spécifique des substrats à des moments-clés du cycle cellulaire nécessite l'interaction de l'APC/C avec les adaptateurs Cdc20 (Figure 4) ou Cdh1 (pour revue, Peters, 2002). L'APC/C s'associe à Cdc20 durant la mitose et à Cdh1 en fin de mitose et pendant la phase G1. L'activation de l'APC/C dépend de la phosphorylation de certaines de ses sous-unités ou de ses adaptateurs qui font principalement intervenir les Cdk (pour revue, Peters, 2002).

### ***B. Les points de contrôle du cycle cellulaire***

La cellule dispose de différents mécanismes de contrôle permettant de vérifier le bon déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire. Ces mécanismes contrôlant l'intégrité du cycle cellulaire sont appelés mécanismes de surveillance, points de contrôles ou « checkpoint » (pour revue, Hartwell and Weinert, 1989) (Figure 5). Il existe différents points de contrôle au cours du cycle cellulaire faisant intervenir des protéines qui détectent certains critères comme les cassures double-brin de l'ADN ou encore l'attachement bipolaire des chromatides sœurs aux microtubules du fuseau mitotique. Si un défaut est détecté, les voies de signalisation s'activent et aboutissent à l'activation de plusieurs protéines effectrices qui ciblent les complexes cyclines/Cdk et permettent ainsi d'arrêter la progression du cycle



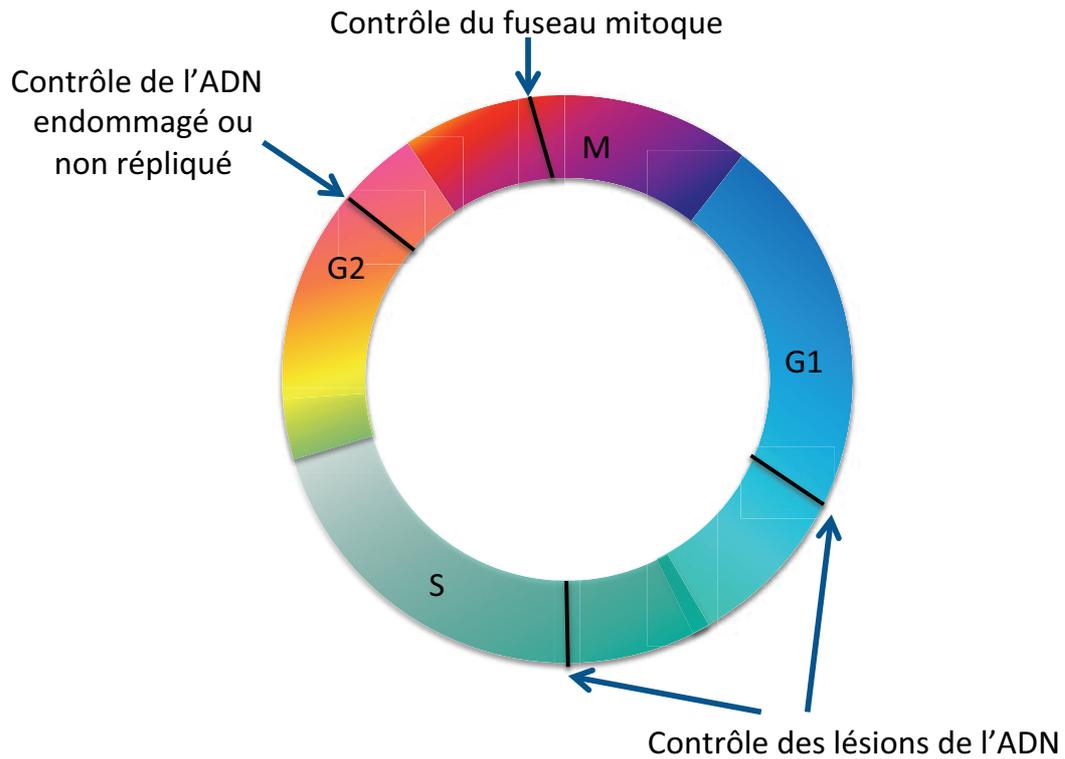
**Figure 4: Composants de l'APC/C<sup>Cdc20</sup>.**

Le complexe APC est composé de 12 sous-unité. Une des effecteurs de l'APC est la protéine Cdc20 qui est recrutée et permet la spécificité des substrats.

cellulaire afin de réparer les erreurs détectées. Dans le cas où les erreurs ne sont pas réparables la cellule s'engagera dans la voie de l'apoptose.

Le point de restriction en phase G1/S permet de vérifier les critères de taille de la cellule, la présence de facteurs nutritifs ou environnementaux et la qualité de l'ADN. Une fois le point de restriction G1/S passé, la cellule s'engage dans le cycle cellulaire sans retour en arrière possible. Les points de contrôle des phases G1, S et G2 s'assurent de la réplication correcte et totale de l'ADN ainsi que de l'absence de lésions de celui-ci. Si ces critères sont vérifiés, la cellule entrera en division cellulaire. Ces points de contrôle font intervenir une cascade de signalisations composée de senseurs, de transducteurs et d'effecteurs du signal. Les senseurs et transducteurs clés de ces points de contrôle sont les kinases de la famille des phosphoinositide-3-kinase related kinase (PIKK) : ATM (Ataxi-Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM related Kinase). Ces PIKK phosphorylent les protéines kinases Chk1 and Chk2 permettant d'amplifier et de diversifier le signal. Bien qu'ATM et ATR semblent avoir de nombreux substrats en commun, elles répondent généralement à des signaux de stress différents. Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire par la voie ATM/ATR diffèrent selon la phase du cycle cellulaire. Selon le stress et selon le point de contrôle ils activent différents effecteurs qui sont les phosphatases cdc25 et le suppresseur de tumeurs p53. Par exemple durant l'arrêt en phase S les kinases ATM et ATR déclenchent les différentes voies de signalisation qui vont aboutir à la dégradation de la phosphatase Cdc25A qui ne pourra plus activer le complexe cycline E-A/Cdk2, et permet l'accumulation de p53 qui induit l'expression de p21, inhibiteur du complexe cycline E/Cdk2. De la même manière, à la transition G2/M, ATM et ATR vont inhiber Cdc25C qui ne pourra plus activer les complexes cycline/Cdk et vont également stabiliser p53 permettant l'expression de p21 qui est capable d'inhiber le complexe cycline B/Cdk1 (pour revue Niida and Nakanishi, 2006).

Enfin, il existe un dernier point de contrôle au cours de la mitose au niveau de la transition métaphase-anaphase. Ce point de contrôle s'assure que tous les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique, que les kinétochores des chromatides sœurs sont tous attachés aux fibres du fuseau et sous tension avant d'entrer en anaphase.



**Figure 5: Points de contrôle du cycle cellulaire.**

Les points de contrôle du cycle cellulaire permettent de vérifier le bon déroulement de chaque phase du cycle cellulaire. Ces mécanismes contrôlent l'intégrité de l'ADN et la mise en place du fuseau mitotique.

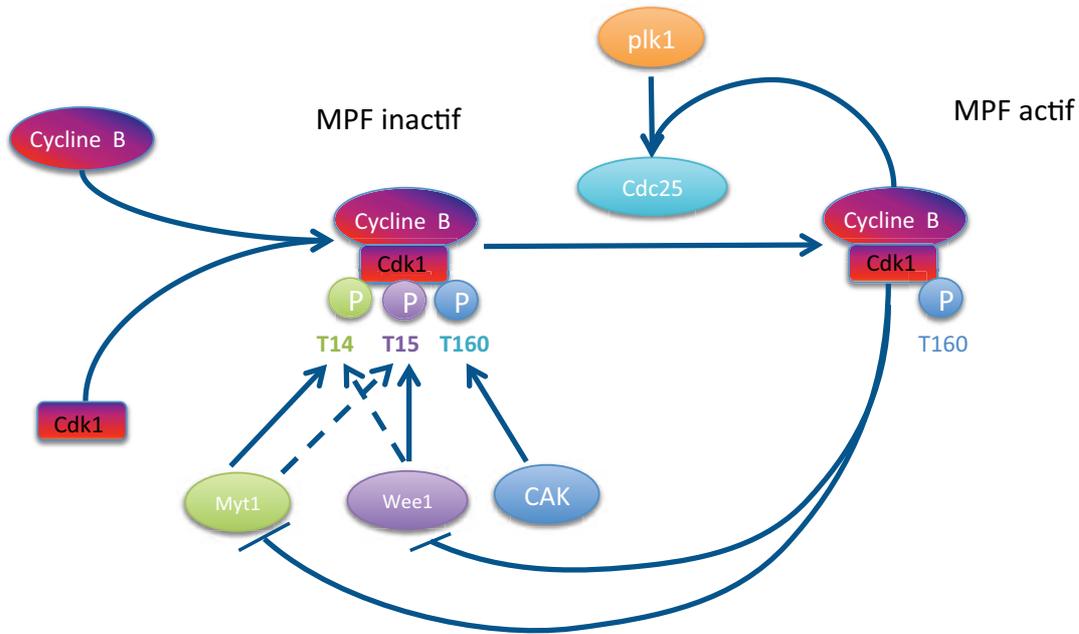
**Chapitre 2 : Entrée en mitose : activation du complexe cycline  
B/Cdk1 ou MPF**

## I. La découverte du MPF

La découverte d'un facteur permettant l'entrée en phase M date des années 1960-1970 : il s'agit du MPF (originellement pour Maturing Promoting Factor et maintenant pour M-Phase Promoting Factor, Masui, 2001). Les travaux de Y.Masui et de ses collaborateurs sur le MPF réalisés à partir d'ovocytes d'amphibiens furent les plus marquants (Masui et al, 1972 ; Masui et al 2001 ; Masui et Market, 1971). En effet, ces auteurs ont montré que l'injection de cytoplasme d'un ovocyte de *Rana pipiens* bloqué en métaphase de deuxième méiose dans un autre ovocyte d'amphibien arrêté en prophase de première méiose (assimilé à la phase G2) induisait la reprise de méiose, la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'émission du premier globule polaire (maturation méiotique). Ils nommèrent ce facteur cytoplasmique responsable de ce phénomène le Maturing Promoting Factor. Un peu plus tard, des expériences montrèrent qu'il s'agissait d'un facteur universel présent dans toutes les cellules capables de se diviser (Sunkara et al, 1979 ; Kishimoto et al, 1982 ; Wasserman and Smith, 1978). Enfin, il fut montré à la fin des années 80/début des années 90 que le MPF était un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique : la kinase Cdk1 (aussi appelée Cdc2) et d'une sous-unité régulatrice : la cycline B (Gauthier et al, 1988 ; Labbé et al, 1989 ; Nurse, 1990). Par la suite un grand nombre de travaux ont montré que le complexe cycline B/Cdk1, comme les autres complexes cyclines/Cdk sont régulés à deux niveaux moléculaires : par des phosphorylations/déphosphorylations de Cdk1 et par des variations de concentrations et localisations de la cycline B au cours du cycle cellulaire.

## II. Régulation de Cdk1 par phosphorylation/déphosphorylation

La concentration de Cdk1 est stable tout au long du cycle cellulaire. L'association en G2 de Cdk1 à la cycline B entraîne le changement de conformation du domaine VIII de Cdk1 qui contient la « T-loop » permettant la phosphorylation d'un résidu activateur, la Thréonine160 par la CAK présente dans cette T-loop (Solomon et al, 1992 ; Solomon et al, 1993). La phosphorylation du résidu Thr160 de Cdk1 se produit en phase G2 et persiste jusqu'à sa déphosphorylation par la phosphatase KAP (Cdk Associated Phosphate) lorsque la cycline se



### Figure 6: Activation du complexe cycline B/Cdk1.

En phase G2, la cycline B et Cdk1 s'associent, le complexe est phosphorylé par la CAK sur le résidu T160. Cette phosphorylation activatrice ne suffit pas à activer le complexe. Puisque parallèlement, le MPF est inactivé par les phosphorylation inhibitrices de Wee1 et Myt1 sur les résidus T14 et Y15 de Cdk. A la transition G2/M, un pool de Cdc25 est activé par Plk. Ce pool de Cdc25, active un petit pool de MPF par déphosphorylation des résidus inhibiteurs de Cdk1. A son tour le MPF va phosphoryler Wee1, Myt1 et Cdc25. Wee1 et Myt1 sont inactivées alors que Cdc25 est activée, c'est la boucle d'auto-amplification du MPF.

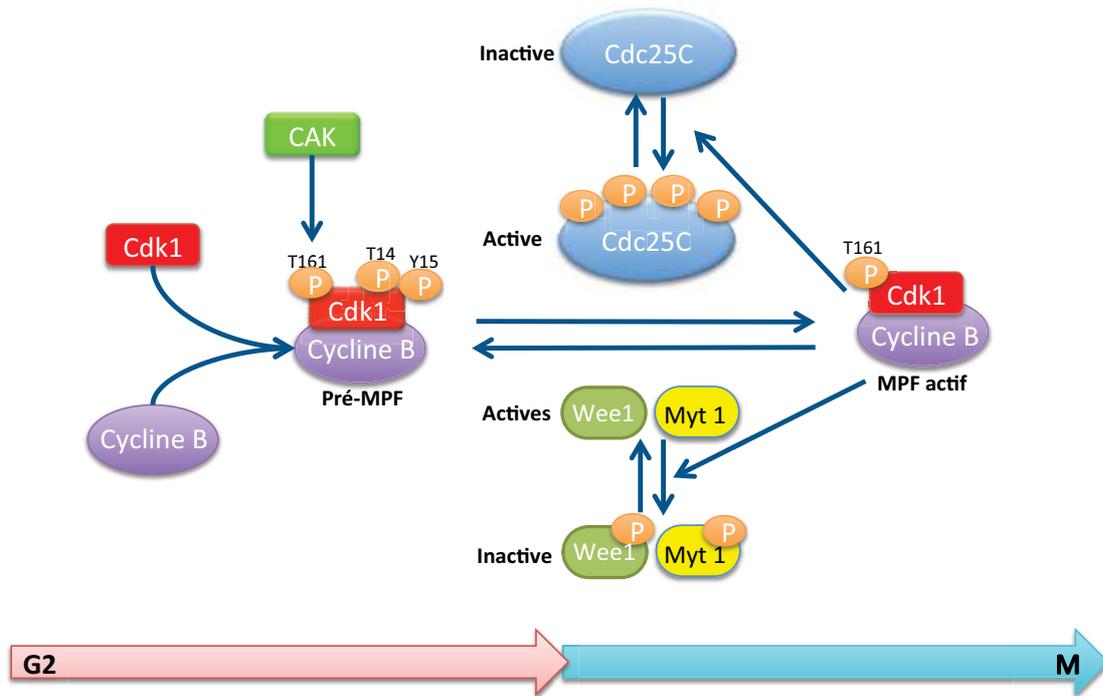
dégrade (Poon and Hunter, 1995). Cependant en G2, en plus de la phosphorylation du résidu Thr160, le complexe cycline B/Cdk1 présente deux phosphorylations sur les résidus Thréonine14 et Tyrosine15 de Cdk1 qui maintiennent le complexe inactif. La phosphorylation de ces résidus est catalysée par les kinases Wee1 et Myt1 (Pines and Hunter, 1991 ; Parker and Piwnica-Worms, 1992 ; Mueller et al, 1995a, Mueller et al, 1995b). En fin de phase G2, la phosphatase Cdc25 est responsable de la déphosphorylation des résidus inhibiteurs provoquant la déphosphorylation et l'activation d'un pool de cycline B/Cdk1. Ce pool de cycline B/Cdk1 induit à la fois la phosphorylation de Myt1, Wee1 et Cdc25 ayant pour conséquence l'inactivation des kinases inhibitrices Myt1 et Wee1 et l'activation complète de la phosphatase Cdc25 (Dunphy and kumagai, 1991 ; Gautier et al, 1991 ; Kumagai and Dunphy, 1991). Ceci se traduit par l'activation complète du complexe cycline B/Cdk1 et l'entrée en mitose. Cette boucle d'activation est nommée boucle d'auto-amplification du MPF (Figure 6).

Mis à part le MPF, les kinases Wee1 et Myt1 et la phosphatase Cdc25 sont régulées par phosphorylation/déphosphorylation par d'autres kinases et phosphatases tels que Plk1 (Polo Like Kinase 1) et la phosphatase PP2A. La région N-terminale de ces protéines contient un domaine régulateur riche en motif Ser/Thr-Pro qui peut être phosphorylé à divers moments du cycle cellulaire. Ces protéines sont hypophosphorylées en interphase, ce qui correspond à une forte activité de Wee1/Myt1 et une faible activité de Cdc25 et elles sont hyperphosphorylées lors de l'entrée en mitose (Figure 7).

### **A. *Wee1/Myt1***

Les kinases de la famille Wee ont d'abord été mises en évidence chez la levure *S. pombe* par des approches génétiques visant à comprendre le contrôle exercé sur la taille de la cellule durant la progression cellulaire. Ils montrèrent que deux protéines kinases codant les gènes *wee1* et *myt1* régulaient de manière négative le complexe cycline B/Cdk1 (Cib2/cdc28 pour la levure) (Russel and Nurse, 1987 ; Lundgren et al, 1991).

Ces deux kinases peuvent indifféremment phosphoryler les résidus Thr14 et Tyr15 de Cdk1, mais Myt1 a une préférence pour la Thr14 (Liu et al, 1997) et Wee1 pour la Tyr15 (McGowan and Russel, 1993).



### Figure 7: La boucle d'auto-amplification du MPF.

Le schéma classique assume que l'entrée en mitose repose sur l'activation de la kinase mitotique Cdk1/cycline B aussi appelée MPF pour M-Phase Promoting Factor. Pendant la phase G2, Cdk1 s'associe à la cycline B et le complexe peut alors être phosphorylé par la CAK sur le résidu T161. Il s'agit d'une phosphorylation activatrice. Parallèlement à cela, l'activité du complexe Cdk1/cycline B est régulée négativement par les kinases Wee1 et Myt1 par phosphorylations sur les résidus Thr14 et Tyr15 de Cdk1. En fin de G2, le complexe Cdk1/cycline B est alors régulé positivement par la phosphatase Cdc25C qui va déphosphoryler ces deux phosphorylations inhibitrices. Après avoir subit cette activation initiale, le complexe Cdk1/cycline B active en retour Cdc25C et inactive Wee1 et Myt1 ce qui donne lieu à une activation totale du MPF. Ce mécanisme d'auto-régulation positive est appelé la boucle d'auto-amplification du MPF. Une fois activé, le MPF phosphoryle de multiples cibles qui permettent alors l'entrée en mitose.

Mise à part la spécificité de Myt1 et Wee1 pour les résidus 14 et 15, la localisation subcellulaire de ces deux kinases joue un rôle important dans la régulation de Cdk1 : Myt1 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Mueller et al, 1995b ; Kornbluth et al, 1994 ; Liu et al, 1997 ; Fattaey and boohar, 1997), alors que Wee1 est essentiellement nucléaire durant l'interphase et est cytoplasmique en mitose (Heald et al, 1993 ; Baldin and Ducommun, 1995). Ainsi, chacune de ces kinases régule une sous-population de Cdk1 définie.

Comme décrit précédemment, Wee1 est régulée en partie par Cdk1. En effet, *in vitro*, il a été montré que Cdk1 pouvait lier et phosphoryler Wee1 et que Wee1 isolée à partir d'extraits mitotiques de Xénope présente une faible activité (Tang et al, 1993 ; Mueller et al, 1995a ; Mueller et al, 1995b). Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle il existerait une boucle d'activation où Cdk1 phosphoryle et inactive directement Wee1, ce processus augmente ainsi rapidement l'activité de Cdk1 pour l'entrée en mitose. Cependant, dans des extraits d'œufs de Xénope déplétés de Cdk1, Wee1 est phosphorylée ce qui suggère qu'au moins une autre kinase est capable de phosphoryler Wee1 (Mueller et al, 1995a). Myt1 est également phosphorylée en C-terminale par Cdk1 (Wells et al, 1999).

## **B. Cdc25**

La phosphatase Cdc25 fut identifiée par approche génétique chez la levure *S. pombe*, comme inducteur de la mitose, dont l'activité s'opposait à celle de Wee1 et Myt1 (Russel and nurse, 1986). L'activité de Cdc25 est régulée par sa localisation subcellulaire, ses phosphorylations et sa dégradation. Il existe trois isoformes de Cdc25 chez les mammifères codées par des gènes distincts : Cdc25A, B et C (pour revue, Boutros et al, 2006).

### **a. Les isoformes de Cdc25 sont redondants durant le cycle cellulaire**

Les premiers travaux réalisés sur ces protéines suggéraient que Cdc25A intervenait durant la transition G1/S en régulant Cdk2 (Hoffman et al, 1994 ; Jinno et al, 1994) tandis que Cdc25B et Cdc25C seraient impliquées dans l'activation de Cdk1 au cours de la transition G2/M (Karlsson et al, 1999). En effet, Cdc25B active le complexe cycline B/Cdk1 aux centrosomes lors de la transition G2/M. Ce qui constituerait un premier niveau d'action sur le MPF (De

Souza et al, 2000 ; Jackman et al, 2003). Cdc25C participerait à l'entrée en mitose en activant le complexe cycline B/Cdk1 préférentiellement dans le noyau (Boutros et al, 2006 ; Perdiguero and Nebrada, 2004).

Cependant, des travaux plus récents ont remis en cause ce modèle et suggèrent que les différentes isoformes de Cdc25 peuvent agir à divers moments du cycle cellulaire et compenser les défauts d'une ou plusieurs autres isoformes. En effet l'inhibition de l'expression de Cdc25A et Cdc25B par siRNA montre un arrêt en début de mitose des cellules humaines suggérant que Cdc25A et Cdc25B sont nécessaires à la transition G2/M et que Cdc25C seule n'est pas suffisante pour induire l'entrée en mitose (Lindqvist et al, 2005). D'autre part, les délétions simultanées de Cdc25B et Cdc25C sont viables chez la souris montrant que Cdc25A est suffisante pour permettre la progression du cycle cellulaire (Ferguson et al, 2005).

## **b. Régulation de Cdc25C pendant la transition G2/M**

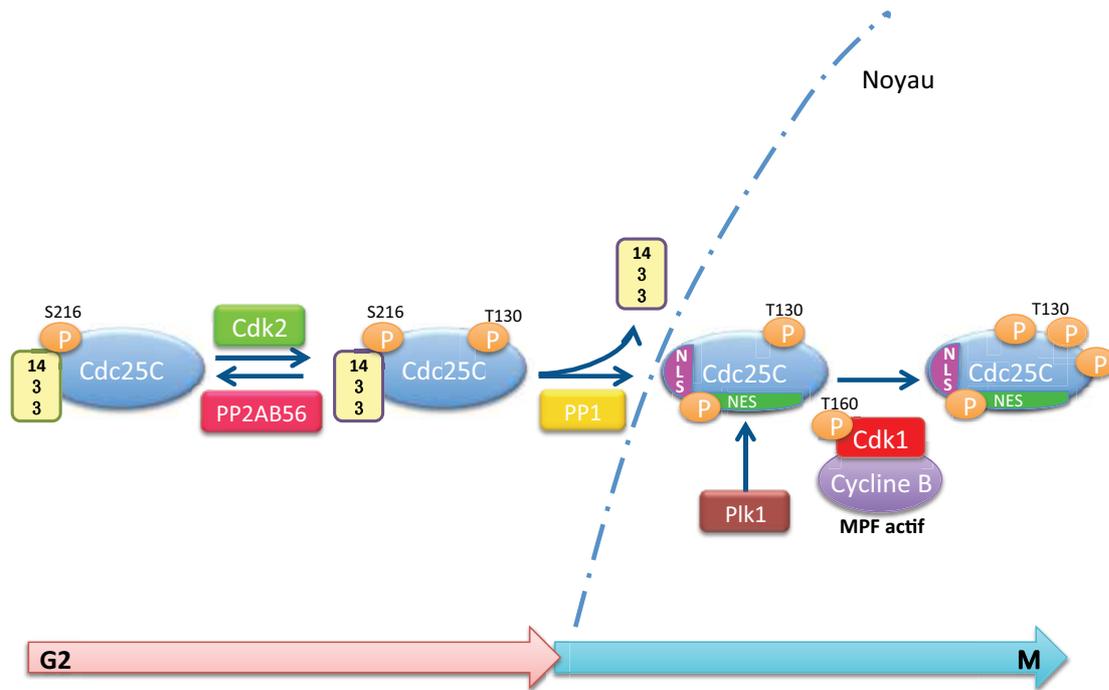
La régulation de Cdc25C au cours de la transition G2/M a plus particulièrement été étudiée. En interphase, Cdc25C est maintenue inactive par phosphorylation du résidu Ser287 (Ser216 chez l'humain) par Chk1. Cette phosphorylation sert de point d'ancrage à la protéine 14-3-3 qui constitue un adaptateur moléculaire pouvant réguler sa cible en modulant leur activité, leur capacité d'interaction avec d'autres protéines et leur localisation subcellulaire. L'association de 14-3-3 à Cdc25C masque le signal de localisation nucléaire de Cdc25C et séquestre la phosphatase dans le cytoplasme empêchant son entrée dans le noyau où elle activera le complexe cycline B/Cdk1 (Kumagai et al, 1998 ; Kumagai and Dunphy, 1999 ; pour revue, Bollen et al, 2009 ; Perry and Kornbluth, 2007). Lors de la transition G2/M, la phosphorylation du résidu T138 (T130 chez l'humain) de Cdc25C par Cdk2 et la déphosphorylation de la Ser287 de Cdc25C par la phosphatase PP1, conduisent à la dissociation de Cdc25C et 14-3-3 et à la translocation de Cdc25C dans le noyau (Kumagai et al, 1998 ; Margolis et al, 2003 ; Margolis and Kornbluth, 2004 ; Margolis et al, 2006 ; pour revue, Bollen et al, 2009 ; Perry and Kornbluth, 2007). La translocation de Cdc25C va permettre sa phosphorylation sur le résidu S285 (S214 chez l'humain) et son activation. En effet en entrée de mitose, Cdc25C est hyperphosphorylée. Il a été montré qu'en absence de Cdk1 actif et en inhibant les phosphatases sensibles à l'acide okadaïque (OA), Cdc25C est

toujours phosphorylée et activée (Izumi et al, 1992). Ces observations indiquent qu'une ou plusieurs autres kinases sont impliquées dans l'activation de Cdc25C durant la transition G2/M. Différentes études montrent dans des extraits d'œufs de Xénope que la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et Plx1 (Polo Like Kinase Xenopus 1) phosphorylent Cdc25C (Wang et al, 2007 ; Kumagai and Dunphy, 1996). Ces auteurs ont également montré que ERK (Extracellular Regulated Kinase), l'orthologue humain de la MAPK participe avec Plk1 au système de régulation de Cdc25C pendant la mitose de cellules somatiques de mammifères (Wang et al, 2007 ; Toyoshima-Morimoto et al, 2002 ; Nakajima et al, 2003). Une récente étude montre que RSK2 phosphoryle et active également Cdc25C (Wang et al, 2010). Une fois activée Cdc25C participera à la boucle d'auto-amplification de cycline B/Cdk1 (Margolis et al, 2006 ; Kumagai and Dunphy, 1992 ; Hoffman et al, 1993) (Figure 8).

### **C. Plk1**

La kinase Polo fut décrite pour la première fois chez la drosophile, la mutation du gène *polo* conduisait à des défauts méiotique et mitotique (Sunkel and Glover, 1998). Polo est hautement conservée, il existe quatre isoformes de Polo chez les mammifères (trois isoformes Plx1, Plx2 et Plx3 chez le Xénope). Plx1 participe à l'activation du MPF. En effet, chez le Xénope, il a été montré que Plx1 phosphoryle et active Cdc25C, *in vitro* (Kumagai and dunphy, 1996 ; Nakajima et al, 2003). L'immunodéplétion de Plx1 dans des extraits d'œufs de xénope supprime l'hyperphosphorylation de Cdc25C (Karaïskou et al, 1998 ; Karaïskou et al, 1999 ; Abrieu et al, 1998). Chez l'homme, Plk1 régule et phosphoryle Cdc25C sur la Ser198 présente dans la séquence NLS (Nuclear Localization Signal), ce qui permettrait le transport de Cdc25C dans le noyau en début de prophase, lorsque l'enveloppe nucléaire n'est pas encore rompue (Toyoshima-Morimoto et al, 2002). De plus, il a été mis en évidence que la Thr130 de Cdc25 (Thr138 chez le *Xénope*) sert de site de liaison à Plk1 (Elia et al, 2003). Cependant l'activation de Polo n'est pas encore comprise et serait sous la dépendance du MPF (Abrieu et al, 1998 ; Karaïskou et al, 2004).

Outre son implication dans l'activation du MPF, Plk1 participe à de nombreux événements mitotiques tels que la séparation des centrosomes, l'assemblage du fuseau, la dissociation des cohésines et la cytotédiérèse (pour revue, Archambault and Glover, 2009). Ces différents rôles



### Figure 8: Régulations de Cdc25C à la transition G2/M.

Pendant la phase G2, la phosphatase Cdc25C est maintenue inactive au cytoplasme via sa liaison à la protéine 14-3-3 qui masque son signal de localisation nucléaire, liaison qui est dépendante de la phosphorylation de la sérine 216 de Cdc25C. Cdc25C est phosphorylée sur la thréonine 130 par la kinase Cdk2, phosphorylation nécessaire à son activation future. Cette phosphorylation est déphosphorylée par la phosphatase PP2A-B56. Au cours de la transition G2/M, la phosphorylation inhibitrice située sur la sérine 216 est déphosphorylée par la phosphatase PP1, ce qui dissocie Cdc25C de 14-3-3, démasque un signal de localisation nucléaire (NLS) et transloque Cdc25C au noyau où elle peut alors activer le complexe Cdk1/cycline B et être activée en retour. Cependant, Cdc25C possède aussi un signal d'export nucléaire (NES) qui doit être phosphorylé par la kinase Plk pour maintenir Cdc25C au noyau.

sont accompagnés d'une localisation dynamique de Plk1 durant la division cellulaire. En effet, Plk1 se localise aux niveaux des centrosomes et des kinétochores en début de mitose pour aller ensuite au centre du fuseau et au midbody en fin de phase M.

#### **D. Greatwall**

La découverte de la kinase Greatwall (Gwl) est assez récente. En effet, son gène fut mis en évidence chez la drosophile par analyse de mutants présentant des défauts de condensation des chromosomes (Yu et al, 2004). Le gène *gwl* code pour une Ser/Thr kinase appartenant à la famille MAST (Microtubule Associated Ser/Thr Kinase) des AGC kinases. La protéine Gwl est conservée chez les insectes et les vertébrés, mais n'est pas présente chez *C. elegans*. L'analyse de mutants *gwl* chez la drosophile a montré une accumulation en mitose de neuroblastes. Néanmoins, les auteurs ont également observé un grand nombre de cellules en G2/M ce qui suggérerait que ces mutants avaient des défauts aux niveaux de la progression mitotique et de l'entrée en mitose (Yu et al, 2004). Il semblait donc que Gwl était une kinase importante au niveau de l'entrée en mitose et également durant la progression mitotique. L'analyse phénotypique à partir de mutants Gwl ou à l'aide de siRNA chez la drosophile a montré des défauts de formation du fuseau mitotique accompagnés d'une mauvaise congression et ségrégation des chromosomes (Yu et al, 2004 ; Bettencourt-Dias et al, 2004). Gwl fut ensuite étudiée dans le système *in vitro* des extraits d'œufs de xénope.

Les premières études menées chez le xénope ont montré que Gwl était phosphorylée dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II. Gwl est capable de s'autophosphoryler, de plus, les résidus Glycine 41 et Aspartate 173 sont nécessaires à son activité puisque les mutations G14S et D173A inactivent la protéine (Yu et al, 2006). D'autre part, l'immunodéplétion de Gwl des extraits arrêtés en métaphase II induit une inactivation du MPF sans dégradation de la cycline B, due à l'accumulation des phosphorylations inhibitrices de Cdk1. Par ailleurs, l'immunodéplétion de Gwl des extraits d'œufs de xénope cyclants ne permet pas l'entrée en mitose de ces extraits. Les phénotypes induits par l'immunodéplétion de Gwl peuvent être sauvés par l'addition de Gwl ou partiellement sauvés par l'addition de la forme constitutivement active de Cdk1 (Yu et al, 2006). De plus, il a été mis en évidence que le MPF phosphoryle Gwl *in vitro* et que cette phosphorylation pourrait contribuer à l'activation de Gwl (Yu et al, 2006). Ces observations suggérèrent que Gwl pourrait

participer à la boucle d'activation du MPF selon deux hypothèses : Gwl pourrait agir comme un effecteur négatif de Myt1 et Wee1 ou pourrait participer à l'activation de Cdc25.

A la transition G2/M, Gwl peut induire une phosphorylation partielle de Cdc25 indépendamment du MPF. En effet, en absence de la cycline B et d'activité du MPF, une légère phosphorylation de Cdc25 dépendante de Gwl est observée, suggérant que Gwl pourrait induire l'étape initiale de phosphorylation de Cdc25. Cependant, Cdc25 n'est pas un substrat direct de Gwl suggérant qu'elle agisse de manière indirecte sur la phosphorylation de Cdc25. Néanmoins, elle est indépendante de Plx1 ou MAPK puisque l'immunodéplétion de Plx1 ou l'inhibition de la voie mos-MAPK n'empêchent pas la phosphorylation de Cdc25 (Zhao et al, 2008).

Notons que chez l'homme aucun orthologue de Gwl n'était connu lorsque notre travail a commencé. Cependant par son homologie de séquence il avait été proposé que l'orthologue humain de Gwl est MAST-L (Microtubule-Associated Ser/Thr Kinase Like) dont le rôle était peu connu ; deux publications à propos de MAST-L montraient que la mutation E167D dans le domaine N-terminal de MAST-L est associée à une thrombocytopénie autosomale dominante chez l'humain, qui correspond à une diminution du nombre de plaquettes sanguines (Gandhi et al, 2003). Cette mutation affecte le développement des thrombocytes (Johnson et al, 2009).

## **E. PP2A**

### **a. Structure de PP2A**

La phosphatase PP2A appartient à la famille des phosphoprotéines phosphatases (PPP) et est un complexe trimérique, composé d'une sous-unité catalytique (sous-unité C) et d'une sous-unité non catalytique « échafaudage » (sous-unité A, ou PR65). Le complexe PP2A s'associe à une troisième sous-unité qui détermine le substrat (sous-unité B). Les sous-unités B sont divisées en trois sous-familles : B (PR55/B55), B' (PR56/B56) et B'' (PR72), chacune de ces sous-unités possède des isoformes. Les sous-unités A et C ont également des isoformes, de ce fait on peut distinguer plus de 70 holoenzymes de PP2A indiquant que PP2A a de nombreux rôles biologiques. En effet, PP2A joue un rôle dans le développement, la prolifération

cellulaire, la mobilité cellulaire, la dynamique du cytosquelette et le cycle cellulaire (Janssens and Goris, 2001).

## **b. Fonctions de PP2A au cours de la mitose**

PP2A joue un rôle important dans la régulation de la mitose au niveau de l'entrée et de la sortie de celle-ci. Le rôle régulateur de PP2A à la transition G2/M a été mis en évidence chez le xénope et l'étoile de mer grâce à l'utilisation de l'acide okadaïque (Goris et al, 1989 ; Picard et al, 1989). Il a été montré que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque dans des extraits d'œufs de xénope interphasiques conduisait à l'activation du complexe cycline B/ Cdk1 et bloquait la déphosphorylation de Cdc25 suggérant que PP2A régule négativement le MPF en maintenant Cdc25 déphosphorylée et donc sous forme inactive (Clarke et al, 1993 ; Felix et al, 1990). Des études chez la levure, ont montré que la diminution d'activité de PP2A induit une entrée prématurée en mitose probablement due à l'activation de Cdc25 (Kinoshita et al, 1990 ; Kinoshita et al, 1993). D'autre part, l'inhibition de PP2A par l'addition d'acide okadaïque, dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II, induit la dégradation de la cycline B et la sortie de mitose (Lorca et al, 1991). De plus une augmentation de l'activité de PP2A conduit à la ségrégation de chromosomes chez la levure (Kinoshita et al, 1990). Le mutant du gène *cdc25* chez la levure, lequel code pour une sous-unité régulatrice de PP2A présente une séparation de chromatides sœurs prématurée et une sortie de mitose malgré la présence du point de contrôle du fuseau mitotique actif (Minshull et al, 1996). La sortie de mitose de ce mutant se fait en absence de dégradation de la cycline B à travers l'inactivation de Cdc28 (Cdk1). Des études récentes ont également montré que la sous unité B55 $\delta$  participe à l'entrée et la sortie de mitose (Mochida et al, 2009). En effet, l'immunodéplétion de PP2A/ B55 $\delta$  dans des extraits d'œufs de xénope cyclants accélère l'entrée en mitose et l'immunodéplétion de cette sous-unité dans des extraits arrêtés en métaphase II induit un retard important dans la sortie de mitose (Mochida et al, 2009). Notons que PP2A intervient également au niveau de la cohésion des chromatides sœurs (pour revue, Nasmyth et al, 2005).

## **III. Régulation du MPF en fonction de sa localisation subcellulaire**

L'hypothèse actuelle sur l'activation du MPF propose qu'en plus de la régulation par phosphorylation et déphosphorylation du complexe cycline B/Cdk1, la localisation subcellulaire du complexe cycline B/Cdk1 influencerait son activation. En phase G2, le complexe étant plus important que l'import nucléaire, la cycline B1 se trouverait majoritairement dans le cytoplasme (Hagting et al, 1998). La translocation nucléaire de cycline B/Cdk1 en fin de phase G2 serait une étape nécessaire à l'entrée en mitose car c'est dans le noyau que le complexe serait activé par l'action de la phosphatase Cdc25, alors que les kinases inhibitrices Myt1 et Wee1 resteraient dans le cytoplasme pendant cette transition (Kornbluth et al, 1994 ; Liu et al, 1997 ; Fattaey and Boher, 1997 ; Baldin and Ducommun, 1995).

Cependant, des données récentes montrent que le MPF est d'abord activé dans le cytoplasme et qu'il est ensuite rapidement transporté dans le noyau où il s'accumule. Cette accumulation dépend de l'importation continue du complexe indépendamment de Plk1. L'importation du complexe cycline B1/Cdk1 serait produite par une modification générale de la machinerie d'importation. De plus, un pool important de cycline B1/Cdk1 resterait dans le cytoplasme même au moment où l'import nucléaire est le plus fort (Gavet and Pines, 2010).

Contrairement à cycline B1/Cdk1, la localisation cycline B2/Cdk1 semble restreinte à l'appareil de Golgi en interphase et en mitose (Jackman et al, 1995). L'expression dans des cellules de chimères entre la cycline B1 et B2 montre que la spécificité de fonction de ces deux cyclines dépend principalement de leur localisation subcellulaire : une cycline B1 dirigée vers l'appareil de Golgi se conduit comme une cycline B2 alors qu'une cycline B2 libérée de l'appareil de Golgi assure les fonctions cytoplasmiques de la cycline B1 (Draviam et al, 2001). En effet, la cycline B1 participe à la transition G2/M et à la séparation des centrosomes alors que la cycline B2 participe à la fragmentation de l'appareil de Golgi.

## **Chapitre 3 : La protéine kinase Greatwall**

## **I. Généralités sur les AGC kinases**

Les protéines kinases sont des protéines fondamentales pour le contrôle des fonctions du vivant. Ce sont des enzymes régulatrices qui phosphorylent leurs substrats sur des résidus Ser, Thr ou Tyr. La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle qui permet la régulation de leur fonction biologique. Le terme d'AGC kinase a été proposé par Steven Hanks et Tony Hunter en 1995, pour définir le sous-groupe de kinases phosphorylant les résidus Ser/Thr se basant sur la séquence d'alignement de leur domaine catalytique proche de PKA (cAMP-Dependent Protein Kinase 1), PKG (cGMP-Dependent Protein Kinase) et PKC (Protein Kinase C (Hanks and hunter, 1995)). La superfamille des AGC kinases comporte 60 membres parmi plus de 500 protéines kinases connues chez les humains à ce jour, dont la plupart sont hautement conservés chez les eucaryotes et regroupés en 21 sous-familles selon leur homologie en dehors de leur domaine catalytique et de leur structure (Manning et al, 2002). La dérégulation de ces protéines peut être à l'origine de pathologies telles que le diabète ou le cancer.

De plus, les AGC kinases sont classées en deux principales familles selon leur spécificité de substrat : les tyrosines kinases et les sérine/thréonine kinases (Johnson and Hunter, 2005 ; Venter e al, 2001).

### **A. Structure des AGC kinases**

L'activation de la plupart des AGC kinases implique la phosphorylation de deux domaines de régulation hautement conservés : la « T-loop » (boucle T) ou boucle d'activation, située au niveau du domaine catalytique, et le motif hydrophobe qui se trouve en dehors du domaine catalytique, au niveau de la partie C-terminale de la protéine. Un grand nombre d'AGC kinases contiennent également dans leur séquence C-terminale un autre site de phosphorylation important, appelé le « tail/linker motif ».

Les AGC kinases ont une structure bi-lobulaire, constituée d'un petit lobe en N-terminal (N-lobe) et un grand lobe en C-terminal (C-lobe). Ces deux lobes ont une conformation ouverte lorsque la kinase est inactive qui se referme sur une molécule d'ATP lorsqu'elle est active (Huse and Kuriyan, 2002). Le C-lobe contient la boucle d'activation, ou T-loop, nécessaire pour l'activation de la kinase. La particularité des AGC kinases est leur queue en C-terminal

qui se replie pour interagir avec le N-lobe. Cette queue C-terminale contient des domaines importants pour l'activation et la stabilisation de la kinase, il s'agit du motif hydrophobe et du « turn motif » (Hauge et al, 2007 ; Frodin et al, 2002). Le motif hydrophobe présente la séquence consensus FXXFS, une fois phosphorylé la sérine de ce domaine participe au repliement de la partie C-ter sur la partie N-ter en s'associant à des acides aminés hydrophobes. De manière similaire, le turn motif qui correspond à une sérine conservée en C-ter va permettre le repliement de la partie N-ter vers la partie C-ter en s'associant à une lysine qui est aussi conservée dans certaines AGC kinases (Hauge et al, 2007) (Figure 9). De plus, dans certaines AGC kinases le motif hydrophobe et le turn motif agissent comme un site d'interaction avec PDK1, qui est une AGC kinase particulière puisqu'elle ne possède pas de motif hydrophobique. PDK1 phosphoryle la T-loop et active la kinase (Komander et al, 2005).

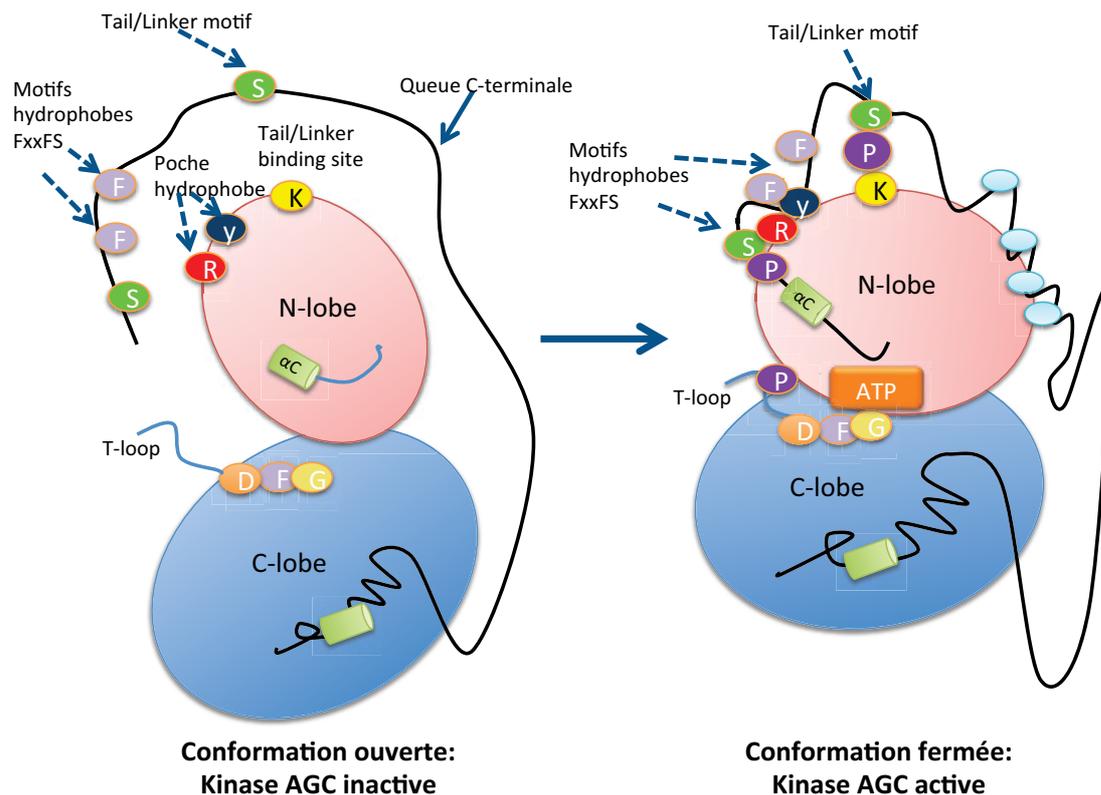
## ***B. Fonctions des AGC kinases***

Les AGC kinases contrôlent d'importants processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation ou encore la survie cellulaire, ce qui les soumet à une régulation temporelle et spatiale précise.

Parmi ces kinases, Akt/PKB phosphoryle et régule la fonction de diverses protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme, la synthèse protéique, la survie cellulaire, la différenciation et la prolifération (pour revue : Brazil et al, 2004 ; Fayard et al, 2005). Elle s'active par la phosphorylation de son segment d'activation et de son motif hydrophobe en réponse à divers stimuli tels que l'insuline et les facteurs de croissance.

La kinase RSK, quant à elle, est particulière du fait qu'elle possède deux domaines kinases distincts et fonctionnels : le domaine kinase N-terminal (spécifique des AGC kinases) et le domaine kinase C-terminal (Jones et al, 1988). RSK agit au niveau de la régulation de la transcription et de la traduction, la motilité, la croissance cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire ainsi qu'au niveau de la progression du cycle cellulaire (pour revue : Anjum and Blenis, 2008).

Il paraît évident, étant donné que les AGC kinases contrôlent d'importants processus cellulaires, que leur dérégulation peut entraîner des conséquences sérieuses et être à l'origine de pathologies telles que le diabète ou le cancer.



### Figure 9: Modèle d'activation des AGC kinases.

Les AGC kinases possèdent une structure bi-lobaire constituée d'un lobe C-terminal et d'un lobe N-terminal. L'activation de la kinase se fait via la phosphorylation de la T-loop suivie des phosphorylations du "tail/linker motif" et du motif hydrophobe situés tous deux au niveau de la queue C-terminale. Le "tail/link motif" va alors se lier au "tail/linker binding site" tandis que les motifs hydrophobes s'associent à la poche hydrophobe de la kinase. Ces deux motifs vont ainsi permettre la liaison de la queue C-terminale avec la partie N-terminale de la protéine qui va alors se refermer sur la molécule d'ATP, faisant passer la kinase d'une conformation ouverte inactive à une conformation fermée, active.

Dans cette étude, nous nous intéressons à AGC kinase Greatwall. Elle possède un domaine kinase séparé en deux par un long insert de 500 acides aminés ou « T-loop » et ne possède pas de motif hydrophobe.

## **II. La kinase Greatwall ou MASTL**

### ***A. Structure***

Par séquence d'homologie, Gwl a été classifiée parmi les membres des AGC kinases et plus particulièrement dans la sous-famille MAST (Manning et al, 2002). Gwl est une kinase particulière car elle possède un insert de 500 acides aminés entre ses sous- domaines VII et VIII, où se trouve une « T-loop » (Yu et al, 2004). La fonction de cette T-loop particulière n'est pas encore définie.

Contrairement à la plupart des AGC kinases, Gwl est dépourvue de motif hydrophobe malgré la présence d'une poche hydrophobe fonctionnelle. Ces observations suggèrent que l'activation de Gwl pourrait être régulée par la liaison de la poche hydrophobe au motif hydrophobe d'une autre AGC kinase.

L'analyse de modélisation moléculaire et des expériences de mutagenèses montrent que Gwl présente une interaction entre la queue C-ter et deux lysines à l'extrémité N-terminale. Cette interaction est nécessaire pour la fonctionnalité et l'activation de la kinase.

### ***B. Localisation subcellulaire***

Les premières études chez la drosophile sur Gwl ont mis en évidence que Gwl était une protéine nucléaire. De récentes études montrent que durant l'interphase Gwl se localise au niveau du noyau et des centrosomes. Puis Gwl s'accumule aux pôles du fuseau mitotique et le long des fibres de fuseau. Enfin au moment de la télophase et de la cytotélorèse, Gwl se situe au niveau de la zone intermédiaire du pont cytoplasmique (Burgess et al, 2010 ; Voets et al, 2010).

## **C. Fonctions de Greatwall**

### **a. Entrée et progression de la mitose**

Comme décrit précédemment, un rôle potentiel de la kinase Greatwall au niveau de la régulation de la division mitotique a d'abord été suggéré chez la drosophile où il a été observé qu'un mutant particulier de Greatwall entraîne des défauts de condensation des chromosomes ainsi qu'un retard de progression en phases G2 et M (Yu et al, 2004). Puis, les premières études réalisées chez le xénope dans le but d'étudier le rôle potentiel de Greatwall dans la division cellulaire ont montré que la kinase Greatwall est activée par phosphorylation pendant la mitose. Aussi, l'immunodéplétion de Greatwall induit une sortie prématurée de phase M à partir d'extraits arrêtés en métaphase II de méiose (arrêt CSF) de façon concomitante à une diminution de l'activité du MPF via la phosphorylation du résidu inhibiteur de Cdk1 (Tyr15) et cela sans dégradation de la cycline B. D'autre part, la déplétion de Greatwall à partir d'extraits cyclants empêche ces derniers de rentrer en mitose en empêchant l'activation du complexe Cdk1/cycline B. En outre, il a été observé que le MPF phosphoryle Greatwall *in vitro* et pourrait ainsi l'activer (Yu et al, 2006). De plus, l'ajout ectopique de la kinase active accélère la transition G2/M des extraits cyclants et l'injection de la protéine Greatwall induit la maturation méiotique des ovocytes arrêtés en G2 en absence de progestérone (Zhao et al, 2008). Ces résultats ont soulevé l'hypothèse que la protéine Greatwall serait requise pour l'entrée en mitose et le maintien de la phase M et cela au travers du maintien de l'activation du MPF, probablement en intervenant au niveau de la boucle d'auto-amplification du MPF.

L'hypothèse la plus probable était que Greatwall participe au contrôle de la boucle d'auto-amplification du MPF en activant la phosphatase Cdc25 ou bien en inhibant les kinases Wee1 et Myt1. Même si l'activation de Greatwall induit la phosphorylation et l'activation de la phosphatase Cdc25, toutefois, Greatwall ne phosphoryle pas Cdc25 de façon directe indiquant qu'une autre kinase joue ce rôle (Zhao et al, 2008). Une avancée majeure dans la compréhension du rôle de Greatwall a été obtenue au sein de notre laboratoire. Nous avons montré que dans des extraits d'ovocytes de xénope arrêtés en métaphase II de méiose, la triple déplétion des kinases Wee1 et Myt1 (les deux kinases inhibitrices du MPF) et de la kinase Greatwall n'empêche pas la sortie de phase M accompagnée de la déphosphorylation de la plupart des substrats du MPF. Ces résultats montrent pour la première fois que même

dans des conditions où le MPF est maintenu à l'état actif, l'élimination de Greatwall promeut la sortie prématurée de phase M. Ainsi, Greatwall intervient dans l'entrée et la progression de la mitose à travers un mécanisme indépendant de la boucle d'auto-amplification du MPF et qui serait probablement lié à l'action d'une phosphatase (Vigneron et al, 2009).

Cette observation importante a permis de poser un nouveau regard sur le paradigme des mécanismes contrôlant l'entrée et la progression de mitose. En effet, jusque-là, l'entrée en mitose reposait uniquement sur l'activation du complexe Cdk1/cycline B. Or, à la lumière de ces résultats, Greatwall apparaît comme étant un nouvel élément-clé de ce processus.

Ainsi, il a été observé que le phénotype de sortie de phase M induit par l'élimination de Greatwall peut être sauvé soit par l'ajout d'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatases), à une dose où la drogue inhibe préférentiellement la phosphatase PP2A, soit par l'élimination de la sous-unité B55δ de PP2A (Castilho et al, 2009 ; Vigneron et al, 2009). De plus, des expériences de pull-down à partir d'extraits cellulaires ou d'extraits d'ovocytes de xénope indiquent que Greatwall et PP2A s'associent. Par conséquent, Greatwall régule le maintien de la phase M via l'inhibition de la phosphatase PP2A (Castilho et al, 2009 ; Vigneron et al, 2009).

Ces résultats ont permis d'établir un nouveau concept où l'entrée et la progression de la mitose reposent sur l'activation de deux kinases, d'une part le complexe Cdk1/cycline B qui permet la phosphorylation des substrats mitotiques requis pour l'entrée et le maintien de la mitose, et d'autre part de Greatwall qui empêche la déphosphorylation de ces substrats via l'inhibition de la phosphatase PP2A-B55δ.

Cette voie de signalisation est conservée dans les cellules humaines. En effet, des défauts mitotiques majeurs sont observés en l'absence de la protéine MAST-L, homologue humain de la kinase Greatwall. Différents phénotypes sont observés selon le degré d'élimination de la protéine MAST-L. Une élimination totale de la kinase entraîne un arrêt des cellules en phase G2, tandis qu'une élimination partielle permet aux cellules d'entrer en mitose puis d'en sortir en déphosphorylant les substrats du complexe Cdk1/cycline B de façon prématurée, et cela en développant des défauts importants de cytokinèse, des défauts d'attachement des chromosomes sur le fuseau mitotique, ou encore des problèmes de condensation de l'ADN (Burgess et al, 2010 ; Voets and Wolthuis, 2010). Ces défauts sont restaurés soit par complémentation en exprimant la protéine Greatwall de xénope, soit par double déplétion de

MAST-L/PP2A, soit en inhibant la phosphatase PP2A avec l'acide okadaïque (Burgess et al, 2010).

En outre, la protéine MAST-L doit être inactivée pour permettre la sortie de mitose et la déphosphorylation des substrats mitotiques dans les fibroblastes embryonnaires primaires de souris dépourvues du cofacteur de l'APC/C, Cdc20. Cette sortie de mitose dépend de l'activité de la phosphatase PP2A contenant les sous-unités régulatrices B55 $\alpha$  ou B55 $\delta$  (Manchado et al, 2010).

Par ailleurs, chez les ovocytes de drosophile, Greatwall semble aussi réguler négativement la PP2A-B55 durant la mitose et la méiose et cette inhibition est nécessaire à l'accomplissement d'une division cellulaire correcte (Wang et al, 2011).

## **b. Point de contrôle du dommage à l'ADN**

Récemment, des expériences à partir d'extraits d'ovocytes de xénope ont mis en avant un rôle de Greatwall au niveau du point de contrôle du dommage à l'ADN (« DNA damage checkpoint»). En effet, il a été montré que l'ajout d'oligonucléotides double-brin dans ces extraits entraîne l'activation du point de contrôle du dommage à l'ADN, vérifiée par la phosphorylation de protéines-clé du checkpoint telles que Chk1 ou Smc1. Le retrait de ces oligonucléotides double-brin est quant à lui suivi par la déphosphorylation subséquente de ces protéines du checkpoint. Or, si la protéine Greatwall est éliminée des extraits après l'ajout des oligonucléotides, on observe alors une augmentation de la phosphorylation des protéines du checkpoint, tandis que l'ajout de la protéine Greatwall ectopique à l'extrait après le retrait des oligonucléotides accélère leur déphosphorylation (Peng et al, 2011, 2010). Par ailleurs, il a également été démontré l'existence d'une interdépendance d'activation de Greatwall et de Plx1 (Polo) dans ce processus. En effet, l'élimination de Plx1 empêche l'activation de Greatwall au cours de la réponse aux dommages à l'ADN et inversement, l'élimination de Greatwall empêche l'activation de Plx1, suggérant que les deux kinases ont besoin l'une de l'autre pour être réactivées au cours de ce processus (Peng et al, 2011). Cependant, le mécanisme d'action de Greatwall au cours de l'activation du checkpoint n'est toujours pas connu à ce jour étant donné qu'aucune cible directe impliquée dans ce processus n'a encore été identifiée.

### **c. Activation de la transcription**

Chez les eucaryotes, la prolifération cellulaire est contrôlée par des facteurs de croissance et par l'apport de nutriments essentiels en l'absence desquels la cellule peut entrer dans un état quiescent (phase G0). Il a été démontré chez la levure que Greatwall participe à l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la mise en place du programme G0. Rim15, l'orthologue de Greatwall chez la levure, est nécessaire à l'initiation du programme G0 en réponse à la carence en nutriments. Des limitations en azote ou en carbone vont entraîner l'activation de Rim15 ce qui induit la transcription de gènes spécifiques requis pour l'initiation du programme G0 (Talarek et al, 2010).

Greatwall est une protéine kinase essentielle au contrôle de la division mitotique. En plus de ce rôle primordial, la kinase intervient également dans la réponse aux dommages à l'ADN ainsi que pour l'établissement du programme G0. Ces observations suggèrent que la kinase Greatwall serait impliquée dans une voie de signalisation conservée qui ciblerait différentes protéines et cela afin de pouvoir contrôler différents processus biologiques.

### **D. Greatwall et pathologies**

A ce jour, peu de choses sont connues sur l'implication de la kinase Greatwall dans les pathologies humaines.

Toutefois, la kinase MAST-L est impliquée dans la Thrombocytopénie familiale autosomique dominante, une affection qui se caractérise par la diminution du nombre de plaquettes sanguines avec un blocage de la différenciation mégacaryocytaire. Cette pathologie se traduit par une tendance à développer des saignements légers qui, dans les formes les plus sévères, peut entraîner des hémorragies de la peau et des muqueuses, des saignements de nez ou encore des saignements digestifs ou cérébraux. Cette forme de Thrombocytopénie est liée au chromosome 10 humain (Drachman et al, 2000). Le gène FLJ14813 responsable de cette pathologie se situe au locus 10p11-12 et a été identifié comme étant MAST-L (Gandhi et al, 2003). Les auteurs ont décrit une mutation non-sens de MAST-L liée à cette maladie, qui entraîne la substitution d'une cytosine par une guanidine en position 565 de ce gène et par conséquent la substitution d'un acide aspartique par un acide glutamique au niveau protéique (E167D). Des travaux non publiés de notre équipe indiquent que cette mutation n'affecte pas

l'activité kinase de MAST-L. De plus, des expériences de knock-down de MAST-L ont été réalisées dans un modèle d'étude *in vivo*, le zebrafish (poisson zèbre), afin d'étudier la contribution de cette protéine au niveau du développement des thrombocytes, l'équivalent des plaquettes humaines. L'élimination de cette kinase chez le zebrafish entraîne la diminution des plaquettes circulantes, suggérant l'implication de MAST-L dans la production de plaquettes, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu (Johnson et al, 2009).

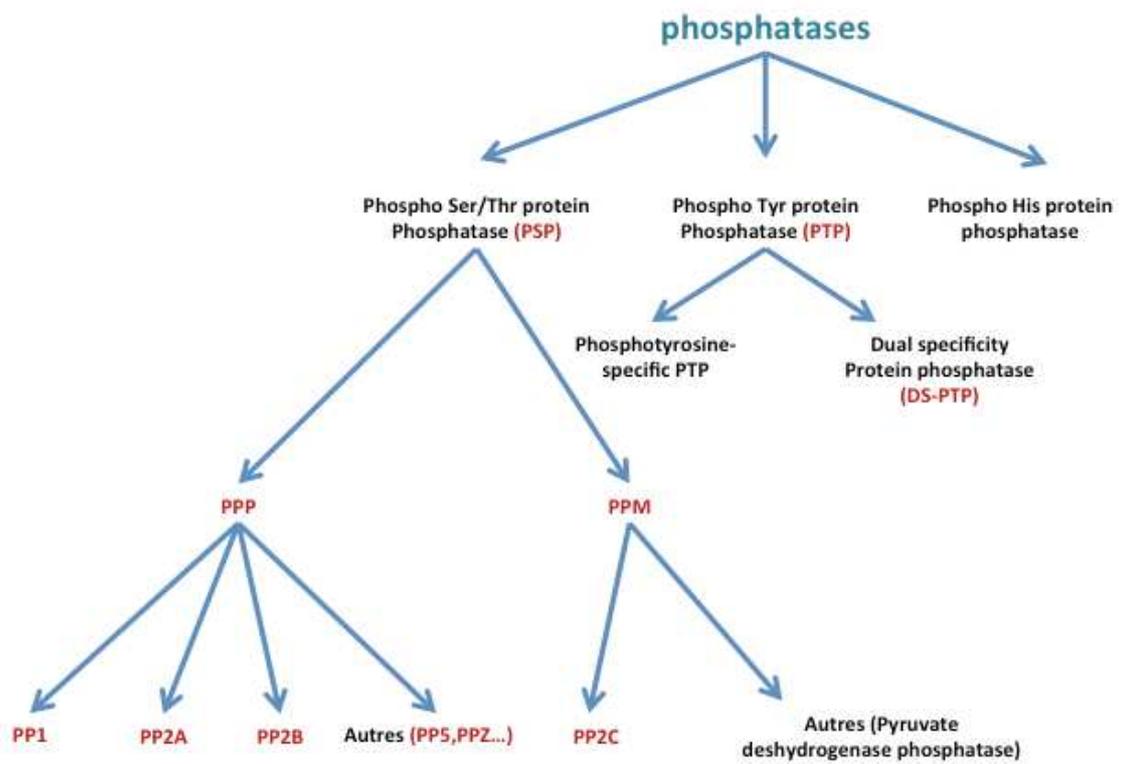
## **Chapitre 4 : Les Protéines Phosphatases**

La phosphorylation des protéines implique le transfert du groupement phosphate terminal d'une molécule d'ATP catalysée par une enzyme sur le groupement hydroxyle d'une chaîne latérale des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine d'une protéine. Cette action est catalysée par une protéine kinase et libère une grande quantité d'énergie lorsque la liaison phosphate-phosphate de l'ATP est rompue pour produire de l'ADP.

La réaction opposée est la déphosphorylation, soit l'élimination du phosphate qui est, elle, catalysée par une protéine phosphatase. Tandis que par le passé une attention particulière a été portée à l'étude de la régulation des protéines kinases, il apparaît maintenant que les protéines phosphatases sont des enzymes régulées de façon précise qui jouent un rôle tout aussi important que celui des kinases dans les réactions de phosphorylation/déphosphorylation des protéines.

Les cellules contiennent de nombreuses protéines phosphatases différentes. Certaines phosphatases sont très spécifiques et agissent sur une seule ou quelques protéines, tandis que d'autres agissent sur un large éventail de substrats dont elles acquièrent la spécificité par leurs sous-unités régulatrices. Plus de 500 protéines kinases ont été identifiées dans le génome humain (Johnson and Hunter, 2005; Venter et al, 2001), elles sont classées comme Tyr kinases ou Ser/Thr kinases. Le nombre de Tyr kinases est approximativement le même que celui des Tyr phosphatases. Par contre, le nombre de Ser/Thr phosphatases connu à ce jour est moins important que celui des Ser/Thr kinases (Rebelo S and al, 2015). Il y a une centaine de tyrosine phosphatases et une quarantaine de sérine/thréonine phosphatases (Alonso et al, 2004; Cohen,1997). Cette différence numérique pourrait être expliquée par la façon dont les Ser/Thr phosphatases sont régulées. Elles ont beaucoup de protéines interactrices ou régulatrices qui peuvent se lier avec la sous-unité catalytique de ces phosphatases. Celles-ci peuvent être responsables de leur localisation, de la spécificité du substrat et de l'activité (Rebelo S and al, 2015).

La classification des phosphatases a été établie en premier lieu à partir de critères biochimiques. Les phosphatases ont été séparées en plusieurs groupes selon leur spécificité de substrats : les PSP (phosphosérine/thréonine phosphatases) et les PTP (phosphotyrosine phosphatases) constituent les deux plus grandes familles (Figure 10). Cependant certaines phosphatases sont capables de déphosphoryler plusieurs types de substrats, comme les « dual-specificity » protéines phosphatases qui déphosphorylent des phosphosérines et



**Figure 10: Classification des phosphatase chez les eucaryotes.**

phosphothréonines mais aussi des phosphotyrosines (pour revue, voir Arino, 2002; Stark, 1996). Au cours de ma thèse, nous n'avons étudié que des PSP que je présenterai plus en détail. D'autres critères biochimiques ont été utilisés pour diviser les PSP en deux sous-familles : les PP1 (protéine phosphatase de type 1) et les PP2 (protéine phosphatase de type 2). Initialement, les PP1 ont été caractérisées par le fait qu'elles sont inhibées par deux inhibiteurs thermorésistants nommés I-1 et I-2 (« Inhibitor-1 » et « Inhibitor- 2 ») et qu'elles déphosphorylent préférentiellement la sous-unité  $\beta$  de la phosphorylase kinase, tandis que les PP2 sont insensibles aux inhibiteurs thermorésistants et qu'elles déphosphorylent principalement la sous-unité  $\alpha$  de la phosphorylase kinase (Wera and Hemmings, 1995). En 2010, Arpp19 (cAMP-regulated phosphoprotein 19) et Ensa ( $\alpha$ -endosulfine) ont été mis en évidence comme inhibiteurs de PP2AB55. Contrairement à ce que l'on connaissait, ces deux protéines sont des inhibiteurs thermorésistants.

Les PP1 sont des holoenzymes composées d'une sous-unité catalytique et d'une ou plusieurs sous-unités régulatrices. La PP1c (notation pour la sous-unité catalytique de la PP1) peut aussi se lier à des protéines qui inhibent son activité. La PP1 est une des protéines eucaryotes les plus conservées (Ceulemans and Bollen, 2004).

Les PP2 peuvent être sous-divisées en plusieurs classes :

1. les PP2A qui sont des holoenzymes trimériques constituées d'un cœur comportant une sous-unité catalytique (sous-unité C) complexée à une sous-unité régulatrice (ou sous-unité A) et une sous-unité régulatrice variable (sous-unité B) (Dickman and Yarden, 1999; Stark, 1996; Wera and Hemmings, 1995).
2. les PP2B ou calcineurines qui sont des hétérodimères dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$ , composés d'une sous-unité catalytique (ou calcineurine A) se liant à la calmoduline et d'une sous-unité régulatrice (ou calcineurine B) qui lie le cation  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. les PP2C qui sont des enzymes monomériques dépendantes de  $\text{Mg}^{2+}$ .

La différence entre le nombre de kinases et de phosphatases est importante et se retrouve chez les eucaryotes supérieurs. Elle concerne principalement les PSP et pourrait suggérer que les kinases ont une plus grande spécificité de substrat et qu'une phosphatase doit ainsi contrebalancer les effets de plusieurs kinases. Le mécanisme d'action des phosphatases semble être modulé au moyen de sous-unités régulatrices et d'inhibiteurs spécifiques. Le rôle de ces sous-unités régulatrices n'est pas toujours très bien établi. Elles influencent probablement la

spécificité de substrat, la localisation subcellulaire et/ou l'activité de la sous-unité catalytique (Dickman and Yarden, 1999; Wera and Hemmings, 1995).

Cette première classification ne rend pas compte des relations phylogénétiques entre les différentes classes. C'est pourquoi, après analyse des gènes codant les PSP, les PP1, PP2A et PP2B ont été regroupées dans la famille des PPP (« phosphoprotein phosphatase P family »), alors que les PP2C plus éloignées phylogénétiquement appartiennent à la famille PPM (« phosphoprotein phosphatase M family ») (Cohen, 1997; Dickman and Yarden, 1999; Wera and Hemmings, 1995). De nouvelles phosphatases structurellement proches des PPP mais clairement distinctes des PP1, PP2A et PP2B ont été identifiées (PP4, PP5, PP6, PPZ, ...) (Figure 10). Quelques-unes ont été répertoriées par J. Arino pour la levure *S. cerevisiae* (Arino, 2002). En particulier, les PP5 sont des sérine/thréonine phosphatases qui se distinguent des autres PPP entre autres parce qu'elles fonctionnent sans sous-unité régulatrice. Leur domaine catalytique présente une forte similarité avec le domaine catalytique des autres PPP, mais ces phosphatases possèdent en N-terminal un motif TPR (« tetratricopeptides repeats ») caractéristique de la classe PP5. Les PPZ, quant à elles, ont une région C-terminale structurellement très proche de celle des PP1. Par contre, leur région N-terminale est atypique et les distingue des autres sérine/thréonine phosphatases.

Les protéines phosphatases constituent un groupe de protéines classifiées selon leur spécificité de substrat. Comme nous avons vu précédemment, Chez les eucaryotes, on peut distinguer 3 familles de protéines phosphatases : les phosphoprotéines phosphatases (PPPs), les protéines phosphatases dépendantes des métaux (PPMs) et il y a aussi les aspartate-basique phosphatases comme par exemple FCP(TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase) et SCP (small CTD phosphatase). Les phosphatases catalysent la déphosphorylation des protéines sur leurs résidus sérine, thréonine et tyrosine afin de réguler de nombreux processus cellulaires.

En se basant sur les données bibliographiques, nous nous sommes intéressés à l'implication de 4 phosphatases qui pourraient être candidates dans la déphosphorylation de la kinase Greatwall : Fcp1, PP1, PP2A, calcineurine.

## I. Fcp1

### A. Généralités

Fcp1 est une phosphatase capable de déphosphoryler l'ARN polymérase II. Elle déphosphoryle le domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II. Au cours du cycle de transcription ou pendant la terminaison de la transcription, la déphosphorylation du CTD doit avoir lieu afin de régénérer la forme non phosphorylée de l'enzyme qui va être recrutée sur des promoteurs. La CTD phosphatase a été purifiée à partir de cellules HeLa et à partir de *S. cerevisiae* (Chambers R S and Dahmus M E, 1994; Chambers et al, 1995 ; Chambers and Kane, 1996). L'activité de cette phosphatase CTD est stimulée par la sous-unité RAP74 du facteur de transcription TFIIF. Deux formes de FCP1 ont été décrites, FCP1a, qui code pour une protéine de 842 acides aminés, et un variant d'épissage plus court noté FCP1b. Une troisième forme de FCP1 humaine a ensuite été isolée et désignée comme FCP1 (Cho H et al, 1999). La comparaison des séquences entre FCP1 et FCP1a a montré que FCP1a représente une forme tronquée en N-terminal de 120 acides aminés, tandis que FCP1b est dépourvue des 139 derniers acides aminés de FCP1. Les séquences primaires des gènes de FCP1 humain et levure contiennent un motif appartenant à une famille de phosphatases qui agissent sur les esters de phosphate. Ce motif, FCPH (FCP homologie), est présent dans les résidus qui sont conservés parmi différentes phosphatases CTD, et au niveau d'autres protéines dont la fonction est encore inconnue. La protéine FCP1 a été classée comme étant une phosphatase de type 2C (résistant à l'acide okadaïque et nécessitant du  $Mg^{2+}$  pour son activité). Une autre caractéristique de FCP1 est la présence d'un domaine BRCT à l'extrémité C-terminale de la protéine et chevauchant partiellement la partie N-terminale impliquée dans l'interaction Fcp1-RAP74. Le gène de levure homologue, FCP1, interagit directement avec RAP74. Le domaine BRCT (correspond au C-terminal de BRCA1), d'abord identifié dans le cancer du sein par la suppression de protéine BRCA1, est un domaine conservé dans plus de 50 protéines, dont beaucoup présentent un rôle dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (Scully R and D.M. Livingstone, 2000; Majello and Napolitano, 2001) FCP1 est une protéine en forme de Y composée d'un domaine acylphosphatase situé à la base d'un profond sillon formé par un domaine hélicoïdal d'un côté et le domaine BRCT de l'autre (Ghosh et al, 2008).

## **B. Le rôle de Fcp1 *in vivo***

La protéine FCP1 a été initialement identifiée comme un partenaire d'interaction de RAP74 dans un crible double hybride chez la levure. L'interaction entre RAP74 et FCP1 implique des acides aminés conservés dans les séquences humaine et de levure. FCP1 chez la levure peut se lier avec la protéine RAP74 humaine et FCP1a humaine peut se lier avec la protéine RAP74 levure. Une interaction directe entre FCP1 levure et le facteur de transcription TFIIB a été démontrée. Les sites de liaison pour TFIIB sont très similaires aux sites de liaison pour RAP74. L'analyse précise des séquences protéiques de RAP74 et TFIIB révèle une courte séquence d'acides aminés conservée entre les deux protéines, suggérant une fonction biologique commune (Kobor M S et al, 2000). La constatation que FCP1 est essentielle pour la croissance de *S. cerevisiae* (Archambault J. et al, 1997 ; Kobor M S et al, 1999) souligne l'importance de FCP1 *in vivo*. En outre, cette observation suggère fortement que la déphosphorylation du CTD de la RNAPol-II est probablement une fonction essentielle dans la levure. Les expériences génétiques ont montré que le domaine BRCT est essentiel pour la viabilité dans ce modèle. En fait, l'intégrité de ce domaine a été démontrée comme essentielle pour FCP1 chez *S. cerevisiae* (Kobor M S et al, 2000). Les mutants par délétion dans la région BRCT ou une mutation ponctuelle d'un FCP1 ts (thermosensible) dans le domaine BRCT accumulent un excès de la forme hyperphosphorylée de la RNAPol-II, résultant en une perte de la viabilité (Kobor M S et al, 2000). Ces résultats démontrent que l'intégrité du domaine BRCT de FCP1 est essentielle pour la viabilité des cellules et pour l'activité de déphosphorylation du CTD *in vivo*. (Majello and Napolitano, 2001)

## **C. Fcp1, une phosphatase qui contrôle et déphosphoryle Ensa ?**

Récemment (Visconti et al, 2012), il a été montré que l'activité de phosphatase Fcp1 est nécessaire pour inactiver le complexe cdk1/cyclinB. La déplétion de Fcp1 empêche la sortie de mitose. La phosphorylation de Cdk par les kinases Wee1 et Myt1 a une fonction inhibitrice sur l'activité Cdk. Les auteurs montrent que Fcp déphosphoryle Wee1, ce qui induit l'inactivation de MPF. Comme nous l'avons vu précédemment, Fcp a été impliquée dans la déphosphorylation du CTD de la grande sous-unité de RNA-PolIII. En revanche, les résultats décrits dans ce travail montrent que Fcp1 contrôle MPF de manière indépendante de la transcription. En effet l'inhibition de la voie de transcription à partir de cellule Hela

n'affecte pas la sortie de mitose. Au cours de la mitose, les phosphatases PP1 et PP2AB55 sont inhibées respectivement par les kinases Cdk1-cyclineB et Gwl. Les auteurs proposent que Fcp1 permet l'inactivation de Cdk1-cyclineB, autorisant ainsi l'initiation de l'activation de PP1 et PP2AB55. Tout cela permet la sortie de mitose.

Plus récemment (Hégarat et al, 2014), il a été montré que dans les cellules HeLa, PP2A déphosphoryle Gwl sur le site Thr194, et Fcp1 contrôle la déphosphorylation de Arpp19/Ensa. Cela induit la sortie de mitose. (Hochegger, 2014) Par contre, l'autre laboratoire a montré que c'est PP2AB55 qui déphosphoryle Arpp19. Pendant la transition de mitose à l'interphase, Gwl est inactivée, cela permet PP2AB55 inactive Arpp19. Et il y a de plus en plus de PP2AB55 active afin qu'elle puisse déphosphoryler les substrats mitotiques, voire induise la sortie de mitose. (Williams et al, 2014)

## **II. Les protéines phosphatases de type 1**

### **A. Généralités**

Les phosphatases les plus nombreuses appartiennent à la famille PPP (PhosphoProtein Phosphatase) comprenant PP1, PP2A, PP2B, (aussi connue sous le nom de calcineurine ou calcium-calmodulin-regulated PP), PP4, PP5, PP6 et PP7. La deuxième famille des PPM (Protein Phosphatase  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  dependent) ne partage pas d'homologie de séquence avec la famille PPP et comprend des protéines phosphatases dépendantes du magnésium telles que la PP2C ou la phosphatase pyruvate déshydrogénase. La troisième famille comprend les Protéines Tyrosine Phosphatases, soit les PTPs (Barford, 1996, 1995; Shenolikar, 1994).

Les protéines phosphatases de type 1 constituent un groupe d'enzymes présentes chez tous les eucaryotes. Leur structure primaire est très bien conservée. Les PP1 holoenzymes sont composées d'une sous-unité très conservée qui s'appelle PP1c (proteín phosphatase 1 catalytic subunit). Les différences observées pour les PP1 entre les espèces ou au sein d'une même espèce se situent principalement dans les domaines N-terminal et C-terminal. Dans les cellules, la sous-unité catalytique de la PP1 est associée à des sous-unités "régulatrices" qui déterminent l'activité. Par exemple, en servant éventuellement de pseudosubstrats ou en induisant des changements conformationnels. Des sous-unités "régulatrices" déterminent

aussi la spécificité de substrat et/ou la localisation subcellulaire de la phosphatase. Sans cette interaction avec une autre sous-unité, la PP1-C ne montre pas de spécificité de séquence évidente et déphosphoryle plusieurs substrats *in vivo* et *in vitro* (Aggen et al, 2000; Ceulemans and Bollen, 2004). D'autre part, de nombreux inhibiteurs physiologiques de la PP1-C ont été identifiés principalement chez les eucaryotes supérieurs, comme les inhibiteurs I-1 et I-2. L'activité PP1 varie au cours du cycle cellulaire et les sous-unités catalytiques possèdent des sites dans leur domaine C-terminal.

Lors de la purification de la PP1-C, on ne trouve souvent qu'une seule sous-unité liée à la sous-unité catalytique, ce qui laisse supposer que la liaison à la PP1-C est mutuellement exclusive pour les différentes sous-unités régulatrices et que le ou les sites de liaison de ces sous-unités régulatrices sont identiques ou se chevauchent. Les différentes sous-unités régulatrices seraient ainsi en compétition pour la liaison avec la PP1-C (Aggen et al, 2000; Egloff et al, 1997). Toutefois, des holoenzymes multimériques ont été décrites (Ceulemans and Bollen, 2004).

Une petite séquence "consensus" est présente dans la plupart de ces sous-unités régulatrices. Elle est communément appelée "motif RVXF". Ce motif serait responsable de l'interaction avec la PP1-C et se distingue du site catalytique (Egloff et al, 1997). Il semble que ce motif serve de point d'ancrage pour la liaison initiale entre les deux sous-unités et promeut ainsi la liaison avec des sites secondaires (Ceulemans and Bollen, 2004). La séquence exacte de ce motif ne se retrouve pas dans toutes les sous-unités. Il a ainsi été suggéré que la séquence supposée d'interaction entre la PP1-C et ses sous-unités régulatrices pourrait correspondre en fait à deux acides aminés basiques suivis de deux résidus hydrophobes séparés par un acide aminé variable (Aggen et al, 2000). D'autres travaux ont proposé une définition différente de la séquence consensus. Par exemple, (R/K)(V/I)XF (Egloff et al, 1997). Dans la plupart des cas, des mutations de ce motif, lorsqu'il est présent, entraînent la perte d'interaction entre la PP1-C et la sous-unité régulatrice chez la levure comme chez les eucaryotes supérieurs (Egloff et al, 1997). Ce motif est également présent chez la plupart des inhibiteurs de la PP1-C.

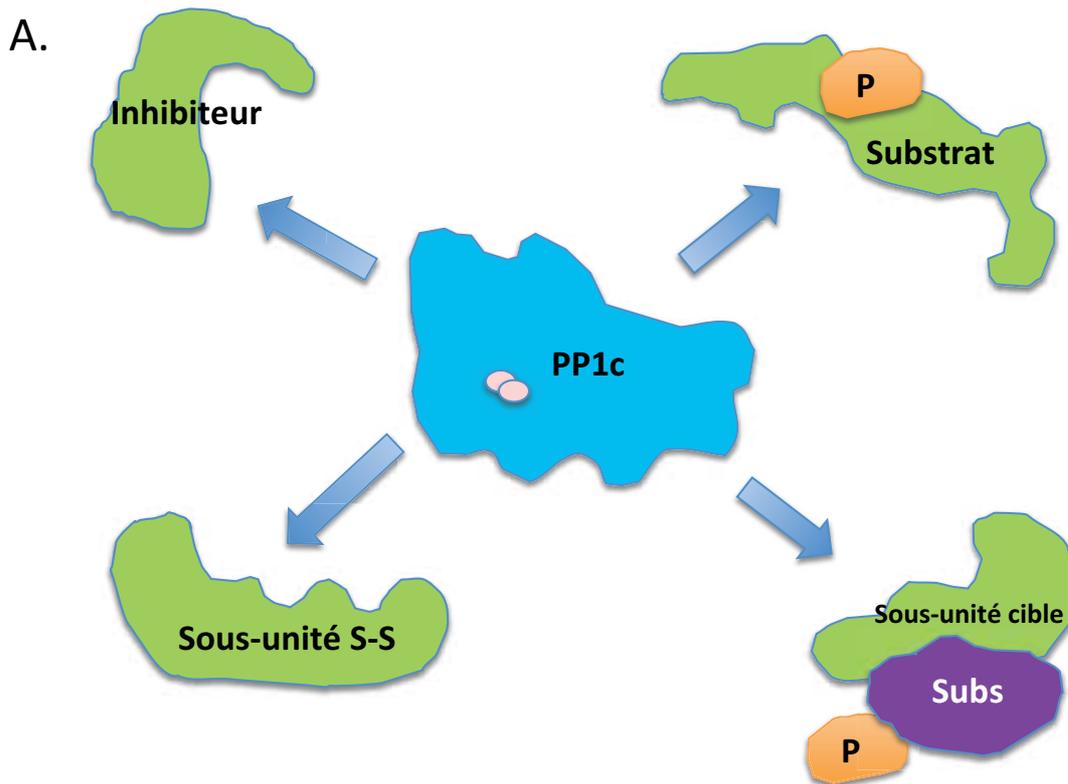
Les différents processus cellulaires contrôlés par la PP1 semblent être régulés par des holoenzymes PP1 distinctes dans lesquelles la même sous-unité catalytique est complexée à différentes sous-unités régulatrices selon le processus concerné. Les caractéristiques des

protéines régulatrices et des inhibiteurs de la PP1-C sont elles-mêmes modulables et modulées (Ludlow and Nelson, 1995).

## **B. La PP1 chez les mammifères**

Chez les mammifères, le génome humain comporte 3 gènes codant pour la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase de type 1. Il s'agit des gènes *PP1CA* codant pour l'isoforme  $\alpha$ , *PP1CB* codant pour l'isoforme  $\beta$  (également nommée isoforme  $\delta$ ), et *PP1CC* codant pour les isoformes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ . Ces deux dernières sont obtenues par épissage alternatif. Les isoformes sont fortement similaires et différentes surtout par leur domaine C-terminal (Andreassen et al, 1998). Même si leur caractérisation *in vitro* ne montre pas de différences significatives entre elles, elles semblent tout de même avoir des rôles et des cibles distincts *in vivo* puisque leurs localisations subcellulaires sont très différentes. En interphase, la PP1 $\alpha$  semble s'associer à la matrice nucléaire, alors que la PP1 $\gamma 1$  est présente au niveau du nucléole et que la PP1 $\delta$  est associée à la chromatine. Pendant la mitose, la PP1 $\alpha$  semble s'accumuler au niveau des centrosomes, la PP1 $\gamma 1$  au niveau du fuseau tandis que la PP1 $\delta$  est associée aux chromosomes (Andreassen et al, 1998). L'abondance relative des différentes isoformes dépend des tissus.

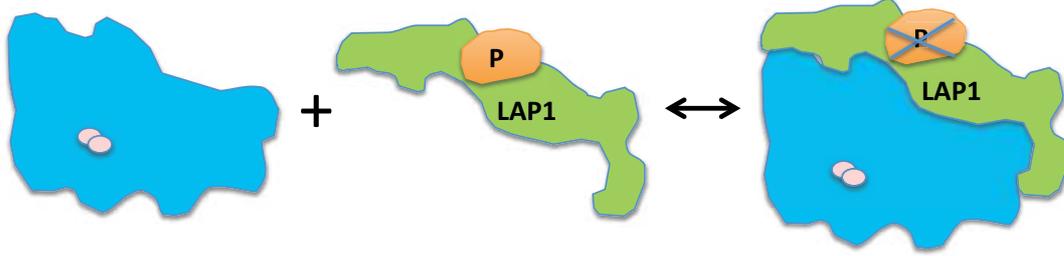
Les holoenzymes PP1 sont composées par une sous-unité catalytique hautement conservée qui s'appelle PP1c (protein phosphatase 1 catalytic subunit). Cette PP1-C est complexée avec un ou deux sous-unités régulatrices variables (Figure 11). La structure cristalline de PP1-C de mammifère montre que PP1 est une métalloenzyme avec deux ions métalliques divalents au centre du site catalytique,  $Fe^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  qui sont les ions les plus plausibles dans les enzymes natives (P.T. Cohen and Novel, 1997; E. Wozniak et al, 2000). Plus de 200 protéines interactrices/ régulatrices de PP1 ont été décrites et il est prévu que d'autres seront encore identifiées (E. Heroes et al, 2013; A. Hendrickx et al, 2009; S.L. Esteves et al, 2012; M. Fardilha et al, 2010; M. Fardilha et al, 2011; E.F. da Cruz e Silva et al, 2005). En effet, différentes sous-unités régulatrices spécifiques se lient avec PP1-C, cet effet détermine les fonctions de PP1 (Figure 11). Les protéines qui se lient avec PP1 (PIP pour PP1 binding proteins) peuvent être regroupées en quatre catégories fonctionnelles : les inhibiteurs de l'activité catalytique (inhibiteurs), les sous-unités substrat spécifique (SS), les sous-unités



### Figure 11 : Protéines régulatrices PP1.

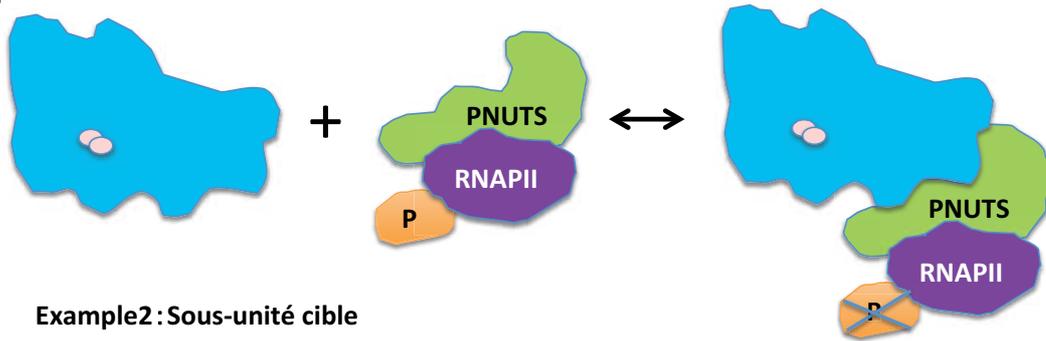
Différents types de protéines régulatrices PP1 sont indiqués : substrats, sous-unités cibles, inhibiteurs de l'activité catalytique et prescripteurs de substrats (sous-unité S-S). Exemples spécifiques sont montrés en B et C. B. LAP1 est un substrat de PP1. C. PNUTS est une sous-unités cible de PP1 et le complexe PNUTS:PP1 est capable de promouvoir la déphosphorylation de la Ser5 du domaine C-terminal (CTD) de RNAPII.

B.



Example1 : Substrat

C.



Example2 : Sous-unité cible

ciblées et les substrats (Figure 11A). (M. Bollen et al, 2010; M. Bollen et al, 2009). De nombreux substrats de PP1-C sont des protéines activées par la déphosphorylation, comme dans le cas de la focal adhesion kinase, de la lamina associated polypeptide 1, LAP1 (Figure 11B), de la E3 ubiquitine ligase et la caspase 2 (K. Sasaki et al, 1990). En revanche, certains substrats sont maintenus dans un état inactif suite à la déphosphorylation par PP1, comme NEK2, Aurora-A et C-Nap1 (Y.M. Kim et al, 2003). Certains substrats sont déphosphorylés spécifiquement sur un seul résidu, tandis que des autres sont déphosphorylés sur plusieurs résidus (M. Bollen et al, 2010).

De nombreux PIP intermédiennent le PP1 ciblé à compartiments subcellulaires spécifiques ou des complexes protéiques. Cela induit PP1 proximité à des substrats spécifiques (M. Bollen et al, 2010; H. Ceulemans et al, 2002). Par exemple, spinophilin dirige PP1 à dendritiques spines dans le cerveau, à des substrats potentiels proximité, l'intermédiaire de la régulation de la synaptique fonction de PP1 (P.B. Allen et al, 1997). PNUTS est une sous-unité ciblée de PP1. Récemment le domaine C-terminal (CTD) de RNAPolIII a été décrit comme étant le premier substrat des complexes PNUTS-PP1 (Figure 11C). L'inhibiteur nucléaire de PP1 (NIPP1) a d'abord été identifié comme un inhibiteur nucléaire de PP1-C, mais elle peut aussi cibler PP1 pour la déphosphorylation de la spliceosome-associated protein 155 (SAP155), mais cette dernière n'est pas un inhibiteur de PP1 (N. Tahuma et al, 2008). Certains PIP inhibent PP1 sélectivement lors de la déphosphorylation d'une sous-population de substrats comme la glycogène phosphorylase. Ainsi, ces protéines sont définies comme des spécificateurs de substrat, plutôt que comme des inhibiteurs. De plus, certains spécificateurs de substrat améliorent l'activité de PP1 vers des substrats de PP1, comme dans le cas de MYPT1. L'interaction entre MYPT1 et PP1 non seulement favorise la déphosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine, mais aussi diminue l'activité PP1 vers d'autres substrats. En fait, les vrais inhibiteurs de PP1 sont capables de bloquer le site actif de PP1 et inhibent la déphosphorylation de tous les substrats. I1 (Inhibitor-1) et DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) inhibent puissamment PP1-C lorsqu'elle est phosphorylée sur un résidu Thr, alors que l'activité de I2 (Inhibitor 2) et I3 (Inhibitor 3) ne nécessite pas pour de phosphorylation en particulier (M. Bollen et al, 2010; M. Bollen et al, 2001; H. Ceulemans and Bollen, 2004). Parfois, le substrat et l'inhibiteur de protéine ont été trouvés s'associant avec PP1 en même temps, formant un complexe trimérique (B. Lesage et al, 2007; R.T. Terry-Lorenzo et al, 2002).

Les protéines phosphatases de type 1 sont impliquées chez les cellules de mammifères dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'épissage, la transcription, la division cellulaire, la contraction musculaire, le métabolisme et l'apoptose (Ceulemans and Bollen, 2004; Ceulemans et al, 2002 ) et sont régulées à l'aide de sous-unités. Par exemple, les sous-unités G ciblent la PP1-C vers les particules de glycogène en particulier dans le muscle (sous-unité G<sub>M</sub>) et dans le foie (sous-unité G<sub>L</sub>), tandis que la sous-unité M<sub>110</sub> cible la PP1 vers la myosine, ce qui permet la régulation de la contraction musculaire et de la forme cellulaire. Le complexe PP1-C/M<sub>110</sub> comporte aussi une petite sous-unité M<sub>20</sub> et est régulé négativement par la phosphorylation de la sous-unité M<sub>110</sub> (Aggen et al, 2000; Ceulemans and Bollen, 2004). L'interaction avec les sous-unités régulatrices peut dépendre des isoformes. Chez les mammifères, un grand nombre d'inhibiteurs physiologiques de la PP1-C ont été identifiés. Les plus connus sont les inhibiteurs cytosomiques I-1 (Inhibitor-1) et I-2 (Inhibitor-2). I-1 doit être phosphorylée pour inhiber la PP1-C, alors que seule la forme déphosphorylée de I-2 peut inhiber la PP1-C (Aggen et al, 2000; Stark, 1996).

Dans les cas de dommages de l'ADN ou de stress répliatif, le rôle des PP1 n'est pas très clair même si quelques données ont pu être obtenues. Ainsi, la phosphorylation de la thréonine 320 des isoformes  $\alpha$  et  $\delta$ , thréonine située dans un site consensus des Cdk, disparaît suite à des radiations ionisantes de façon dépendante d'ATM. La phosphorylation de cette thréonine, atténue l'activité de la PP1. Les PP1 semblent donc être activées suite à un stress génotoxique via leur déphosphorylation (Guo et al, 2002). Par ailleurs, il a été montré que la sérine 15 de p53, phosphorylée par ATM/ATR après une irradiation UV, était principalement déphosphorylée par la PP1. GADD34 (Growth Arrest and DNA damage 34) pourrait être une sous-unité régulant négativement la PP1 pour cette fonction. En effet, il a été montré que GADD34 promouvait la phosphorylation et la stabilisation de p53 (Haneda et al, 2004). Enfin, on sait que la PP1 $\alpha$  interagit avec Brcal et la déphosphoryle *in vitro* et que sa surexpression atténue partiellement l'hyperphosphorylation de Brcal dépendante d'ATM observée après une irradiation  $\gamma$  *in vivo* (Liu et al, 2002). Ainsi, la PP1 semble avoir globalement un effet négatif sur les checkpoints de l'ADN, atténuant leur activation et/ou facilitant leur inactivation. Cette idée est confortée par des études menées chez d'autres eucaryotes supérieurs. En effet, chez le xénope, l'inhibition de Cdc25 par les checkpoints de l'ADN s'effectue principalement par la phosphorylation de sa sérine 287. La PP1 semble être responsable de la déphosphorylation de cette sérine, déréprimant ainsi Cdc25 au moment de l'entrée en mitose. (Margolis et al, 2003).

## **C. Les PP1 chez les autres organismes**

### **a. La PP1 chez *S. pombe***

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, il existe deux isoformes de la sous-unité catalytique de la PP1, qui sont codées par deux gènes : *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup>. Ces deux gènes ne sont pas essentiels mais la délétion des deux gènes est létale. Dis2 et Sds21 semblent avoir des fonctions partiellement redondantes (Ohkura et al., 1989).

Dis2 (« defective in sister chromatid disjoining 2 ») a tout d'abord été identifiée comme étant impliquée dans la séparation des chromatides sœurs au cours de la mitose via l'étude de l'allèle cryosensible *dis2-11* (Ohkura et al., 1988).

Dis2 est régulée en partie via une phosphorylation inhibitrice de sa thréonine 316. Cette phosphorylation a lieu exclusivement en mitose et pourrait être générée par la kinase Cdc2 (Ishii et al, 1996; Yamano et al, 1994). Sds21, quant à elle, ne semble pas être phosphorylée au cours du cycle (Yamano et al, 1994). La surexpression de *sds21*<sup>+</sup> ou de *dis2-T316A* est toxique contrairement à celle de *dis2*<sup>+</sup>, et empêche l'entrée en mitose (Ishii et al, 1996; Yamano et al, 1994). Cette toxicité pourrait s'expliquer par le fait que Dis2 est phosphorylée en cas de surexpression et donc inhibée, alors que Dis2-T316A et Sds21 ne peuvent pas l'être (Ishii et al, 1996; Yamano et al, 1994).

### **b. La PP1 chez *Saccharomyces cerevisiae***

Chez *S. cerevisiae*, *GLC7* (*GLyCogène 7*) est le seul gène codant pour la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase de type 1 (Feng et al., 1991). Il a tout d'abord été isolé via la recherche d'un homologue chez *S. cerevisiae* des gènes *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup> de *Schizosaccharomyces pombe* et nommé *DIS2S1* (criblage d'une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* à l'aide de sondes issues de la digestion des gènes *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup> codant pour les deux sous-unités catalytiques de la PP1 chez *S. pombe*) (Ohkura et al., 1989).

Glc7 a par la suite été impliquée dans de très nombreux processus cellulaires. Comme nous l'avons déjà souligné, les phosphatases semblent avoir des rôles moins spécifiques que les kinases et Glc7 en est un bon exemple. Elle intervient entre autre dans les voies permettant le maintien de l'intégrité cellulaire, la morphogenèse, les voies de répression par le glucose, la régulation de la liaison kinétochores/microtubules, la méiose, la sporulation, l'endocytose, la

traduction... (Garcia-Gimeno et al., 2003; Stark, 1996).

Glc7 semble être régulée principalement par des sous-unités régulatrices. La quantité de Glc7 et son activité sont stables au cours du cycle. Sa demi-vie est de 180 minutes (Nigavekar et al., 2002). Chez les mammifères, l'activité PP1 varie au cours du cycle et les sous-unités catalytiques possèdent des sites dans leur domaine C-terminal dont la phosphorylation inhibe l'activité de la phosphatase. Ces sites ne sont pas présents chez Glc7.

Les protéines phosphatases sont nécessaires pour la sortie de mitose, comme par exemple PP1. La sortie de mitose est caractérisée par la rupture du fuseau mitotique, la décondensation des chromosomes et la formation des structures interphasiques, en particulier l'enveloppe nucléaire. PP1 est nécessaire pour l'élimination des kinétochores, probablement par une déphosphorylation de la chromatine ou des kinétochores liés avec des substrats (Figure 11B) (M.J. Emanuele et al, 2008). De plus, il a été montré que l'inhibiteur I1 est requis pour la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse en régulant l'activité de PP1 et celle d'Aurora B (W. Wang et al, 2008). PP1 sous-unité régulatrice Repo-man (recruits PP1 onto mitotic chromatin at anaphase) et PNUTS sont nécessaires pour la décondensation de la chromatine. Repo-man a d'abord été mis en évidence dans le recrutement de PP1 $\gamma$  à la chromatine lors de l'anaphase. Lorsqu'elle est surexprimée, Repo-man recrute également PP1 $\alpha$  à la chromatine (L.Trinkle-Mulcahy et al, 2006). En particulier, le complexe PP1 $\gamma$  / Repo-man intervient dans la déphosphorylation de l'histone H3 à la fin de la mitose et régule Aurora B au niveau chromosomique (J. Qian et al, 2011). La déphosphorylation de l'histone H3 par PP1 semble être corrélée avec la décondensation des chromosomes dans le bourgeonnement de levure et chez les nématodes (J.Y. Hsu et al, 2000). PNUTS est ciblée pour reformer le noyau en télophase avec la décondensation de la chromatine et favorise la décondensation de la chromatine d'une manière PP1-dépendante (H.B. Landsverk et al, 2005). De plus, il a été montré que PP1 est impliquée dans la première étape des réassemblages de l'enveloppe nucléaire (NE) en stimulant le ciblage des vésicules de la membrane de la chromatine dans des extraits d'oeufs de Xénope (H. Ito et al, 2007). En outre, le réassemblage de la lamina nucléaire est médiée en partie par déphosphorylation de la lamine B (L.J. Thompson et al, 1997). La sous-unité régulatrice AKAP(A-kinase anchoring protein) 149 recrute PP1 à la NE, lors de l'assemblage de NE in vitro et favorise la déphosphorylation et la polymérisation de la lamine B (R.L. Steen et al, 2000). La sortie de mitose a également besoin de l'inactivation de Cdk1 par la dégradation de la cycline B et la déphosphorylation de Cdk1 et des autres

substrats de cette kinase. L'activité PP1 est réprimée au début de la mitose par la phosphorylation de la phosphatase PP1 par Cdk1, sur le résidu Thr320 (Y.G. Kwon et al, 1997) et en se liant à l'inhibiteur I1. L'inactivation de Cdk1 à la fin de la mitose, permet l'auto-déphosphorylation de PP1 qui induit l'activation partielle de PP1. PP1 est alors capable de déphosphoryler et d'inactiver I1, permettant l'activation complète de PP1. Il a été proposé qu'une fois PP1 activée, elle déphosphoryle toutes les phosphoprotéines mitotiques requises pour la sortie de mitose (J.Q. Wu et al, 2009). Cependant nous verrons que PP1 n'est pas la seule phosphatase requise pour déphosphoryler les substrats mitotiques. PP2AB55 a aussi un rôle important dans ce processus.

Un rôle de PP1 dans la régulation de la cytokinèse a également été suggéré (A. Fernandez et al, 1992 ; A. Cheng et al, 2000), conformément à la co-localisation de PP1 $\gamma$  et de la F-actine au sillon de clivage et au milieu du fuseau (L. Trinkle-Mulcahy et al, 2003). PP1 $\gamma$  a ainsi été trouvée au centre du midbody au cours de la cytokinèse (S.G. Zeitlin et al, 2001). Récemment, chez *S. pombe*, il a été montré que PP1 joue un rôle d'activatrice de PP2AB55 et de PP2AB56 à la sortie de mitose. Pendant la mitose, PP1 est inhibée par Cdk1/cyclineB, PP2AB55 est inhibée par kinase Gwl, et PP2AB56 est inhibée par kinase polo. Lors de la sortie de mitose, l'activité de Cdk1/cyclineB diminue légèrement, cela permet l'auto-déphosphorylation de PP1 sur le site T316 (équivalent du site T320 chez *Xénope*). Dès que PP1 est active, elle s'associe avec PP2AB55 et l'active. Une fois PP2AB55 activée, elle va déphosphoryler PP2AB56 sur son site d'inhibition. Enfin PP1 déphosphoryle PP2AB56 complètement. Ces 3 phosphatases sont ainsi activées et induisent la sortie de mitose (A. Grallert et al, 2015).

### III. PP2A

La famille des protéines phosphatases de type 2A (PP2A) représente une classe majeure de sérine/thréonine protéines phosphatases qui sont impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires tels que le développement, le contrôle du cycle cellulaire, la motilité cellulaire, la dynamique du cytosquelette, la prolifération, la survie cellulaire ainsi que la régulation de nombreuses voies de signalisation (Lechward et al, 2001; Mumby and Walter, 1993; Janssens and Goris, 2001; Virshup, 2000). La PP2A fut découverte dans les années 80 (Chernoff et al, 1983), et fut ensuite identifiée comme étant non pas une seule protéine, mais un large éventail de différentes combinaisons de protéines (Janssens and Goris, 2001). PP2A

est l'une des phosphatases les plus abondantes du règne eucaryote. Elle représente plus de 1% des protéines totales dans certains tissus et organes (cerveau) et compterait pour 80% des sérine/thréonine phosphatases totales, représentant donc une famille de phosphatases majeure du règne animal (Shi, 2009). En plus de leur fonction de sérine/thréonine phosphatases, la famille des protéines phosphatases de type 2A exhibe une activité phosphotyrosyl (pTyr) phosphatase *in vitro* (Chernoff et al, 1983; Silberman et al, 1984). Cependant, un possible rôle physiologique de cette activité de la PP2A n'a été que rarement décrit (Chen et al, 1992). Nous nous attacherons dans cette partie à étudier l'action de la PP2A en tant que sérine/thréonine phosphatase.

### **A. Structure des protéines phosphatases de la famille PP2A**

Les enzymes de la famille PP2A sont retrouvées *in vivo* sous la forme d'un dimère (PP2A<sub>D</sub>) ou d'un trimère (PP2A<sub>T</sub>) (Cohen, 1997; Zolnierowicz, 2000). Le dimère se compose d'une sous-unité catalytique de 36kDa (PP2A<sub>C</sub>) et d'une sous-unité d'aide à l'agencement spatial (scaffolding) de 65kDa appelée PR65 ou sous-unité A. Une troisième sous-unité régulatrice dont la nature peut varier peut se lier au "core" dimère (ou dimère de coeur) (Cohen, 1997; Zolnierowicz, 2000). Cet ensemble forme donc un complexe enzymatique hétérotrimérique. Il existe cependant une importante diversité de ces hétérotrimères due à l'existence de différentes isoformes de chacune des sous-unité du complexe, générant un grand nombre d'holoenzymes différentes de part leur nature, leur structure et leur fonction (Figure 12).

#### **a. La sous-unité catalytique C**

La sous-unité catalytique C de la PP2A est responsable de l'activité de la phosphatase. La structure de PP2A-C est hautement conservée à travers l'évolution (P. T. W. Cohen et al, 1990). Deux gènes codants pour deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la PP2A-C qui partagent 97% d'homologie chez les mammifères (Arino et al, 1998; Green et al, 1987; Khew-Goodall et al, 1991; Stone et al, 1987). Chez l'homme, le gène codant pour l'isoforme  $\alpha$  se situe sur le locus 5q23-q31 tandis que celui codant pour l'isoforme  $\beta$  se situe au locus 8p12-p11 (Jones et al, 1993). Les deux isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire, mais de façon plus

Sous-unités	Loci	Isoformes
B B55/PR55/PPP2R2	8p	$\alpha$
	5q31-q33	$\beta$
	4p16	$\gamma$
		$\delta$
B' B56/PR61/PPP2R5	1q41	$\alpha$
	11q13	$\beta$
	3p21	$\gamma$
	6q21.1	$\delta$
	14q23.1	$\epsilon$
B'' PR71/PPP2R3		PR48
		PR59
	3q	PR72
		PR130
B'''		PR93/SG2NA
		PR110/Striatine

**Figure 12: Classification des sous-unités de la PP2A.**

importante dans le coeur et le cerveau. Cependant, PP2A-C $\alpha$  est environ dix fois plus abondante que l'isoforme  $\beta$  (Khew-Goodall and Hemmings, 1988). L'expression du gène codant pour PP2A-C $\alpha$  est 7 à 10 fois plus importante que celle du gène codant pour la sous-unité  $\beta$ , ce qui pourrait expliquer la différence d'expression des protéines issues des deux isoformes (Khew-Goodall et al, 1991). En dépit de leur 97% d'homologie de séquence, les souris KO pour PP2A-C $\alpha$  ne sont pas viables. Elles meurent au cours des premiers jours du développement embryonnaire indiquant que PP2A-C $\beta$  ne peut pas compenser l'absence de l'isoforme  $\alpha$ , en tout cas à ce stade du développement (Götz et al, 1998). L'expression de PP2A-C est régulée de façon extrêmement précise afin d'assurer aux cellules le maintien d'un taux de protéine constant, ce qui a pour conséquence des difficultés considérables pour surexprimer la protéine. En effet, il est extrêmement difficile de surexprimer la protéine PP2A-C fonctionnelle dans les cellules de mammifères (Green et al, 1987). Aussi, malgré la possibilité de stabiliser la protéine dans la cellule sous une forme active et fonctionnelle via un vecteur d'expression permettant l'ajout d'un tag-HA en région N-terminale de la séquence protéique, il n'est pas possible de surexprimer la protéine de façon stable (Wadzinski et al, 1992). En dépit de l'augmentation du taux des messagers de PP2A-C suite à sa surexpression, le niveau protéique, lui, reste constant. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme d'autorégulation du contrôle de l'expression de PP2A-C agissant au niveau traductionnel et non transcriptionnel (Baharians and Schönthal, 1998).

## **b. La sous-unité structurale PR62/A**

La sous-unité A (PR65) de la protéine phosphatase A est une sous-unité structurale qui s'associe intimement à la PP2A-C pour former un dimère d'ancrage auquel peut se lier la sous-unité B régulatrice adéquate. Le dimère PP2A<sub>D</sub> peut être retrouvé sous cette forme ou lié à une troisième sous-unité qui peut varier. Le dimère peut lier différentes sous-unités régulatrices via des sites identiques ou chevauchants de la sous-unité A du "core" dimère, rendant leur interaction mutuellement exclusive (Ruediger et al, 1994, 1992). Comme pour la sous-unité C, il existe deux isoformes de la PP2A-A,  $\alpha$  et  $\beta$ , codées par deux gènes et qui partagent 86% d'identité de séquence. Ces deux isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire (Hemmings et al, 1990). Excepté pour le xénope, l'isoforme  $\alpha$  est retrouvée de façon plus abondante (Hendrix et al, 1993). Chez le xénope, le messager de l'isoforme  $\beta$  est fortement exprimé dans les ovaires durant l'ovogenèse, la maturation méiotique et la

fécondation jusqu'à l'étape 35 de l'embryogenèse (Bosch et al, 1995). L'isoforme A  $\beta$  diffère de l'isoforme  $\alpha$  par une extension de 12 acides aminés situés à l'extrémité N-terminale. Cette extension semble avoir été acquise au cours de l'évolution étant donné qu'on la retrouve chez la Souris et le Porc mais pas chez le xénope. Les deux isoformes sont exprimées de façon constante au cours du cycle cellulaire avec un niveau d'expression plus important pour A  $\alpha$  comparé à A  $\beta$  dans les cellules et tissus testés suggérant que ces deux isoformes jouent des fonctions différentes (Zhou et al, 2003).

PP2A-A est composée de 15 motifs HEAT (Huntingtin-Elongation-A subunit Target of rapamycin) de 39 acides aminés répétés en tandem et riches en leucine (Hemmings et al, 1990). Chaque motif HEAT comprend une paire d'hélices  $\alpha$  antiparallèles. La structure cristallographique de la PP2A-A révèle que l'empilement de ces motifs répétés confère à la protéine une stabilité de structure avec une architecture en forme de "crochet" ou "fer à cheval" (Groves et al, 1999). Ainsi, grâce à ses propriétés structurales, la sous-unité A possède une conformation relativement flexible qui permet de maintenir la structure de l'holoenzyme (Cho and Xu, 2007; Xu et al, 2006).

Cependant, des travaux de Turowski et ses collaborateurs indiquent que PP2A-A  $\alpha$  peut stimuler l'activité de PP2A-C *in vitro* lorsque les essais phosphatases sont réalisés en présence de polycations indiquant que PP2A-A pourrait en plus de son rôle d'ancrage moduler les propriétés enzymatiques de la phosphatase (Turowski et al, 1997).

### **c. Les sous-unités régulatrices B**

Les sous-unités B de la protéine phosphatase 2A sont nombreuses et peuvent être classées en familles. Jusqu'à ce jour, quatre familles de sous-unités régulatrices de PP2A ont été identifiées. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de similarité de séquences entre ces quatre familles de sous-unités régulatrices, et cela même entre les sous-unités qui reconnaissent les mêmes segments de PP2A-A. Les niveaux d'expression des sous-unités régulatrices diffèrent fortement en fonction du type cellulaire et des tissus étudiés. A cet égard, les sous-unités régulatrices déterminent la spécificité du substrat ainsi que les fonctions spatio-temporelles de la PP2A.

#### **1. La famille B/B55 ou PR55**

Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de cette sous-unité de 55kDa codées par quatre gènes, PR55 $\alpha$ , PR55 $\beta$ , PR55 $\gamma$  et PR55 $\delta$ , lesquels sont exprimés de manière tissu-spécifique. Les isoformes PR55 $\alpha$  et PR55 $\delta$  sont exprimées de façon uniforme dans tous les tissus alors que les isoformes PR55 $\beta$  et PR55 $\gamma$  sont enrichies dans le cerveau (Healy et al, 1991; Mayer et al, 1991; Strack et al, 1999; Zolnierowicz et al, 1994).

La famille PR55 possède du point de vue structural sept répétitions WD-40 dégénérées. Ces répétitions WD-40 sont des séquences minimales d'une quarantaine d'acides aminés qui se terminent par deux résidus tryptophane (W) et aspartate (D). Ces séquences joueraient un rôle dans les interactions protéine-protéine (Neer et al, 1994; Janssens and Goris, 2001). Contrairement aux autres sous-unités régulatrices, la sous-unité B de la PP2A peut former un complexe relativement stable avec la PP2A-A sans la PP2A-C (Ruediger et al, 1994). Comme nous l'avons déjà vu précédemment et le développerons plus en détail par la suite, cette famille est impliquée dans la régulation de la mitose. Chez la levure, Cdc55 (B55 humaine) est essentielle pour la cytokinèse où la mutation ou la délétion de Cdc55 induit un blocage partiel de la réparation des cellules (Healy et al, 1991). Une implication de certains membres de cette famille (B $\alpha$ , B $\delta$ , B' $\alpha$  et B'' $\gamma$ ) a récemment été soulignée dans le contrôle de la réparation par recombinaison homologue des cassures double-brins au cours de dommages à l'ADN (Kalev et al, 2012).

## 2. La famille B'/B56 ou PR61

La famille B' contient cinq isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  codées par cinq gènes différents (Csortos et al, 1996; McCright and Virshup, 1995; B McCright et al, 1996; Brent McCright et al, 1996; Nagase et al, 1997; S et al, 1996; Tanabe et al, 1996; Tehrani et al, 1996). De plus, le gène humain B'  $\beta$  code pour deux isoformes  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2. Il existe également au moins trois différents variants d'épissage de la forme humaine de B'  $\gamma$  (Csortos et al, 1996). Cependant, malgré cette importante diversité, tous les membres de la famille B' contiennent une région centrale hautement conservée où ils partagent 80% d'identité de séquence suggérant un rôle possible de cette région centrale dans l'interaction avec le dimère de coeur PP2A<sub>D</sub>. Les extrémités N et C-terminales qui sont elles moins conservées seraient impliquées dans la spécificité du substrat ou la localisation cellulaire : nucléaire pour PR61 $\gamma$ 1, PR61 $\gamma$ 2, PR61 $\gamma$ 3 et cytoplasmique pour PR61 $\alpha$ , PR61 $\beta$  et PR61 $\epsilon$ , à la fois nucléaire et cytoplasmique pour PR61 $\delta$ . Excepté PR61 $\gamma$ 1, toutes ces isoformes sont des phosphoprotéines (Brent McCright et

al, 1996). Ces isoformes sont exprimées de façon tissu-spécifique. PR61 $\alpha$  et PR61 $\gamma$ 1- $\gamma$ 3 sont exprimées de façon abondante dans le coeur et le muscle squelettique (McCright and Virshup, 1995; Tehrani et al, 1996) tandis que PR61 $\beta$  et PR61 $\delta$  sont surtout retrouvées dans le cerveau (Csontos et al, 1996; McCright and virshup, 1995).

L'holoenzyme PP2A-B' joue un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire au travers de sa liaison directe à la protéine Shugoshin, requise pour la protection des centromères par la déphosphorylation des cohésines et la ségrégation correcte des chromosomes (Kitajima et al, 2006; Riedel et al, 2006; Tang et al, 2006).

### 3. La famille B'' ou PR48/PR59/PR72/PR130

La sous-unité PR72 fut clonée à partir d'une banque de muscle cardiaque tandis que PR130 fut isolée à partir d'une banque de cerveau humain. Il fut alors suggéré que ces deux sous-unités qui diffèrent de part leur extrémité N-terminale soient des variants d'épissage d'un même gène. PR72 est exclusivement exprimée dans le coeur et le muscle squelettique tandis que PR130 est détectée dans la plupart des tissus analysés mais de façon plus importante dans le coeur et le muscle (Mayer et al, 1991). PR59 et PR48 furent identifiées plus tard par une approche de criblage en double hybride (Voorhoeve et al, 1999; Yan et al, 2000). PR59 partage 56% d'identité avec PR72 mais son expression varie beaucoup de cette dernière. En effet, PR59 est retrouvée dans les testicules, les reins, le foie, le cerveau, le coeur et le poumon mais pas dans le muscle squelettique. De façon intéressante, la surexpression de PR59 entraîne une inhibition de la progression du cycle cellulaire avec l'accumulation des cellules en G1 (Voorhoeve et al, 1999). PR48 partage quant à elle 68% d'homologie avec PR59 et fut identifiée comme partenaire de la protéine Cdc6, une protéine qui est requise pour l'initiation de la réplication de l'ADN. Cdc6 semble être un substrat de l'holoenzyme PP2A-PR48 (Yan et al, 2000). Tout comme pour PR59, la surexpression de PR48 provoque l'arrêt des cellules en phase G1 en maintenant Cdc6 sous sa forme déphosphorylée, un prérequis pour la liaison aux origines de réplication.

### 4. La famille B''' ou PR93/PR110

Deux nouveaux membres formant la famille B'''' furent identifiés grâce à un épitope commun aux membres de la famille B' : la striatine (PR110) et l'auto-antigène nucléaire S/G2 (PR93). Ils contiennent tous deux des motifs WD-40 répétés et interagissent avec le dimère "core"

PP2A<sub>D</sub>. Ces deux protéines se lient également à la calmoduline de façon calcium-dépendante et pourraient ainsi jouer un rôle de protéines d'ancrage dans la signalisation dépendante du calcium (Moreno et al, 2000).

## **B. Régulation de la PP2A**

Nous avons vu précédemment que l'expression des différentes sous-unités de la PP2A est régulée de façon précise. Aussi, certaines de ces sous-unités ont leur expression régulée de façon développementale. Par exemple chez le xénope, les sous-unités régulatrices PR55 et PR65 observent des niveaux d'expression qui diffèrent selon le stade développemental (Bosch et al, 1995). Des messagers isolés à partir de cerveaux de rats indiquent quant à eux que les sous-unités régulatrices B $\beta$  et B $\gamma$  sont développementalement régulées avec une diminution de B $\beta$  et une augmentation du niveau de B $\gamma$  tout juste après la naissance (Dagda et al, 2003).

### **a. Par la composition propre de l'holoenzyme**

Comme vous venons de le voir précédemment, l'holoenzyme PP2A peut être composée de différentes combinaisons de sous-unités C, A et B, générant potentiellement plus de 70 combinaisons différentes.

Un premier niveau de régulation réside dans le fait que les sous-unités régulatrices de la PP2A peuvent adresser le complexe vers différents composants tissulaires et subcellulaires de part leur propre localisation (Nagase et al, 1997; Strack et al, 1998).

Aussi, l'existence de différentes sous-unités régulatrices permet de conférer à l'holoenzyme une spécificité de substrat au moins *in vitro* et probablement *in vivo* (Agostinis et al, 1990, 1987). Enfin, l'activité de PP2A vis-à-vis de ses substrats peut être modulée *in vitro* par l'intervention de sous-unités additionnelles à l'hétérotrimère comme c'est le cas de l'héparine ou la protamine par exemple (Kamibayashi et al, 1994).

### **b. Par des modifications post-traductionnelles**

L'activité de la PP2A peut être régulée par deux types de modifications post-traductionnelles : la phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine ou la méthylation.

## 1. Phosphorylation

*In vitro*, la sous-unité catalytique de la PP2A peut être phosphorylée sur un résidu tyrosine (Y307) situé sur sa partie conservée C-terminale par différentes protéines tyrosines kinases. Cette phosphorylation conduit à l'inactivation de l'enzyme et peut être accentuée en présence d'acide okadaïque, suggérant une possible réactivation de la phosphatase par auto-déphosphorylation de la PP2A sur ce résidu et que la PP2A peut agir en tant que phosphotyrosine phosphatase (Chen et al, 1992). *In vivo*, la phosphorylation de la PP2A sur résidu tyrosine en réponse aux facteurs de croissance ou à l'insuline entraîne l'inhibition de l'enzyme (Begum and Ragolia, 1999, 1996; Chen et al, 1994; Guy et al, 1995; Srinivasan and Begum, 1994). PP2A-C peut également subir *in vitro* des phosphorylations sur résidus thréonines encore non-identifiés donnant lieu à l'inactivation non seulement de l'activité sérine/thréonine (Guo and Damuni, 1993), mais également de l'activité tyrosine de PP2A (Damuni et al, 1994; Guo and Damuni, 1993). Là aussi, la phosphatase peut se réactiver par auto-déphosphorylation.

Les sous-unités régulatrices de PP2A sont quant à elles aussi sujettes à la phosphorylation, et en particulier les membres de la famille B'. PR61δ est phosphorylée *in vitro* par PKA ce qui modifie la spécificité du substrat à l'enzyme sans se dissocier du dimère (Usui et al, 1998). PR61α quant à elle, peut être phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par PKR (Double-stranded-RNA-dependent protein kinase). Contrairement à la phosphorylation de la PP2A-C, cette modification entraîne l'activation de l'holoenzyme (Xu and Williams, 2000).

## 2. Méthylation

La séquence conservée TPDYFL<sup>309</sup> de la sous-unité catalytique de la PP2A contient en plus de la tyrosine<sup>307</sup> un motif de reconnaissance de carboxy-méthylation (Lee and Stock, 1993; Xie and Clarke, 1994a, 1993). La leucine<sup>309</sup> de ce motif conservé est méthylée par une méthyltransférase conservée, la LCMT (Leucine Carboxyl MethylTransferase) (De Baere et al, 1999; Lee and Stock, 1993). La méthylation qui en résulte est réversible *in vivo* par l'action d'une méthylestérase elle aussi conservée, la PME-1 (Phosphatase MethylEsterase)(Lee et al, 1996; Xie and Clarke, 1994b). L'effet de la méthylation est

controversé dans la littérature, donnant lieu à des résultats contradictoires autour du fait que cette méthylation augmente l'activité de la phosphatase, l'inhibe, ou encore n'affecte pas son activité (Bryant et al, 1999; De Baere et al, 1999; Favre et al, 1994; Ikehara et al, 2007; Xie and Clarke, 1994b; Zhu et al, 1997). La méthylation de PP2A-C subit des variations en fonction des phases du cycle cellulaire suggérant un rôle critique dans la régulation du cycle (Lee and Pallas, 2007; Turowski et al, 1995). Cependant, il apparaît de plus en plus que la carboxy-méthylation réversible de PP2A-C pourrait affecter d'autres caractéristiques de PP2A et en particulier la liaison des sous-unités régulatrices au dimère PP2A<sub>D</sub>. La méthylation constituerait un pré-requis pour la liaison de la sous-unité régulatrice quelle que soit la famille dont elle est issue (Bryant et al, 1999; Tolstykh et al, 2000). Les changements de l'état de méthylation de la PP2A réguleraient la formation des différents complexes constitués par l'enzyme et modifieraient par conséquent la spécificité de l'holoenzyme dans les cellules (Mumby, 2001; Wu et al, 2000). Plus récemment, il a été montré que la dérégulation de la méthylation de la PP2A est liée à la maladie d'Alzheimer. Quand elle est hyperphosphorylée, la protéine Tau a tendance à entraîner la formation de plaques amyloïdes, signature de la maladie d'Alzheimer (pour revue: Goedert and Spillantini, 2006). Le dysfonctionnement de la PP2A serait à l'origine de l'hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau (Gong et al, 2000; Liu et al, 2005; Sontag et al, 2004)

### ***C. Rôle de la PP2A au cours du cycle cellulaire***

#### **a. Transition G1/S**

La surexpression de la sous-unité régulatrice PR59 de la PP2A conduit à un arrêt des cellules en phase G1 via la déphosphorylation de la protéine p107 (Voorhoeve et al, 1999). Aussi, la sous-unité régulatrice PR48 a pour substrat une protéine qui compose le complexe de pré-réplication, la protéine Cdc6. Là aussi, la surexpression de PR48 conduit à l'arrêt des cellules en phase G1 (Yan et al, 2000) ce qui suggère un rôle de la PP2A dans l'initiation de la réplication. Dans ce sens, des expériences dans des extraits d'ovocytes de xénope ont montré que l'immunodépletion de la PP2A inhibe de façon significative la réplication de l'ADN alors que les fourches de réplifications préalablement établies continuent à répliquer suggérant un rôle de PP2A dans l'initiation et non l'élongation de la réplication et cela sans affecter la mise en place du complexe pré-réplcatif (Pre-RC). Pour ce faire les auteurs ont utilisé un anticorps monoclonal (6F9) dirigé contre la partie N-terminale de la sous-unité A de la PP2A

(Kremmer et al, 1997) mais qui semble également immunoprécipiter la sous-unité C et les sous-unités régulatrices de la PP2A (Lin et al, 1998). Chou et ses collaborateurs démontrèrent plus tard que la déplétion de PP2A semble affecter plus précisément la liaison de la protéine Cdc45 au complexe pré-répliatif (Chou et al, 2002).

### **b. Transition G2/M**

L'implication de la PP2A dans la transition G2/M a dans un premier temps été suggérée par des expériences dans les ovocytes de xénope (Goris et al, 1989) ou d'étoile de mer (Picard et al, 1989). L'injection d'acide okadaïque dans les ovocytes induit la formation de MPF actif et entraîne par conséquent la maturation méiotique. De plus, l'activation de Cdk1 est obtenue avec l'utilisation dans des extraits d'ovocyte de xénope de l'acide okadaïque mais pas des inhibiteurs spécifiques de PP1, suggérant que l'activité de PP2A mais pas de PP1, est requise pour le maintien du MPF dans sa forme inactive (Félix et al, 1990).

Au cours de la phase G2, la PP2A-B55, l'hétérotrimère qui déphosphoryle les substrats de Cdk1/cycline B, est active. En plus des substrats mitotiques de Cdk1/cycline B, la PP2A-B55 a aussi pour cible la phosphatase Cdc25C et les kinases Wee1 et Myt1, régulateurs du MPF (Castilho et al, 2009 ; Mochida et al, 2009). La phosphatase PP2A-B55 doit donc être inactivée pour permettre l'activation du MPF. La kinase Greatwall inhibe la PP2A-B55 afin de l'empêcher de déphosphoryler les substrats mitotiques du complexe Cdk1/cycline B, ce qui permet de promouvoir l'entrée et la progression de mitose (Vigneron et al, 2009). La régulation de l'activité de PP2A par Greatwall est essentielle pour le respect d'un timing correct de l'entrée en mitose. En effet, si la phosphatase est inhibée de façon prématurée en l'absence d'un complexe Cdk1/cycline B actif, une activité basale du complexe Cdk1/cycline B promeut l'entrée d'un état mitotique aberrant accompagné d'une phosphorylation partielle des substrats mitotiques (Lorca et al, 2010).

Pendant la progression mitotique l'activité de PP2A doit être inhibée alors qu'à la sortie de mitose, elle doit être réactivée afin de promouvoir la déphosphorylation des substrats mitotiques du complexe Cdk1/cycline B (Castilho et al, 2009 ; Vigneron et al, 2009). Ces résultats mettent en exergue l'importance de la régulation de l'équilibre entre les activités de la kinase mitotique Cdk1/cycline B d'une part et de la phosphatase PP2A-B55 d'autre part dans les processus d'entrée et de sortie de mitose.

## IV. La calcineurine

### **A. Structure**

La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase initialement décrite par Klee et Krinks en 1978 (Klee and Krinks, 1978). Au niveau structural, la calcineurine est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique d'environ 59 kDa, la calcineurine A et d'une sous-unité régulatrice d'environ 19 kDa, la calcineurine B.

L'activité phosphatase de la calcineurine est localisée au niveau de la sous-unité catalytique, ou CaN A. En plus du domaine phosphatase, cette sous-unité contient un domaine de liaison à la sous-unité régulatrice (domaine BHH), un domaine de liaison à la calmoduline et un domaine permettant l'interaction avec le  $Ca^{2+}$ . La sous-unité régulatrice contient elle deux domaines globulaires de liaisons au  $Ca^{2+}$ , permettant chacun la fixation de deux ions  $Ca^{2+}$ , soit 4 sites de fixation.

### **B. Localisations et rôles de la calcineurine**

La calcineurine est une protéine localisée dans de nombreux organes indépendants du système immunitaire. Les isoformes ainsi que leur quantité varient selon les tissus, notamment au niveau du cerveau où elle est 10 à 20 % plus exprimée dans certaines zones comme le striatum et l'hippocampe. Les sous-unités A et B ont également été mises en évidence dans de nombreux autres tissus tels que les lymphocytes B et T (Jiang et al, 1997), les ostéoclastes (Awumey Emet al, 1999), les cellules de la glande surrénale (Papadopoulos et al, 1989), le foie (Hanley RM et al, 1987), les poumons, le pancréas, le cœur, les cellules musculaires, les testicules, (Su Q et al, 1995), les plaquettes, la thyroïde, les reins (Tumlin JA, 1997), ou encore la rétine (Seitz DP et al, 2002). Elle est également présente au niveau cardiaque ou elle participe au développement de pathologies comme l'hypertrophie cardiaque (Wilkins BJ and Molkentin JD, 2004).

Dans le rein, plusieurs groupes se sont intéressés à la localisation de la calcineurine A. Il a été mis en évidence que l'isoforme  $A\alpha$  est la forme prédominante dans le tubule proximal, alors que l'isoforme  $A\beta$  n'est que peu exprimée. Au niveau des tubules collecteurs corticaux, les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont exprimées de manière similaire alors que dans les tubules collecteurs médullaires, c'est principalement l'isoforme  $\beta$  qui est retrouvée. Enfin, il a été mis en évidence une activité de la calcineurine dans les cellules mésangiales glomérulaires (Gooch JL et al, 2004; Gooch JL, 2006).

### ***C. Régulation de l'activation de la calcineurine***

Dans les cellules au repos, la calcineurine est sous forme d'un hétérodimère inactif composé de la sous-unité A et de la sous-unité B. À ce niveau, deux des quatre sites de liaisons au  $\text{Ca}^{2+}$  de la sous-unité B sont occupés par des molécules de  $\text{Ca}^{2+}$ , même en présence d'une très faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Les deux autres sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  nécessitent une concentration plus élevée en  $\text{Ca}^{2+}$ , de l'ordre du micromolaire. (Stemmer PM and Klee CB, 1994; Feng B and Stemmer PM, 1999; Feng B and Stemmer PM, 2001).

Le mécanisme d'activation de ce complexe dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  mais aussi de la présence de la calmoduline (CaM). L'élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  consécutive à un stimulus induit à la fois une activation de la CaM, mais également la fixation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur les deux sites libres de la CaN B. Ce mécanisme entraîne un changement conformationnel de la calcineurine, et une exposition du site de liaison à la CaM de la sous-unité A permettant ainsi la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . S'ensuit alors une dissociation du domaine auto-inhibiteur de la sous-unité catalytique et une libération du site actif de l'enzyme (Feng B and Stemmer PM, 2001; Yang SA and Klee CB, 2000). Dans ce processus, le rôle de la CaN B reste encore mal connu mais sa présence et sa fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  aurait plutôt un rôle structural que directement régulateur (Stemmer PM and Klee CB, 1994).

Plusieurs protéines endogènes ont été montrées comme inhibiteurs ou régulateurs de la calcineurine. C'est le cas des protéines de la famille RCANs (Regulators of Calcineurin), d'abord identifiés comme inhibiteurs, dont on sait maintenant qu'ils ont un rôle double sur la calcineurine, pouvant ainsi l'activer ou l'inhiber selon leur état de phosphorylation (Hilioti Z and Cunningham KW, 2003; Hilioti Z et al, 2004). Au niveau neuronal, d'autres protéines comme AKAP79 participent à la signalisation de la calcineurine en assurant son adressage à la membrane post-synaptique (Dell'acqua ML et al, 2002; Oliveria SF et al, 2003).

## **V. Les extraits d'ovocyte de xénope comme modèle d'étude**

Les étapes de développement précoce des ovocytes de xénope ont fourni un système particulièrement puissant pour l'étude des caractéristiques induisant l'entrée, la progression d'une cellule, et la sortie d'une cellule en mitose.

Il est possible de préparer des extraits acellulaires d'ovocytes de xénope caractéristiques de différentes phases du cycle cellulaire à partir desquels on peut étudier les événements moléculaires et biochimiques du cycle. Cela permet de travailler à partir d'une grande quantité de matériel parfaitement synchrone mais aussi de pouvoir appauvrir voire d'éliminer certaines protéines de ces extraits par des expériences d'immunodéplétion, ou encore de leur ajouter des protéines ectopiques ou diverses substances afin d'étudier leur effet au cours d'une phase particulière du cycle.

Pendant l'ovogenèse, l'ovocyte se bloque en prophase de méiose I, un arrêt assimilable à une phase G2 du cycle cellulaire où le MPF est maintenu à l'état inactif de pré-MPF. Il est en effet phosphorylé sur la thréonine 161 mais aussi sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdk1. La phosphatase Cdc25C va s'activer en réponse à une stimulation hormonale (progestérone) et va déphosphoryler ces deux résidus inhibiteurs du MPF, provoquant son activation brusque, ce qui entraîne la rupture de la vésicule germinative (GVBD). L'activité du MPF va chuter suite à l'émission du premier globule polaire et à la dégradation des cyclines. Cependant, un faible niveau d'activité persiste afin d'éviter un retour en interphase répllicative. Les cyclines sont ensuite néo-synthétisées, entraînant une réactivation du MPF. L'ovocyte s'engage alors dans le second cycle méiotique et reste bloqué en métaphase II jusqu'à la fécondation. Durant cet arrêt, l'activité du MPF est élevée, maintenue par l'action d'un facteur nommé CSF pour CytoStatic Factor. A partir de ces ovocytes, il est possible d'isoler par centrifugation une fraction cytoplasmique qui possède un grand nombre des caractéristiques mitotiques d'une cellule. Cette fraction est appelée extrait CSF. Si l'on incube de la chromatine extraite de spermatozoïds de xénope dans ce type d'extraits, l'ADN se condense (Murray and Kirschner, 1991). Dans ces extraits, le complexe Cdk1/cycline B est actif et tous les substrats de cette kinase sont phosphorylés. De plus, cet extrait présente la plupart des propriétés d'une cellule mitotique et il peut donc être utilisé pour l'étude des mécanismes requis pour le maintien de la mitose.

Il est possible de provoquer la sortie de méiose de l'extrait. Pour cela, il suffit d'ajouter du calcium à l'extrait CSF, ce qui va induire une dégradation de la cycline B et donc une inactivation du complexe Cdk1/cycline B et une déphosphorylation des substrats de cette kinase (Castro et al, 2006). Dans ce type d'extrait, l'ADN se décondense et pourra être répliqué, signe d'un passage de cet extrait à l'état interphasique. Ce type d'extrait est utilisé pour étudier les événements qui ont lieu en sortie de phase M.

Un deuxième type d'extrait interphasique est obtenu à partir d'ovocytes arrêtés en métaphase II de méiose puis activés par l'addition d'un ionophore calcique. Dans ce cas, l'ovocyte sort de méiose et synthétise de la cycline B. Les oeufs sont cassés environ 40 minutes après activation ce qui permet d'avoir une synthèse de cycline B proche de celle requise pour l'entrée en mitose. Cet extrait possède un stock de cyclines mais qui ne permettent pas d'induire l'entrée en mitose à moins de rajouter à l'extrait un élément pour déclencher le processus. Cette propriété permet d'étudier la capacité à induire l'entrée en mitose d'une substance ou protéine que l'on ajoute ou enlève à l'extrait. Un extrait cyclant observe quant à lui plusieurs cycles successifs d'une alternance de phases S et de mitoses et peut ainsi reproduire les premières divisions post-fécondation.

## Résultats

Les résultats publiés par l'équipe de Mickael Goldberg (Yu et al. 2006 ; Zhao et al. 2008 ; Castilho et al. 2009) ainsi que ceux de notre équipe (Vigneron et al. 2009 ; Lorca et al. 2010) Greatwall (Gwl) ont montré que Greatwall était une protéine kinase présentant une faible activité au cours de l'interphase et voyant son activité augmenter lors de la transition G2-Mitose pour atteindre son maximum lors de la mitose. D'autres résultats provenant de ces deux équipes ont mis en évidence deux sites de phosphorylation majeurs qui régulent l'activité kinase de Greatwall (Vigneron et al. 2011 ; Blake-Hodek et al. 2012). Ces sites présents dans la T-loop (Thr 194 chez l'homme ; Thr 193 chez le xénope) et en position C terminal de la protéine (Ser 875 chez l'homme ; 883 chez le xénope) sont phosphorylés lorsque Gwl est présent dans une cellule ou un extrait cellulaire mitotique. La mutation d'un de ces deux sites en alanine diminue fortement l'activité kinase de Gwl suggérant à nouveau l'importance de ces deux phosphorylations pour que Gwl puisse assurer son/ses rôles au niveau cellulaire. D'autre part, au cours de ces mêmes travaux, il a été décrit que Gwl subit une déphosphorylation importante (augmentation de la migration sur gel PAGE) concernant aussi ces deux sites régulateurs (Thr 194 et Ser 875) lorsque la cellule quitte l'état mitotique.

A nouveau, notre équipe et celle de Mickael Goldberg ont montré que l'élimination de la protéine Gwl à partir d'extrait d'œufs de xénope arrêtés en métaphase de deuxième méiose (extraits CSF) induit une sortie rapide de métaphase de deuxième méiose. Un résultat identique est observé sur les extraits mitotiques auxquels on élimine Gwl. L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que l'activité de la protéine kinase Gwl est requise pour le maintien de l'état méiotique/mitotique. Toutes ces données laissent penser que la déphosphorylation de Gwl lors de la sortie de méiose/mitose est nécessaire pour inactiver Gwl et permettre la sortie de l'état mitotique.

C'est dans ce contexte que j'ai initié mon travail de thèse en ayant comme objectif de caractériser les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation et l'inactivation de Gwl. (On peut peut être discuter de la séquence/structure de Gwl avec pas d'hydrophobic motif par ex.). Je me suis dans un premier temps familiarisé avec le modèle des ovocytes et des extraits d'œufs de xénope à partir desquels les principaux résultats sur le rôle de Gwl ont été mis en évidence. D'autre part, sur ce modèle l'absence de Gwl présente un effet fort et reproductible, ce qui représente un modèle de choix pour répondre à cette question. En tenant compte de la bibliographie, nous nous sommes concentrés sur l'implication de 4 phosphatases comme cible des deux sites régulateurs de Gwl : La Calcineurine, Fcp1, PP1 et PP2AB55.

Je montre que ni la calcineurine, ni Fcp1 affectent directement la déphosphorylation de Gwl. Concernant Fcp1, j'ai pu mettre cela en évidence par immuno-précipitation de la protéine fcp1 endogène qui ne présente aucune différence sur la cinétique de déphosphorylation de Gwl. Concernant la Calcineurine, nous montrons que la déphosphorylation de Gwl se produit normalement même dans les conditions où la calcineurine n'est pas active. C'est le cas lorsque l'on active, par addition de la  $Ca^{2+}$  calmoduline kinase II (CaMKII), la voie de signalisation qui conduit à l'inactivation du CSF et du MPF ou bien de la même manière lorsque l'on élimine la protéine Erp1 qui maintient les extraits métaphase II de méiose dans un état stable.

L'utilisation de la surexpression d'une forme active de Gwl (Gwl K72M) ou bien celle d'une forme thiophosphorylée de la protéine Arpp19 nous a permis d'analyser la contribution de la phosphatase PP2AB55 sur l'état mitotique, l'activité et la déphosphorylation de Gwl. De la même manière, nous avons pu éliminer la protéine phosphatase PP1 en utilisant un inhibiteur protéique spécifique NIPP1. En réalité, nous avons travaillé avec le domaine de liaison à PP1 de manière à n'éliminer que PP1.

Nos résultats montrent que l'inhibition de PP2AB55 affecte la sortie de métaphase II de méiose induite par l'élimination de Erp1 ou par l'addition de la CaMKII. En effet, l'ADN ne peut se décondenser correctement et des structures mitotiques persistent. Il faut préciser ici que nos conditions expérimentales induisent la dégradation des cyclines mitotiques (A et B) et l'inactivation de la kinase Cdk1-cycline suggérant que la condensation de l'ADN et les structures mitotiques sont maintenues en l'absence de cycline et de kinase associée. Dans ces conditions expérimentales, nous avons pu observer que la phosphorylation du site Thr 194 de Gwl était beaucoup mieux maintenue que la phosphorylation du site Ser 875. De plus, les mesures de l'activité kinase de Gwl réalisées sur Arpp19 recombinant montrent que l'inhibition de PP2AB55 permet de maintenir 50% environ de l'activité kinase après dégradation des cyclines et inactivation de la kinase Cdk1-cycline B. De manière à démontrer que nos résultats correspondent bien à une inhibition spécifique de PP2AB55, nous avons réalisé ces expériences suivies d'une élimination de Arpp19 qui permet la levée de l'inhibition de PP2AB55 (Gharbi et al. 2010). L'absence de Arpp19 induit l'inactivation de Gwl, la déphosphorylation totale de Gwl sur les résidus 194 et 875 et son inactivation. Cette première partie de nos résultats est en accord avec les données publiées par Hégarat et al. 2014 dont les expériences réalisées en présence d'Acide Okadaïque, un inhibiteur de PP2A et PP1, suggèrent que le site Thr 194 présent dans la T-loop de Gwl pourrait être la cible de PP2A.

Par la suite, nous avons analysé l'implication de la phosphatase PP1 en éliminant cette protéine de nos extraits d'œufs de xénope. Nos résultats montrent que l'absence de PP1 à partir d'extraits arrêtés en métaphase II de méiose ne permet plus la déphosphorylation de Gwl détectée par mobilité électrophorétique et maintient la quasi totalité de son activité kinase mesurée sur son substrat Arpp19. De plus, l'analyse du fuseau mitotique et de l'ADN montre que la perte de PP1 permet de conserver un fuseau mitotique et un ADN condensé. Concernant les phosphorylations sur les sites 194 et 875, nous observons une diminution des niveaux de phosphorylation sur le site 194 mais un maintien quasi total sur le site 875. Comment pouvons nous expliquer ces résultats et l'ordre d'activation de ces phosphatases conduisant à la déphosphorylation de Gwl et à la sortie de l'état mitotique. Il est connu que PP1 est inhibée par phosphorylation sur le site Thr 320 par la kinase Cdk1-cycline B. Ce site inhibiteur peut être éliminé par auto-déphosphorylation de PP1 elle-même. D'autre part, nous savons que Gwl phosphoryle Arpp19 permettant son association à PP2AB55 et son inhibition. A la lumière de nos résultats, nous pouvons imaginer que lors de la transition métaphase/anaphase la dégradation de la cycline B est initiée, suivie de la diminution de l'activité kinase de Cdk1-cycline B et par la déphosphorylation partielle de PP1. Cela peut permettre une déphosphorylation de Gwl sur son site 875 qui voit ainsi son activité kinase diminuer. Cet état transitoire et certainement bref de Gwl induit une activation partielle de PP2AB55 qui va à son tour déphosphoryler Gwl. Si cette hypothèse est exacte, nous devrions déphosphoryler Gwl en activant PP2AB55 et cela même en l'absence de PP1. C'est ce que nous avons réalisé en activant PP2AB55 par élimination de la protéine inhibitrice Arpp19. Nos résultats montrent que PP2AB55 est capable d'induire la déphosphorylation de Gwl sur les deux sites et cela même dans un contexte dépourvu d'activité PP1. Cette dernière joue un rôle important au départ du processus conduisant à la sortie de mitose où PP2AB55 est inhibée par la voie Gwl/Arpp19 et qui permet d'initier les premières étapes de la ré-activation de PP2AB55.

L'importance de nos données, confirmées par d'autres laboratoires (Castilho et al. 2009 ; Wang et al. 2011), repose sur une observation surprenante qui montre pour la première fois qu'en présence d'une forte activité kinase du complexe Cdk1-cycline B, l'élimination de Gwl empêche la phosphorylation des substrats de la protéine kinase Cdk1-cycline B entraînant une sortie de mitose prématurée. Jusqu'à présent, l'entrée en mitose était directement liée à l'activation de la kinase mitotique Cdk1-cycline B. Aujourd'hui, nous

apportons un nouvel élément à l'édifice mitotique avec Gwl comme autre chef d'orchestre qui contrôle négativement l'activité de PP2AB55. Ce nouveau concept établit que l'entrée en mitose repose dorénavant sur l'activation conjointe de deux kinases, Cdk1-cycline B et Gwl, la première permettant la phosphorylation massive des substrats mitotiques, la deuxième inhibant la phosphatase PP2AB55 qui déphosphoryle ces mêmes substrats, l'ensemble autorisant le maintien de ces phosphorylations requises pour la réalisation d'une mitose correcte.

# Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1

Sheng Ma, Perle Robert, Suzanne Vigneron, Anna Castro\* and Thierry Lorca\*

Words: 5907

**Running Title:** PP1 triggers Greatwall dephosphorylation

**Key words:** Greatwall, PP1, PP2A-B55, Mitotic Exit, Meiotic Exit

<sup>1</sup>Université de Montpellier, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire,  
CNRS UMR 5237, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France.  
Equipe Labellisée “Ligue Contre le Cancer”.

Phone 33 4 34 35 95 56

Fax 33 4 34 35 94 10

\*Corresponding author E-mails: [anna.castro@crbm.cnrs.fr](mailto:anna.castro@crbm.cnrs.fr) and [thierry.lorca@crbm.cnrs.fr](mailto:thierry.lorca@crbm.cnrs.fr)

## **Abstract**

Mitotic entry requires cyclin B-Cdk1 activation and PP2A-B55 inhibition. At G2/M the Greatwall kinase (Gwl) is activated and promotes Arpp19/ENSA phosphorylation that once phosphorylated bind and inhibit PP2A-B55. Mitotic exit requires the reactivation of this phosphatase by Gwl inactivation and further dephosphorylation of its substrates. In this study we show that PP1 depletion in *Xenopus* egg extracts stabilises phosphorylation of Gwl on its activatory site S875 maintaining in this way the full activity of this kinase and blocking meiotic/mitotic exit. In contrast, the inhibition of PP2A-B55 maintains phosphorylation of Thr194 resulting in partial Gwl inactivation and partial meiotic/mitotic exit. Our data also show that if PP2A-B55 is fully reactivated by Arpp19 depletion, this phosphatase is able to rapidly dephosphorylate Gwl in the two activatory sites even in the absence of PP1. Finally, we show that both phosphatases PP1 and PP2A-B55 can dephosphorylate Gwl on S875 and Thr194 *in vitro*. These data identify PP1 as the phosphatase first dephosphorylating Gwl and triggering its inactivation upon meiotic/mitotic exit.

## **Introduction**

Entry into mitosis or meiosis requires the phosphorylation of a high number of mitotic proteins. This phosphorylation is mostly performed by the complex cyclin B-Cdk1. However, mitotic substrate phosphorylation is also dependent on the activity of the phosphatase PP2A-B55 that mediates their dephosphorylation. It is well established that the Gwl kinase is activated at G2/M transition by a first phosphorylation on the T-loop site (Thr193 in *Xenopus* sequence; Thr194 in Human sequence) by cyclin B-Cdk1 followed by an autophosphorylation of the C-terminal activatory site (S883 in *Xenopus* sequence; S875 in human sequence)(Blake-Hodek et al, 2012; Vigneron et al, 2011). The activation of this kinase promotes the inhibition of PP2A-B55 via the phosphorylation of its substrates Arpp19 and ENSA (Alvarez-Fernandez et al, 2013; Gharbi-Ayachi et al, 2010; Lorca et al, 2010; Mochida et al, 2010). This inhibition will result in the stable phosphorylation of cyclin B-Cdk1 substrates and mitotic entry.

To return to interphase state, proteins must be dephosphorylated. This dephosphorylation is dependent on the inactivation of cyclin B-Cdk1 and the reactivation of the phosphatase PP2A-B55 (Mochida et al, 2009). Cyclin B-Cdk1 inactivation is achieved by the APC/C-dependent degradation of cyclin B (Peters, 2006). PP2A-B55 reactivation depends on the inactivation of Gwl and the dephosphorylation of Arpp19/ENSA. Recent data suggest that

Gwl dephosphorylation and inactivation is mediated by the phosphatase PP2A-B55 (Hegar et al, 2014). The identity of the phosphatase involved in Arpp19/ENSA dephosphorylation is much less clear. In this line, two different phosphatases have been suggested, PP2A-B55 (Williams et al, 2014) and Fcp1 (Hegar et al, 2014). Finally, both PP1 (Wu et al, 2009) and PP2A-B55 (Cundell et al, 2013; Mochida et al, 2009) have been shown to participate to cyclin B-Cdk1 substrate dephosphorylation. In this work we investigate the role of different phosphatases in Gwl inactivation and cyclin B-Cdk1 substrate dephosphorylation upon meiotic and mitotic exit

## Results

### **PP2A-B55 and PP1 but not Fcp1 are required for a correct meiotic and mitotic exit**

We used *Xenopus* metaphase II arrested egg extracts (CSF extracts) and interphase egg extracts to investigate the contribution of different phosphatases in meiotic and mitotic exit.

The phosphatase Fcp1 has been recently suggested to be responsible of Arpp19/ENSA dephosphorylation and to mediate in this way mitotic exit in human cells (Hegar et al, 2014). We checked the role of this phosphatase in meiotic exit in *Xenopus* egg extracts. To that, we first depleted Fcp1 from CSF extracts and subsequently forced them to exit meiosis by removing the APC/C inhibitor Erp1 (Schmidt et al, 2005). We monitored meiotic state by measuring the phosphorylation state of mitotic substrates such as Gwl, Cdc27, Cdc25 and MAPK (pErk) as well as the degradation of cyclin B and the drop of cyclin B-Cdk1 activity. Both antibodies anti-Fcp1 and anti-Erp1 completely immunodepleted these proteins from CSF extracts (Figure 1A). As expected depletion of Erp1 promoted meiotic exit in control extracts (Figure 1A,  $\Delta$ CT+ $\Delta$ Erp1) as shown by the dephosphorylation of Gwl, Cdc27, Cdc25 and pErk and by the degradation of cyclin B concomitantly with a drop of cyclin B/Cdk1 activity (HIK). Unexpectedly, we did not observe any change in the dephosphorylation timing of these proteins when Fcp1 was depleted (Figure 1A,  $\Delta$ Fcp1+ $\Delta$ Erp1) suggesting that Fcp1 is not required to induce meiotic exit in *Xenopus* egg extracts. We next investigated whether this was also the case for mitotic exit. With this aim, we used interphase egg extracts. The addition of ectopic cyclin A to these extracts promotes a raise of cyclin B/Cdk1 activity, mitotic entry and a subsequent activation of the APC/C resulting in a rapid mitotic exit making difficult the study of the dephosphorylation of mitotic substrates (Lorca et al, 2010). In order to stabilise mitosis before mitotic exit we prevented cyclin A/B degradation by depleting the APC/C subunit Cdc27. After Cdc27 loss, cyclin A was added to promote

mitotic entry. Thirty minutes later, H1K activity raised and the mitotic substrates Cdc25 and Gwl become phosphorylated (Figure 1B,  $\Delta$ Cdc27+CycA). At this point Fcp1 was immunodepleted and mitotic exit was induced by Cdk depletion. In both control and Fcp1 depleted extracts, Cdk depletion promoted dephosphorylation of Gwl and Cdc25 with similar kinetics indicating that Fcp1 is neither involved in mitotic exit.

As for Fcp1, PP2A-B55 has been suggested to mediate mitotic exit in human cells by either promoting the dephosphorylation of Gwl on the T-loop activatory site (Hegar et al, 2014) or by inducing the dephosphorylation of cyclin B-Cdk1 substrates such as PRC1 (Cundell et al, 2013). We tested the implication of PP2A-B55 in Gwl dephosphorylation and meiotic exit by investigating the effect of the addition of a human hyperactive mutant form of Gwl, GwlK72M. This Gwl mutant form inhibits PP2AB55 through Arpp19 phosphorylation and displays a higher kinase activity. GwlK72M is normally dephosphorylated and inactivated when cyclin B-Cdk1 drops in interphase extracts (Vigneron et al, 2011). CSF extracts were supplemented with GwlK72M and subsequently forced to exit CSF by Erp1 depletion. Under these conditions we assessed Gwl dephosphorylation and cyclin B degradation by western blot and the meiotic state by checking chromatin condensation and spindle formation in these extracts. **Since immunodepletion after nuclei sperm addition perturbs chromatin condensation we used CamK2 addition** (Lorca et al, 1993) **instead of Erp1 depletion** to promote meiotic exit when metaphase plate was checked by microscopy. As expected, Erp1 depletion in GwlK72M supplemented extracts promoted the degradation of cyclin B, however, we also observed a rapid increase in the mobility shift of Gwl although it did not arrived to the level displayed in interphase extracts suggesting that this protein was at least partially dephosphorylated (Figure 1C). Incomplete Gwl dephosphorylation was associated with the maintenance of a partial meiotic state in GwlK72M-supplemented extracts as shown by the fact that 80 minutes after CamK2 addition to these extracts chromatin was partially condensed and located on short mitotic-like microtubule structures although structured bipolar spindle with a metaphase plate was never observed (Figure 1D). Thus, PP2A-B55 inhibition prevents complete meiotic exit and allows the partial dephosphorylation of Gwl suggesting that other phosphatase/s could be involved in Gwl dephosphorylation and inactivation upon meiotic exit.

One candidate for this phosphatase could be PP1 since it has been previously shown that it is required to promote a correct mitotic exit in *Xenopus* egg extracts (Wu et al, 2009). We thus checked the effect of PP1 depletion from CSF extracts prior inducing meiotic exit. In order to

remove PP1, we used a His pull-down approach from CSF extracts in which a His-tagged form of the PP1 binding domain of the inhibitor of this phosphatase, NIPP1, was added. This pull-down completely depleted PP1 from the extract (Figure 1E). The loss of PP1 stabilised Gwl in its high mobility shift as late as 90 minutes after CamK2 addition far after cyclin B degradation suggesting that this phosphatase, directly or indirectly controls the dephosphorylation of Gwl. In addition, extracts devoid of PP1 displayed a clear mitotic state with bipolar spindles and metaphase plates suggesting that this phosphatase would be required to promote Gwl dephosphorylation and meiotic exit.

### **PP2A-B55 inhibition upon meiotic and mitotic exit promotes the stabilisation of Gwl phosphorylation on Thr194**

In order to further characterise the effect of PP2A-B55 in Gwl dephosphorylation and inactivation upon meiotic exit, we assessed dephosphorylation of this kinase on the two essential activatory sites, the T-loop site Thr193 (Thr194 in human Gwl) and the C-terminal site S883 (S875 in human sequence) after PP2A-B55 inhibition. Since our phospho-antibody against S875 exclusively detects this phosphorylated site in human Gwl (Vigneron et al, 2011), whenever human GwlK72M was not present we added the same amount of wild type ectopic human Gwl protein to extracts. When GwlK72M was added, dephosphorylation of Thr194 and S875 was directly analysed in this mutant form that, as explained above, normally dephosphorylates upon mitotic exit. To properly analyse the timing of dephosphorylation of Gwl, two different exposure times of the ECL signals, short (-) and long (+), were compared throughout the study for each Gwl phospho-antibody.

In control CSF extracts Erp1 depletion promoted a rapid dephosphorylation of Gwl on both sites S875 and Thr194 (Figure 2A). It is worth noticing that the signal intensity obtained with both antibodies at time 0 minutes after Erp1 depletion was always significantly lower in control extracts than in extracts supplemented with GwlK72M (compare Figure 2A,  $\Delta$ Erp1 with  $\Delta$ Erp1+GwlK72M) suggesting that dephosphorylation of these sites might started during Erp1 depletion. As expected, Gwl dephosphorylation in control extracts was concomitant with cyclin B degradation and with the drop of H1K activity as well as with the reactivation of PP1 as revealed by the dephosphorylation of the cyclin B-Cdk1 inhibitory site Thr320 on this protein. In contrast, the addition of hyperactive Gwl partly delayed dephosphorylation on S875 whereas phosphorylation on the Thr194 site was mostly stabilised. This kinase with partial dephosphorylation of S875 and almost full phosphorylation on Thr194 displayed an

intermediate activity between the one observed in CSF and in interphase extracts (Figure 2A, Gwl Activity).

GwlK72M mutant increases Arpp19 phosphorylation levels and consequently promotes increased PP2A-B55 inhibition, however, although the addition of this hyperactive mutant fully inhibits PP2A-B55-dependent dephosphorylation under normal conditions, it is possible that this is not the case in the absence of cyclin B-Cdk1 activity. To assure a complete inhibition of PP2A-B55-dependent dephosphorylation under these conditions, we repeated the previous experiment by adding thiophosphorylated Arpp19 (ThioArpp19). We chose an amount of Arpp19 that, when immunoprecipitated from the extracts, induced the complete loss of PP2A-B55 from the supernatants (Figure 2B). As for GwlK72M, upon Erp1 depletion the addition of ThioArpp19 to CSF extracts significantly delayed dephosphorylation of S875 and almost completely stabilised phosphorylation of Gwl on Thr194 despite the degradation of cyclin B and the drop of H1K activity (Figure 2C). It is worth noticing that PP1 is normally dephosphorylated in Thr320 and thus reactivated in these extracts concomitantly with the loss of cyclin B-Cdk1 activity.

To further demonstrate that the effect of the hyperactive kinase addition on dephosphorylation of the two Gwl activatory sites was the consequence of PP2A-B55 inhibition, we measured the dephosphorylation of these sites in GwlK72M supplemented extracts in which PP2A-B55 was reactivated by depletion of Arpp19 after Erp1 immunoprecipitation. Arpp19 loss promoted a very rapid and complete dephosphorylation of both Gwl sites (Figure 2D,  $\Delta$ Arpp19) indicating that a gradual reactivation of PP2A-B55 is required for a correct timing of Gwl inactivation and meiotic exit.

We next checked whether the role of PP2A-B55 upon exit of meiosis is also conserved during mitotic exit. To that, we supplemented Cdc27-devoid interphase extracts with GwlK72M that directly promoted mitotic entry (Figure 2E) and we subsequently depleted Cdks to promote mitotic exit. Again the inhibition of PP2A-B55 with GwlK72M promoted a partial dephosphorylation of Gwl on S875 after Cdk depletion whereas phosphorylation of Thr194 was almost completely stabilised despite the loss of cyclin B, a drop of H1K activity and a reactivation of PP1. As for meiotic exit, depletion of Arpp19 promoted an immediate dephosphorylation of both activatory sites of Gwl. Altogether these results indicate that during normal mitotic exit, as in meiotic exit, PP2A-B55 would be mostly responsible of dephosphorylation of Gwl on Thr194 although it could also in a minor extent participate directly or indirectly to the dephosphorylation of Gwl on S875. In addition, we show that if

the reactivation of PP2A-B55 is artificially induced by Arpp19 immunodepletion, this phosphatase is able to rapidly dephosphorylate both Gwl activatory sites.

### **PP1 depletion prevents Gwl inactivation upon meiotic and mitotic exit by maintaining its phosphorylation on S875**

Our data above suggest that, besides PP2A-B55, PP1 activity is also required for Gwl dephosphorylation and inactivation since its depletion maintains this kinase in its low mobility shift upon meiotic exit (Figure 1E). To further identify the sites of Gwl controlling its kinase activity targeted by PP1, we checked by western blot phosphorylation of Thr194 and S875 in extracts devoid of this phosphatase upon Erp1 depletion. As shown in Figure 3A, depletion of PP1 in CSF extracts promoted a delay in the dephosphorylation of Thr194 but an almost complete stabilisation of phosphorylated S875. In addition, the activity of this kinase was fully maintained indicating that inactivation of Gwl is mainly promoted by dephosphorylation of S875. We obtained the same results when I2 (Satinover et al, 2004), another inhibitor of PP1 was used to perform PP1 pull-down (Figure 3B).

Thus, our results suggest that the major target site of PP2A-B55 in Gwl would be Thr194 whereas PP1 would preferentially dephosphorylate this kinase on S875 although a minor effect on Thr194 dephosphorylation cannot be excluded.

We next asked whether PP1 induces S875 dephosphorylation directly or through PP2A-B55 that, as shown above, can induce the complete dephosphorylation of this site when it is fully reactivated. In this line, it has recently been shown in fission yeast that PP1 association to PP2A-B55 during mitosis promotes the activation of PP2A-B55 (Grallert et al, 2015). We tested whether these two phosphatases could interact in CSF extracts. We did not detect any association of PP2A A or C subunits with PP1 in our extracts (Figure 3C) suggesting that the loss of PP1/PP2A-B55 interaction is not the mechanism by which PP1 removal prevents Gwl dephosphorylation on S875 and meiotic exit in these extracts.

We thus tested whether PP1 depletion maintains meiotic state exclusively by stabilising S875 phosphorylation and by preventing in this way Gwl inactivation and PP2A-B55 reactivation. If the sole effect of PP1 depletion is the maintenance of the Gwl activity, extracts should exit meiosis when PP1 and Gwl are co-depleted. Accordingly, the double depletion of PP1 and Gwl promoted a rapid dephosphorylation of mitotic substrates (Figure 3D). In addition, depletion of Arpp19 in PP1 devoid extracts induced a rapid and complete dephosphorylation of Gwl in both Thr194 and S875 sites (Figure 3E). These results suggest that PP1 would be essential for the dephosphorylation of Gwl on S875 when App19-dependent inhibition of

PP2A-B55 is present but that the latter phosphatase could promote the rapid and complete dephosphorylation of Gwl if Arpp19 inhibition pathway is shut down.

Finally, we checked whether the effect of PP1 in Gwl dephosphorylation and inactivation was also observed in mitotic exit. To that, we repeated PP1 depletion experiment in interphase egg extracts that were forced to enter into mitosis by cyclin A addition and to exit mitosis by Cdk depletion. Again, S875 of Gwl was stabilised and the activity of this kinase fully maintained (Figure 3F). As for meiotic exit, this phenotype is mediated by the maintenance of Gwl activity and the inhibition of PP2A-B55 by Arpp19 since when Arpp19 was depleted in these extracts before Cdks immunoprecipitation, Gwl was completely dephosphorylated on S875.

### **The double inhibition of PP2A-B55 and PP1 blocks dephosphorylation of Gwl on both Thr194 and S875**

Our data is consistent with a model in which PP1 would first trigger the dephosphorylation of S875 and PP2A-B55 would mostly promote dephosphorylation of Gwl on Thr194. However, it is possible that other phosphatases could participate to these dephosphorylations. If PP2A-B55 and PP1 are the unique phosphatases involved in the dephosphorylation of the activatory sites of Gwl, the double inhibition of PP2A-B55 and PP1 would promote a complete stabilisation of the phosphorylation of these two sites of Gwl upon mitotic exit. We tested this hypothesis in interphase extracts that were first forced to enter mitosis by GwlK72M addition, devoid of PP1 and finally forced to exit mitosis by Cdk depletion. As shown in Figure 4A, the loss of the activities of PP2A-B55 and PP1 completely prevented the dephosphorylation of Thr194 and S875 of Gwl. However, these phosphorylations disappeared immediately after Arpp19 depletion again supporting the hypothesis that PP1 is essential for Gwl inactivation when PP2A-B55 is inhibited by Arpp19 but that this phosphatase can rapidly dephosphorylate this site in the absence of an active Arpp19-inhibitory pathway.

### **PP1 and PP2A-B55 both dephosphorylate Gwl on Thr194 and S875 “*in vitro*”**

In order to determine whether PP1 and PP2A-B55 can directly promote dephosphorylation on Thr194 and/or S875 of Gwl we performed “*in vitro*” dephosphorylation assays on phosphorylated Gwl by using PP2A and PP1 phosphatases purified from interphase extracts. As shown in Figure 4B, dephosphorylation of Gwl on both S875 and Thr194 was observed from 7 minutes incubation and promoted an increase of the mobility shift of this kinase 20 minutes after PP2A addition. This dephosphorylation is specific to PP2A-B55 complex, since

it was not observed when Arpp19 was supplemented to the incubation buffer. As for PP2A, PP1 promoted the dephosphorylation of these two sites of Gwl, a dephosphorylation that was prevented by the addition of the PP1 inhibitor NIPP1. These results demonstrate that *in vitro* both PP1 and PP2A-B55 can induce dephosphorylation of Gwl on S875 and Thr194.

## **Discussion**

Our data presented here demonstrate that both PP1 and PP2A-B55 participate to the dephosphorylation of the activatory sites of Gwl during meiotic and mitotic exit. This dephosphorylation induces Gwl inactivation promoting the further dephosphorylation of Arpp19/ENSA and the reactivation of PP2A-B55 that is required to induce mitotic substrate dephosphorylation and meiotic/mitotic exit. Although both PP2A-B55 and PP1 promote dephosphorylation of S875 and Thr194 of Gwl “*in vitro*”, our results suggest that “*in vivo*” each phosphatase preferentially dephosphorylates one of these two sites. In this regard we show that the inhibition of PP2A-B55 by either the addition of GwlK72M or ThioArpp19 upon meiotic/mitotic exit promotes the stabilisation of the phosphorylation of Gwl on Thr194 and only a delay of dephosphorylation of S875. It is likely that stabilisation of Thr194 is due to a direct dephosphorylation of this residue by PP2A-B55 whereas the delay of the dephosphorylation of S875 could be explained by an increase of the autophosphorylation of this site due to the persistent phosphorylation on Thr194 and the maintenance of a partial activity of Gwl.

Unlike PP2A-B55 inhibition, removal of PP1 promotes the stabilisation of the phosphorylation on S875 of Gwl and the maintenance of the full activity of this kinase in spite of the delayed, but almost complete, dephosphorylation of Thr194. Despite the fact that Gwl maintains full activity, Thr194 dephosphorylation might be controlled by PP2A-B55 since the double inhibition of PP1 and PP2A-B55 completely prevents S875 and Thr194 dephosphorylation upon cyclin B-Cdk1 inactivation. Thus, it is likely that a minor pool of PP2A-B55 is maintained active in PP1-devoid extracts and is sufficient to promote dephosphorylation of Thr194 in the absence of cyclin B-Cdk1, the kinase responsible of this phosphorylation. However, despite almost complete dephosphorylation of Thr194 of Gwl, PP1-depleted extracts cannot exit mitosis since DNA is maintained condensed on bipolar spindles forming metaphase plates. Thus, PP1 is essential to trigger Gwl dephosphorylation on S875, complete reactivation of PP2A-B55 and mitotic exit.

Interestingly, when PP1-devoid extracts are depleted of Arpp19 resulting on the fast and full

activation of PP2A-B55, then Gwl and mitotic extracts are rapidly and completely dephosphorylated and inactivated resulting in an almost immediate mitotic/meiotic exit. These results suggest that a gradual inactivation of Gwl by PP1 resulting in a gradual reactivation of PP2A-B55 is essential to promote a correct timing of mitotic exit.

We propose a model in which the first step on meiotic/mitotic exit would be cyclin B proteolysis and subsequent cyclin B-Cdk1 inactivation (Figure 4D). Degradation of cyclin B induced by APC/C activation at meiotic/mitotic exit would prevent the further phosphorylation of the inhibitory site of PP1 on Thr320 and would allow the activation of this phosphatase by autodephosphorylation. Once activated, PP1 would trigger the inactivation of Gwl by dephosphorylating S875 activatory site of this kinase. This would induce a partial dephosphorylation of Arpp19/ENSA and a partial activation of PP2A-B55 that would then participate to the further dephosphorylation of Gwl on the two activatory sites S875 and Thr194 and to the inactivation of Arpp19/ENSA. Once triggered by PP1, this feed-back loop would result in a rapid inactivation of Gwl, dephosphorylation of Arpp19/ENSA and a fully activation of PP2A-B55 that would then participate to the substrate dephosphorylation and promote mitotic/meiotic exit.

## **Materials and Methods**

**CSF and interphase *Xenopus* egg extracts.** CSF and interphase *Xenopus* egg extracts were prepared as described in Lorca et al 2010 (Lorca et al, 2010).

**Mitotic spindle formation and chromatin condensation “*in extracto*”.** Demembrated sperm nuclei were prepared as described (Vigneron et al, 2004). Fresh CSF extracts were supplemented with sperm nuclei and rhodamine tubulin at a final concentration of 3000 sperm nuclei per microliter and 22 ng/μl respectively and incubated for 30 minutes at room temperature. 2 μl of CamK2 translated reticulocyte was then added and samples were taken at the indicated times and fixed in a buffer containing 1% formaldehyde DAPI (1 μg/ml) and used for light microscopy analysis.

**Light Microscopy.** A DMR A Leica microscope DM 4500B with a 63X immersion oil objective (HCX PL APO), tube factor 1 was used for epifluorescence imaging. Images were captured with a CoolSnap HQ camera (Roger Scientific), and the whole set was driven by MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA).

**H1 kinase activity.** H1K activity was performed as described in Lorca et al. (Lorca et al, 2010).

**Gwl kinase assays.** Human GST-Gwl or GST-GwlK72M was added to CSF or interphase extracts at a final concentration of 10 ng/ $\mu$ l. A sample of 10  $\mu$ l of the mix was recovered 30 minutes later or at the end of the experiment and mixed with 10  $\mu$ l magnetic protein G-Dynabeads (Dyna) prebound to 2  $\mu$ g of anti-GST antibodies. Beads were then incubated for 20 minutes, recovered and washed with XB buffer (100 mM KCl, 01 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Sucrose). Immunoprecipitate was then mixed with 10  $\mu$ l of phosphorylation mix (HEPES [20  $\mu$ M], MgCl<sub>2</sub> [10 mM], ATP [100  $\mu$ M]), 1  $\mu$ g of His-Arpp19 and 2  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP). Twenty minutes later, reactions were stopped by adding Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE.

**Immunoprecipitations/immunodepletions.** Immunoprecipitations/immunodepletions were performed using 10  $\mu$ l of extracts, 10  $\mu$ l of magnetic protein G-Dynabeads (Dyna), and 2  $\mu$ g of each antibody. Antibody-linked beads were washed 2 times with XB buffer, 2 times with Tris 50mM, pH 7.5 and incubated for 15 min at room temperature (RT) with 10  $\mu$ l of *Xenopus* egg extracts. For immunodepletion, the supernatant was recovered and used for subsequent experiments.

To induce complete Cdk depletion two rounds of immunoprecipitation, one with anti-Cdk1 antibodies and the second one with anti-Cyclin A antibodies were performed.

**PP1 depletion.** To induce PP1 depletion, 10  $\mu$ l of CSF or interphase extracts were supplemented with 10  $\mu$ l of Dynabeads His-Tag Isolation & Pull down (Life Technologies) pre-link to a 6His-tagged protein containing the PP1 binding domain of NIPP1 (aminoacids from 143 to 225 of human NIPP1 sequence). After 20 minute-incubation, supernatant was recovered and used as indicated in each experiment. When indicated, PP1 was immunodepleted by using 6His-*Xenopus* I2 instead of 6His-PP1 binding domain of NIPP1.

**In vitro phosphatase assay.** To obtain active PP2A phosphatase: 150  $\mu$ l of interphase egg extracts were immunoprecipitated with 10  $\mu$ l anti-PP2A/C monoclonal antibodies (1D6) bound to 50  $\mu$ l of Dynabeads protein G magnetic beads. Immunoprecipitate was then split into two. One was supplemented with 3  $\mu$ g of *Xenopus* Thio-phosphorylated Arpp19 whereas the other one was mixed with the same volume of the dephosphorylation buffer (50 mM Hepes, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

To obtain active PP1 phosphatase: 150  $\mu$ l of interphase egg extracts were supplemented with 50  $\mu$ l of Dynabeads His-Tag Isolation & Pull down (Life Technologies) pre-saturated with

recombinant 6His-PP1 protein. After 30 minute-incubation, immunoprecipitate was recovered, washed three times with XB buffer and then split into two. One of these samples was supplemented with 3 µg of the 6His-peptide binding domain of NIPP1 whereas the other one was mixed with the same volume of the dephosphorylation buffer.

To obtain phosphorylated human Gwl: 30 µg of human GST-Gwl was mixed with 140 µl of CSF extracts. 40 minutes later, 50 µl of magnetic protein G-Dynabeads (Dyna) prebound to 5 µg of anti-GST antibodies were added to immunoprecipitate human GST-Gwl. IP was dispatched in four samples and mixed with PP2A and PP1 supplemented or not with Thio-Arpp19 or 6His-peptide binding domain of NIPP1 respectively. A sample of 2 µl was removed at 0, 3, 7 and 20 min and used for western blot.

**Thio-phosphorylation of Xenopus Arpp19.** 30 µl of magnetic protein G-Dynabeads (Dyna) prebound to 3 µg of anti-Xenopus Gwl antibodies were mixed with 60 µl of CSF extracts and incubated for 30 minutes. The immunoprecipitate was then washed a first time with 50 mM Tris pH7,5/300 mM NaCl, a second time with 50 mM Tris pH7,5/150 mM NaCl and a third time with 50 mM Tris pH7,5 and was finally mixed with 90 µl of Xenopus Arpp19 (225 µg) and 10 µl of phosphorylation buffer (x10) (250 mM Tris pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM ATP<sup>γS</sup> and ATP 0,1 nM) and incubated for 1 h at room temperature.

**Plasmids and Antibodies.** Plasmids and antibodies are specified in Expanded View Table 1 and 2.

### **Acknowledgments**

We thank Dr M. Bollen and G Van der Hoeven for the generous gift of the anti-PP1 monoclonal antibodies and the plasmid coding for PP1-binding domain of NIPP1 and V. Georget from Montpellier RIO Imaging for microscopy facilities. We also thank P Richard and M Plays from the Antibody Production Platform at the CRBM. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée), the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-10-BLAN-1207) and the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” (PJA 20141201679). S. Ma is a “Ministere de la Recherche” fellow. P. Robert is a “Ligue Nationale Contre le Cancer” fellow.

### **Author Contributions**

This paper is submitted with the agreement of all its co-authors and the author list has been approved by all authors.

SM performed all the experiments where FCP1 and PP1 were depleted. PR contributed to the experiments in which Thio-Arpp19 was used. Experiments in which mitotic spindle and chromosome condensation were analysed as well as “*in vitro*” dephosphorylation assays were performed by SV. TL designed and performed experiments, discussed the results and wrote part of the manuscript. AC wrote part of the manuscript and discussed the results.

### **Conflict of interest**

The authors disclose no potential conflicts of interest

### **Experimental Animals**

We certify that procedures involving experimental animals were performed in compliance with local animal welfare laws, guidelines and policies.

### **References**

1. Alvarez-Fernandez M, Sanchez-Martinez R, Sanz-Castillo B, Gan PP, Sanz-Flores M, Trakala M, Ruiz-Torres M, Lorca T, Castro A, Malumbres M (2013) Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 17374-17379
2. Blake-Hodek KA, Williams BC, Zhao Y, Castilho PV, Chen W, Mao Y, Yamamoto TM, Goldberg ML (2012) Determinants for activation of the atypical AGC kinase Greatwall during M phase entry. *Molecular and cellular biology* **32**: 1337-1353
3. Cundell MJ, Bastos RN, Zhang T, Holder J, Gruneberg U, Novak B, Barr FA (2013) The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation. *Molecular cell* **52**: 393-405
4. Gharbi-Ayachi A, Labbe JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM, Brioude E, Van-Dorselaer A, Castro A, Lorca T (2010) The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science* **330**: 1673-1677

5. Grallert A, Boke E, Hagting A, Hodgson B, Connolly Y, Griffiths JR, Smith DL, Pines J, Hagan IM (2015) A PP1-PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature* **517**: 94-98
6. Hegarat N, Vesely C, Vinod PK, Ocasio C, Peter N, Gannon J, Oliver AW, Novak B, Hochegger H (2014) PP2A/B55 and Fcp1 regulate Greatwall and Ensa dephosphorylation during mitotic exit. *PLoS genetics* **10**: e1004004
7. Lorca T, Bernis C, Vigneron S, Burgess A, Brioudes E, Labbe JC, Castro A (2010) Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. *Journal of cell science* **123**: 2281-2291
8. Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M (1993) Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**: 270-273
9. Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T (2009) Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *The EMBO journal* **28**: 2777-2785
10. Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T (2010) Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* **330**: 1670-1673
11. Peters JM (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 644-656
12. Satinover DL, Leach CA, Stukenberg PT, Brautigan DL (2004) Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8625-8630
13. Schmidt A, Duncan PI, Rauh NR, Sauer G, Fry AM, Nigg EA, Mayer TU (2005) *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes & development* **19**: 502-513

14. Vigneron S, Gharbi-Ayachi A, Raymond AA, Burgess A, Labbe JC, Labesse G, Monsarrat B, Lorca T, Castro A (2011) Characterization of the mechanisms controlling Greatwall activity. *Molecular and cellular biology* **31**: 2262-2275
  
15. Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe JC, Castro A, Lorca T (2004) Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Molecular biology of the cell* **15**: 4584-4596
  
16. Williams BC, Filter JJ, Blake-Hodek KA, Wadzinski BE, Fuda NJ, Shalloway D, Goldberg ML (2014) Greatwall-phosphorylated Endosulfine is both an inhibitor and a substrate of PP2A-B55 heterotrimers. *eLife* **3**: e01695
  
17. Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S (2009) PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nature cell biology* **11**: 644-651

## Figure Legends

**Fig 1.** PP2A-B55 and PP1 but not Fcp1 are required for a correct meiotic exit. **(A)** CSF extracts were first used for immunodepletion with control ( $\Delta$ CT) or anti-Fcp1 antibodies ( $\Delta$ Fcp1) and subsequently forced to exit meiosis by Erp1 immunodepletion. Immunodepletion efficacy of Fcp1 and Erp1 antibodies is shown by western blot in CSF extracts and supernatants (SN). Dephosphorylation of Gwl, Cdc27 and Cdc25 was determined by western blot at the indicated times after Erp1 depletion by changes in the mobility shift of these proteins. Phosphorylation of Mapk was checked by using anti-phospho-Erk antibodies (pErk). Cyclin B degradation and cyclin B-Cdk1 activity (H1K) are also shown. **(B)** Interphase extracts were immunodepleted of Cdc27 and mitotic entry was then induced by the addition of human Cyclin A (30 nM final concentration). A sample of this extract was then recovered to check substrate phosphorylation ( $\Delta$ Cdc27+CycA). Forty minutes later, extracts were first depleted with control or Fcp1 antibodies and subsequently devoid of Cdk activity by immunodepletion. Samples were then recovered at the indicated time-points and the phosphorylation of Gwl and Cdc25 as well as the levels of cyclin B and the activity of cyclin B-Cdk1 were examined. Efficacy of immunodepletion of Cdc27 and

Cdk1 antibodies is shown. **(C)** CSF extracts were or not supplemented with the K72M mutant form of Gwl (GwlK72M) (0.1  $\mu$ g in 10  $\mu$ l of CSF extracts) and mitotic exit was then promoted by Erp1 depletion. The levels of phosphorylation of xenopus Gwl and the stability of cyclin B were assessed by western blot. The amount of cyclin B from 1  $\mu$ l of an interphase egg extract prepared 40 minutes after ionophore addition is shown (right panel). **(D)** Sperm nuclei and tubulin-rhodamine were added to CSF extracts supplemented or not with GwlK72M. Sixty minutes later a constitutive form of CamK2 was added to promote CSF exit. After fixation of the samples (60 and 80 minutes after CamKII addition) with 1% formaldehyde containing DAPI (1  $\mu$ g/ml), 1  $\mu$ l-sample was used to visualise chromatin condensation and spindle formation by light microscopy. Scale bar, 15  $\mu$ m **(E)** CSF extracts were depleted or not of PP1 and supplemented with Camk2 in order to induce mitotic exit. Samples were removed at the indicated times and Gwl phosphorylation and cyclin B degradation monitored by western blot. PP1 or control depletions were obtained by a pull down approach in CSF extracts that were or not supplemented with a 6His-tagged protein containing the PP1 binding site of NIPP1 (NIPP1 PD). Efficacy of PP1 depletion is shown. Spindle formation and chromatin condensation in PP1 depleted extracts were observed by microscopy as indicated in (D) except that a control or a PP1 depletion instead of GwlK72M addition was performed. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Fig 2.** PP2A-B55 inhibition upon meiotic and mitotic exit promotes the stabilisation of Gwl phosphorylation on Thr194. **(A)** CSF extracts were supplemented with either wild type (hGwl) or K72M mutant of human Gwl (GwlK72M) and 20 minutes later immunodepleted of Erp1 protein. Samples were removed at the indicated time-points to study the dephosphorylation of Gwl on S875 and Thr194 with phospho-antibodies directed against these sites. ECL chemiluminescence signals of both phospho-antibodies at a short (-) and a long (+) exposure time are shown. Cyclin B stability, cyclin B-Cdk1 activity and phosphorylation of PP1 on Thr320 are also depicted.. The activity of ectopic human Gwl was measured as indicated in Materials and Methods in CSF extracts supplemented with human Gwl or GwlK72M 60 minutes after Erp1 depletion. Asterisk denote non-specific band. **(B)** 2  $\mu$ g of ThioHis-Arpp19 were added to 20  $\mu$ l of CSF extracts and after 20 minute-incubation ThioArpp19 was recovered by His pull-down. The levels of Arpp19 and PP2A B55 and C subunits left in the supernatant were assessed by western blot. **(C)** As in (A) except that Thio-phosphorylated His-Arpp19 (2  $\mu$ g for 20  $\mu$ l of CSF extracts) instead of GwlK72M was added. **(D)** CSF extracts were supplemented with GwlK72M and depleted first of Erp1 and subsequently of

Arpp19. Phosphorylation of the indicated residues of Gwl was analysed as well as cyclin B degradation and cyclin B-Cdk1 activity. Efficacy of Arpp19 depletion is shown. **(E)** Interphase extracts were devoid of Cdc27 by immunodepletion and induced to enter into mitosis by GwlK72M addition. Forty minutes later, extracts were first forced to exit mitosis by Cdk1 depletion and subsequently devoid of Arpp19 or not by immunoprecipitation. Phosphorylation on S875 and Thr194 of Gwl and Thr320 of PP1 as well as cyclin B levels and cyclin B-Cdk1 activity are shown. Asterisks denote non-specific bands of the antibodies.

**Fig 3.** PP1 depletion prevents Gwl inactivation upon meiotic and mitotic exit by maintaining its phosphorylation on S875. **(A)** CSF extracts supplemented with human wild type Gwl were or not devoid of PP1 prior Erp1 depletion and the phosphorylation of the indicated sites of Gwl as well as cyclin B degradation and cyclin B-Cdk1 activity assessed by western blot.. Activity of human Gwl was measured as described in Materials and Methods in CSF and interphase extracts and compared to the one obtained in CSF (depleted or not of PP1) 60 minutes after Erp1 immunoprecipitation. **(B)** As for (A) but except that PP1 depletion was induced by pull-down after the addition of 6His-I2 instead of 6His peptide binding domain of NIPP1 to the extracts. **(C)** The PP1 pull-down, the supernatant and the CSF extracts supplemented with 6His-NIPP1 binding domain were assessed for the levels of PP1 and PP2A A and C subunits. **(D)** CSF extracts were first depleted of PP1 and subsequently depleted of Gwl. The phosphorylation of Cdc27, Cdc25, Tyrosine 15 of Cdk1 and the levels of cyclin B and H1K activity were monitored by western blot. **(E)** CSF extracts were depleted of PP1 and subsequently of Arpp19. The phosphorylation of the two activatory sites of Gwl as well as the levels of cyclin B and the activity of cyclin B-Cdk1 are shown. **(F)** Interphase extracts were depleted of Cdc27 and subsequently forced to enter into mitosis by the addition of cyclin A. Extracts were then depleted or not of PP1, supplemented with human Gwl and forced to exit mitosis by Cdk1 immunoprecipitation. Part of PP1-Cdk1 depleted extracts was subsequently devoid of Arpp19 and the phosphorylation on the different residues of Gwl and cyclin B stability and H1K activity were measured. Human Gwl activity was measured in extracts depleted or not of PP1 60 minutes after Cdks immunoprecipitation and compared to the one obtained in CSF and interphase extracts supplemented with the same amount of this ectopic kinase. Asterisks denote non-specific bands of the antibodies.

**Fig 4.** PP1 and PP2A-B55 both dephosphorylate Gwl on Thr194 and S875 in vitro. **(A)** Interphase extracts were depleted of Cdc27, supplemented with GwlK72M, devoid of PP1 and Cdks by immunoprecipitation and finally depleted or not of Arpp19. Phosphorylation of S875 and Thr194 of Gwl as well as the stability of cyclin B and the activity of the cyclin B-

Cdk1 complex are shown. **(B)** Phosphorylated human Gwl and active PP2A were obtained by GST pull-down and immunoprecipitation from CSF and interphase extracts respectively and incubated together with or without ThioArpp19 at room temperature for a dephosphorylation assay. Samples were recovered at the indicated times and monitored for phosphorylation of Gwl on S875 and Thr194. Protein levels of Gwl and PP2A A and C subunits were also assessed. **(C)** Dephosphorylation assay as for (A) except that active PP1 was obtained by His pull-down from interphase extracts supplemented with ectopic 6His-PP1 and that NIPPI1 inhibitor instead of ThioArpp19 was used. Asterisks denote non-specific bands of the antibodies. **(D)** Working model showing the mechanisms by which cyclin B degradation promotes Gwl inactivation and mitotic exit. Full arrows represents active pathway in mitotic exit; dashed arrows: inactive pathway in mitotic exit.

**Ma et al. Expanded View Table 1: Antibodies used in the study**

TARGET	SPECIES	SUPPLIER
Human Gwl	Rabbit	Burgess et al. PNAS (2010)
Xenopus Cdc27	Rabbit	Lorca et al. JCS (2010)
Xenopus Cdc25	Rabbit	Lorca et al. JCS (2010)
Phospho-Tyr-15	Rabbit	Cell signalling Technology
pErk	Mouse	New England Biolabs (9106S, Beverly, MA)
Xenopus Gwl	Rabbit	Vigneron et al. EMBO J (2009)
Xenopus Arpp19	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with a synthetic peptide of the last 11 aminoacids of this protein
Xenopus Cyclin B2	Rabbit	Abrieu et al. EMBO J (1997)
Xenopus Erp1	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with the GST-Xenopus Erp1 protein
PP2A/A	Rat	Cell Signalling Technology (cat 2260)
PP2A/C	Rabbit	Upstain/Millipore (cat 05-421)
PP1	Mouse	Kindly gift of Dr M Bollen
Xenopus FCP1	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with a synthetic peptide of the last 11 aminoacids of this protein
Human Cyclin A	Rabbit	Purified human cyclin A protein
Xenopus Cdk1	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with a synthetic peptide of the last 11 aminoacids of this protein
PhosphoThr320 of PP1	Rabbit Monoclonal	Abcam (cat ab62334)
Xenopus PP2A/B55 $\delta$	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with GST-full length Xenopus B55 $\delta$ protein
pS875 human Gwl	Rabbit	Vigneron et al. (MCB 2011)
p194 human Gwl	Rabbit	Obtained by immunization of rabbits with the peptide described in Hegarat et al. (PLoS Genetics 2014)

## Ma et al. : Expanded View Table 2: Plasmids used in the study

Construct	Restriction site	SUPPLIER
pET7F1-human Cyclin A		Generous gift of G Draetta. Lorca et al. (JCS 1992)
pFastBac-GST-hGWL-K72M	BamHI-NotI	Vigneron et al. (MCB 2011)
pFastBac-GST-hGWL	BamHI-NotI	Vigneron et al. (MCB 2011)
pET28A-6His-Xenopus I2	EcoRI-XhoI	PCR fragment amplified from Xenopus ovary cDNA with specific primers
pET15-6His-Xenopus Arpp19	NdeII-BamHI	PCR fragment amplified from Xenopus ovary cDNA with specific primers

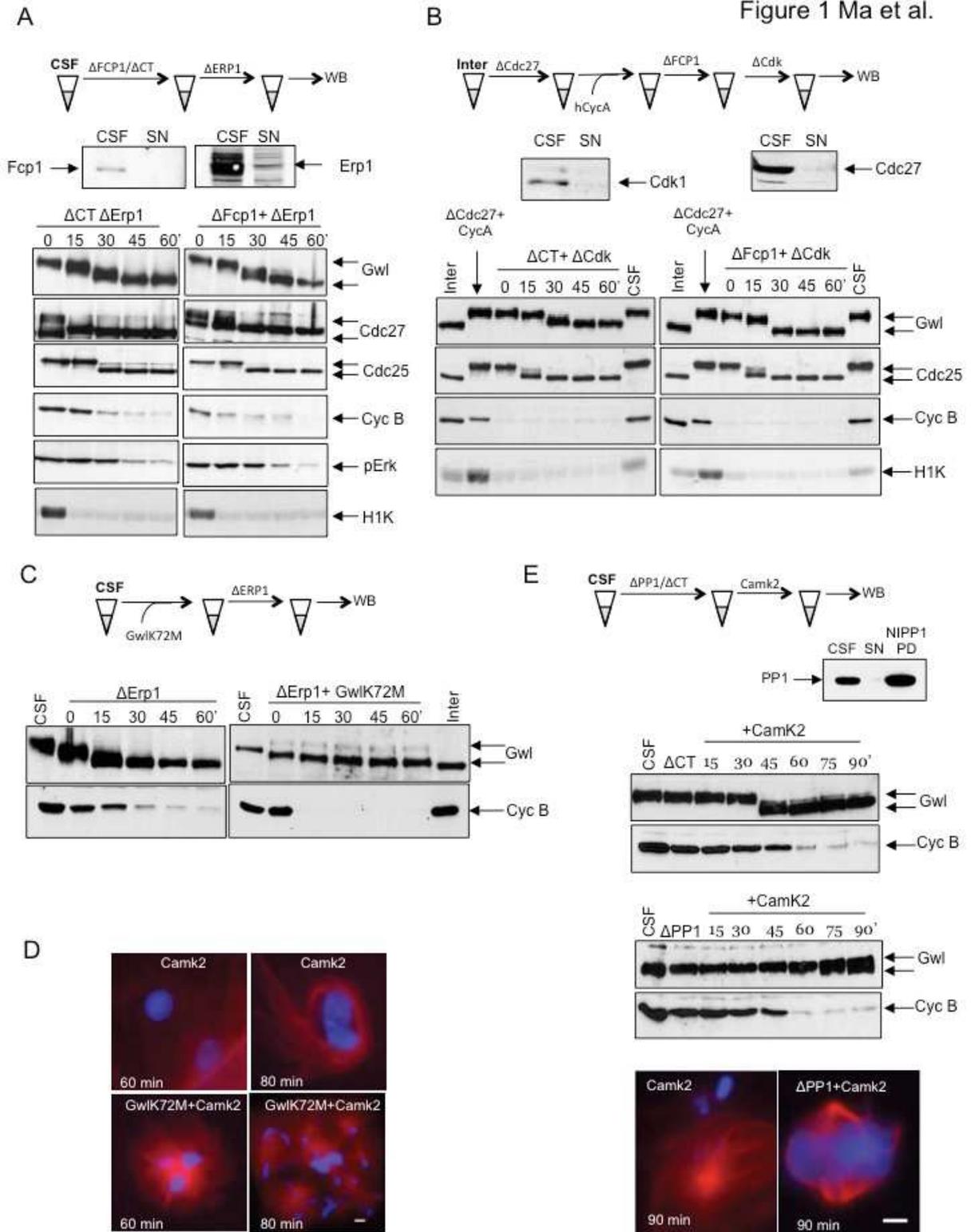
## References

1. Abrieu A, Fisher D, Simon MN, Doree 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
2. Burgess A, Vigneron S, Brioude E, Labbe JC, Lorca T, Castro A (2010) Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12564-12569
3. Hegarat N, Vesely C, Vinod PK, Ocasio C, Peter N, Gannon J, Oliver AW, Novak B, Hochegger H (2014) PP2A/B55 and Fcp1 regulate Greatwall and Ensa dephosphorylation during mitotic exit. *PLoS genetics* **10**: e1004004
4. Lorca T, Bernis C, Vigneron S, Burgess A, Brioude E, Labbe JC, Castro A (2010) Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway

is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle.

*Journal of cell science* **123**: 2281-2291

5. Vigneron S, Brioude E, Burgess A, Labbe JC, Lorca T, Castro A (2009) Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *The EMBO journal* **28**: 2786-2793
  
6. Vigneron S, Gharbi-Ayachi A, Raymond AA, Burgess A, Labbe JC, Labesse G, Monsarrat B, Lorca T, Castro A (2011) Characterization of the mechanisms controlling Greatwall activity. *Molecular and cellular biology* **31**: 2262-2275



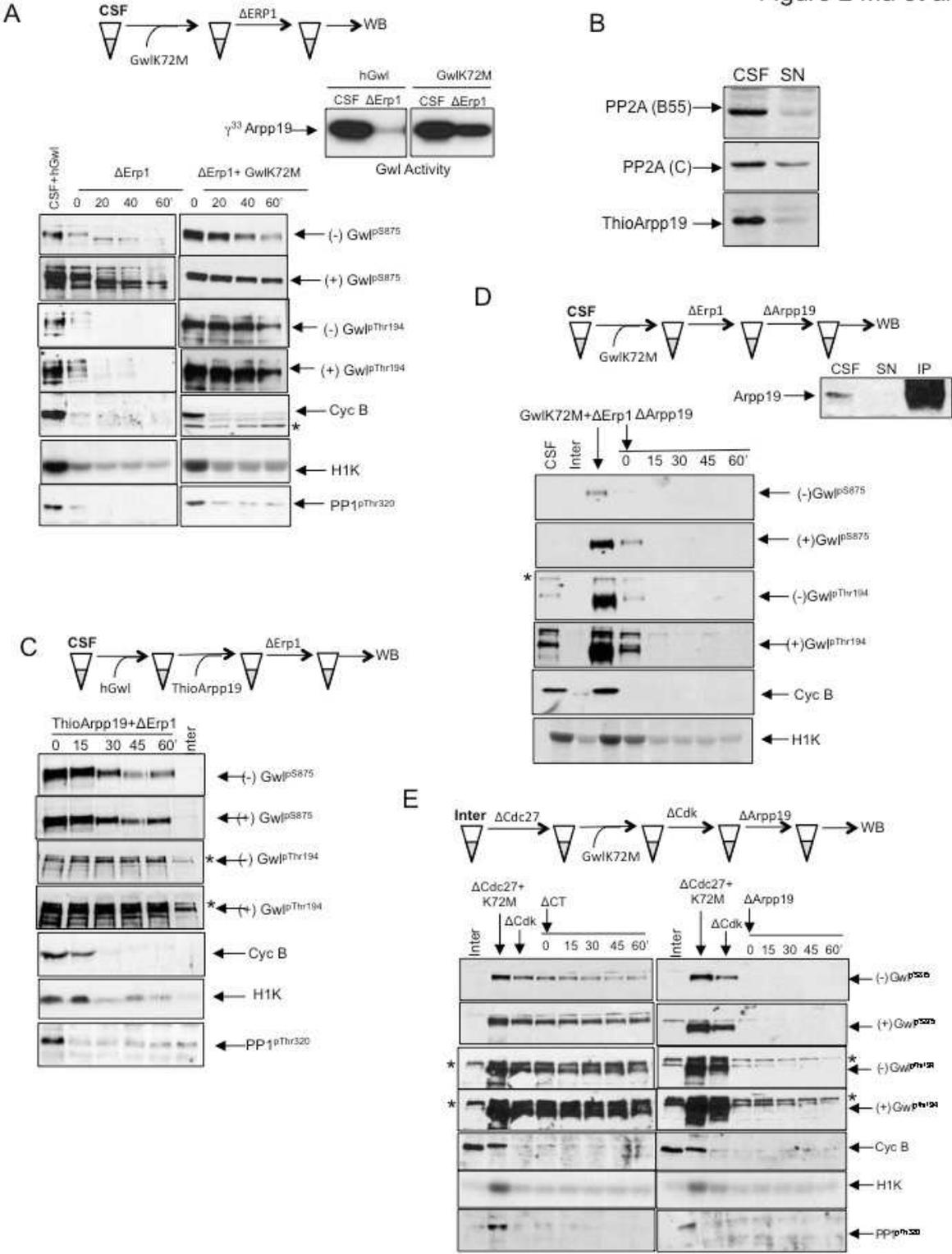
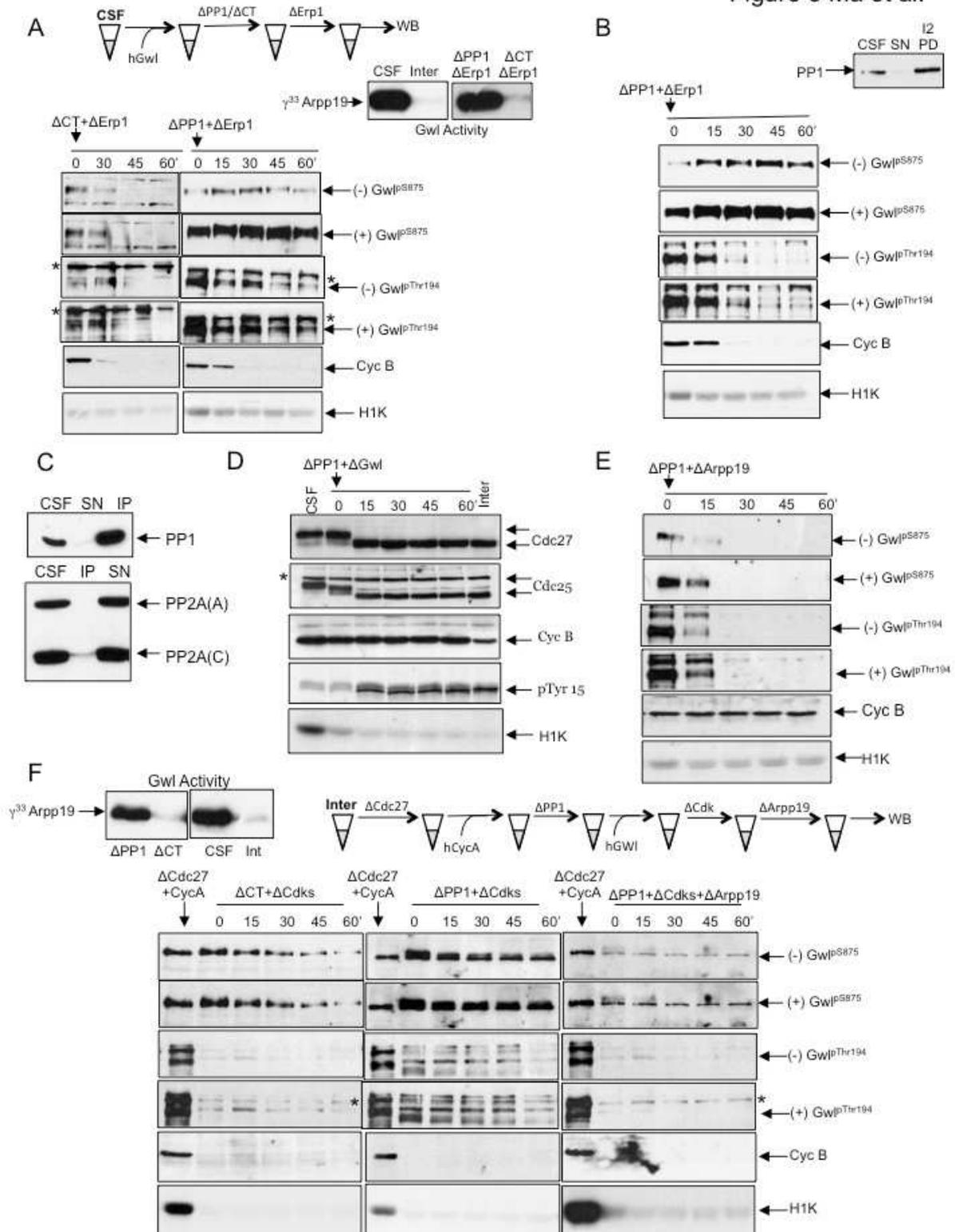
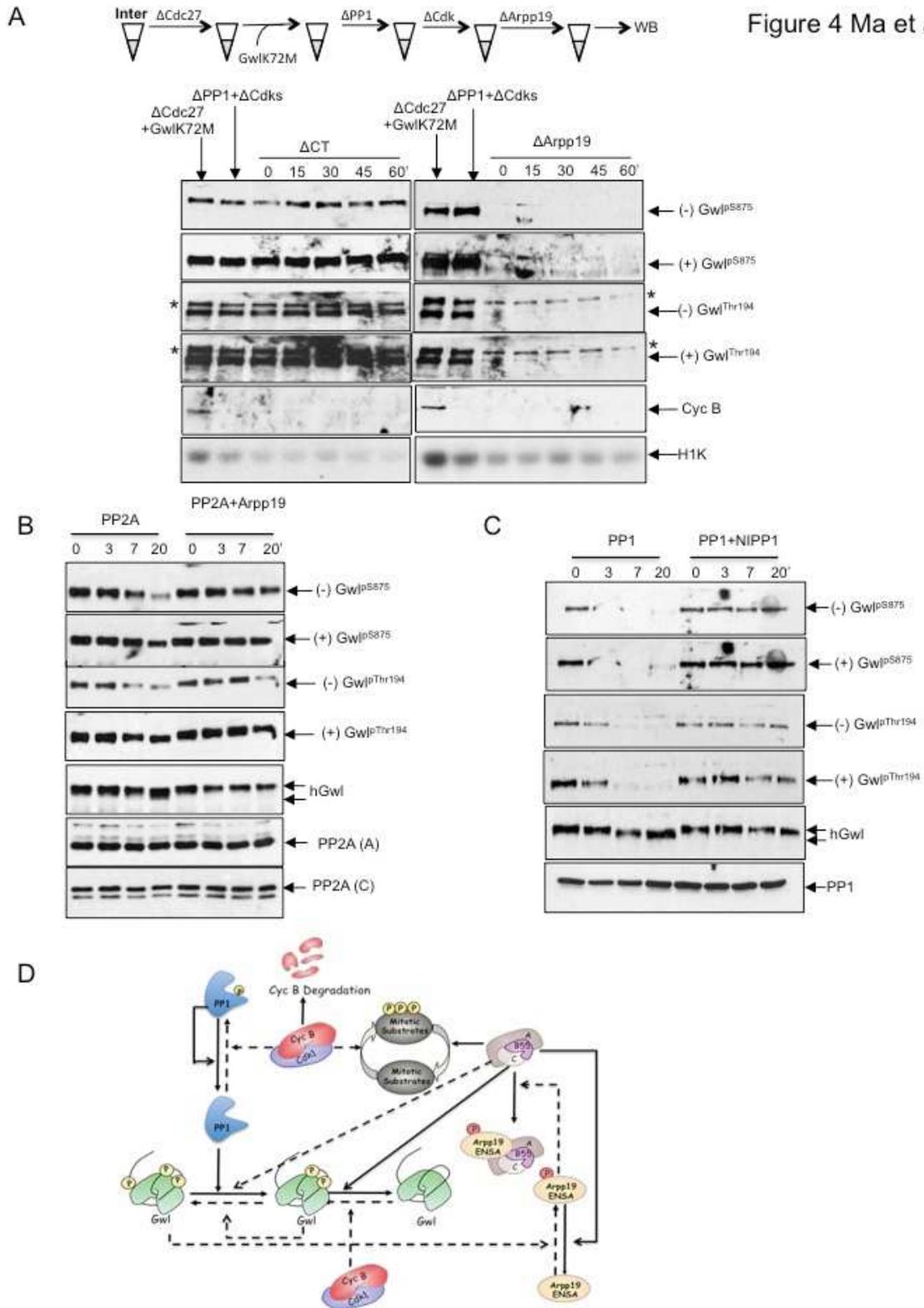


Figure 3 Ma et al.





## **Discussion**

L'entrée en mitose nécessite la phosphorylation d'un grand nombre de protéines impliquées dans d'importants processus tels que la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes ou encore l'assemblage du fuseau mitotique. Ces mécanismes sont principalement régulés par le complexe Cdk1/cycline B, ou MPF, à la transition G2/M. Cependant, le paradigme qui soutenait que l'entrée en mitose repose uniquement sur l'activation de la kinase mitotique Cdk1/cycline B a récemment évolué pour laisser une place importante au rôle des phosphatases dans ce processus. La protéine phosphatase 2A est la principale phosphatase qui déphosphoryle les substrats du complexe Cdk1/cycline B. L'activité de la PP2A-B55 est forte en interphase et faible en mitose, exactement opposée à l'activité de Cdk1/cycline B. Ces deux activités opposées constituent un équilibre précis qui régule l'entrée et la progression de la mitose. PP2A est un hétérotrimère composé d'une sous-unité C catalytique, d'une sous-unité A d'ancrage et d'une sous-unité B variable qui confère la spécificité de substrat. Chez le xénope, il a été démontré en immunodéplétant les différentes sous-unités de la PP2A que l'hétérotrimère qui contrebalance l'activité de Cdk1/cycline B au cours de la mitose correspond à la PP2A-B55 $\delta$  (Mochida et al, 2009). Récemment, la kinase Greatwall nous a permis de déchiffrer les mécanismes qui contrôlent l'inhibition de la PP2A à l'entrée de la mitose. Greatwall induit l'entrée en phase M en inhibant la PP2A, mais sans que cela ne se fasse de façon directe (Vigneron et al, 2009). Greatwall inhibe la PP2A via la phosphorylation et l'activation d'une protéine Arpp19, ou ENSA, qui endosse alors le rôle d'inhibiteur de la phosphatase. Arpp19 et ENSA ne se lient à la PP2A pour l'inhiber que si elles ont préalablement été phosphorylées par Greatwall. Cela pourrait se faire par un changement de conformation de la PP2A une fois son inhibiteur lié à elle ou alors par la modification de structure de son inhibiteur qui pourrait gêner l'activité de la phosphatase (Gharbi et al, 2010).

Greatwall est nécessaire pour l'entrée et le maintien de l'état mitotique. En effet, l'activation de Cdk1/cycline B dépend elle-même de l'activation de Greatwall (Lorca et al, 2010). Lorsque le MPF est maintenu à l'état actif par déplétion de ses inhibiteurs Wee1 et Myt1 à partir d'extraits CSF, l'élimination de Greatwall entraîne la déphosphorylation des substrats mitotiques suggérant que le MPF ne peut phosphoryler ses substrats que si la PP2A est inhibée et donc Greatwall activé (Vigneron et al, 2009).

À la sortie de mitose, la perte d'activité de Cdk1/cycline B suite à la dégradation de la cycline B est nécessaire mais non suffisante. Les phosphoprotéines mitotiques doivent être aussi

déphosphorylées. Chez la levure, la déphosphorylation des phosphoprotéines mitotiques est catalysée par la phosphatase Cdc14 (Bouchoux and Uhlmann, 2011). Chez le xénope, nous avons montré que ce sont les phosphatases PP1 et PP2AB55 qui jouent le rôle de façon complémentaire. L'inhibition de Greatwall est aussi nécessaire pour la sortie de mitose. En effet, nos résultats montrent qu'une forme active de Greatwall empêche que la sortie de mitose ne se réalise complètement.

Nous avons vu que Greatwall est phosphorylée au cours de l'entrée en mitose. Ces phosphorylations sont nécessaires pour que Greatwall acquière son activité kinase et sa fonction. Les deux sites majeurs sont la thréonine 194 (T-loop) et la Sérine 875 dans la partie c-terminale de la protéine. Il a été proposé que la kinase Cdk1-Cycline B puisse phosphoryler Greatwall dans la T-loop. Cela permet ensuite à Greatwall de s'auto-phosphoryler sur sa partie C-terminale. Ce n'est que lorsque Greatwall est doublement phosphorylé qu'il possède sa pleine activité. Cependant, peu de choses étaient connues sur le mécanisme d'inactivation de cette kinase. Mes résultats montrent que l'inactivation de Greatwall est une étape indispensable à une sortie normale de mitose. En effet, l'utilisation d'une forme active de Greatwall qui maintient PP2AB55 majoritairement inactivée ne permet plus d'obtenir une sortie de mitose et cela en l'absence d'activité Cdk et de cyclines mitotiques. Nous montrons que l'ADN reste condensé et nous savons que de nombreux substrats restent phosphorylés totalement ou partiellement et que cela peut être corrélé avec le maintien de certaines activités kinases (Aurora B, Plk).

C'est dans ce cadre que nous avons montré que la protéine phosphatase PP1 amorce la déphosphorylation de Greatwall lorsque la dégradation des cyclines se met en place. Cela s'explique tout d'abord parce que Cdk1-cycline B phosphoryle négativement PP1 sur la Thr 320 et que PP1 peut s'auto-déphosphoryler. La baisse de l'activité Cdk qui se produit lors de la dégradation des cyclines permet à PP1 de s'auto-déphosphoryler et de s'activer. L'inhibition de PP1, par élimination de cette phosphatase à partir des extraits d'œufs de xénope, stabilise la phosphorylation de Greatwall sur la sérine 875. La phosphorylation de la T-loop est moins sensible à PP1 puisque ce site se déphosphoryle même si cela se produit lentement. Toutefois, dans nos expériences nous n'avons pas pu identifier l'isoforme de PP1 requis pour cette déphosphorylation. Nous savons que PP1 peut exister sous la forme de 3 isoformes (PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta/\delta$ , PP1 $\gamma$ ). Lorsque nous éliminons PP1 à l'aide de la protéine NIPPI1 (plus précisément la partie de liaison à PP1) nous éliminons l'ensemble des isoformes. De

plus, Il n'est pas possible de répondre à cette question avec les outils disponibles au sein de notre laboratoire ou bien dans la communauté scientifique. Les anticorps disponibles détectent la protéine PP1 mais ils sont incapables de lier PP1 pour l'immuno-précipiter. Par contre, nous pouvons envisager de caractériser cette isoforme en utilisant les cellules de mammifères en culture. L'utilisation de siRNA spécifique de chaque isoforme pourrait nous permettre premièrement de confirmer nos résultats sur un modèle mammifère et deuxièmement de caractériser l'isoforme principale responsable de la déphosphorylation de Greatwall sur la Sérine 875. Des expériences d'immunofluorescence utilisant un phospho-anticorps de la sérine 875 et un Anticorps PP1 pourrait aussi nous montrer si à la transition métaphase/anaphase Greatwall phosphorylé et PP1 co-localise.

D'un autre coté, La déphosphorylation du site 875 n'est pas suffisante. En effet, nous montrons que l'inhibition de la PP2AB55 stabilise la déphosphorylation du site 194. Dans ces expériences nous montrons aussi que le site 875 n'est pas stabilisé. Toutefois, la déphosphorylation n'est pas normale. On remarque que cette déphosphorylation se déroule mais lentement. Cela s'explique par le fait que Greatwall phosphoryle sur la Thr 194 maintien un certain niveau d'activité kinase et garde sa propriété d'auto-phosphorylation. Dans nos conditions expérimentales PP1 s'active et cela permet de mettre en place un équilibre entre la déphosphorylation du site 875 par PP1 et l'auto-phosphorylation par Greatwall. Cela mérite d'être démontré plus en détail. En effet, nous ne savons pas si l'auto-phosphorylation de Greatwall est affectée lorsque la PP1 est active et la PP2A inhibée (condition expérimentale « extrait + Gwl K72M ou + Arpp19 thio-P). Ce que nous savons c'est que la double inhibition de PP1 et PP2AB55 maintien parfaitement les deux phosphorylations sur les sites 194 et 875. Par conséquent, pour répondre à notre question, il faudrait pouvoir mesurer cette activité d'auto-phosphorylation dans différentes conditions. Par exemple, il nous faudrait comparer cette activité d'auto-phosphorylation dans une condition normale lorsque l'on induit la dégradation des cyclines avec une situation in vitro lorsque nous phosphorylons le site 194 et suivons la phosphorylation sur le site 875 et enfin, notre situation expérimentale avec une inhibition de PP2AB55. Ce type d'expérience pourrait nous apporter des informations sur notre hypothèse qui veut que PP1 soit la primo phosphatase responsable de la première vague d'inactivation de Greatwall. Ceci est aussi basé sur les connaissances que nous avons sur ce mécanisme de transduction. Lors de la métaphase greatwall est actif, phosphoryle Arpp19/Ensa qui inhibent PP2AB55. Lorsque la dégradation des cyclines ne met en place, Greatwall ne peut commencer à s'inactiver, et

permettre que la déphosphorylation des substrats commence, que si une phosphatase est capable de le déphosphoryler. Hors, à ce moment précis de la mitose PP2AB55 est inhibée. Par contre, PP1 peut être cette phosphatase car elle commence à s'activer dès que la dégradation des cyclines et l'inactivation de Cdk se mettent en place.

Bien entendu, si notre modèle est vrai et que nos expériences reflètent une certaine vérité, il sera très intéressant de pouvoir utiliser ce même modèle pour caractériser les substrats et les sites de phosphorylation spécifiques de chacune des phosphatases. Pour cela, nous pouvons tout d'abord suivre ces substrats soit en analysant leur migration électrophorétique ou bien en utilisant des phospho-anticorps. Il faudra bien entendu s'appuyer sur des données obtenues en phospho spectrométrie de masse. En effet, nous savons que l'inhibition de PP2AB55 permet de maintenir un niveau de phosphorylation de la protéine Cdc25C. Celle-ci est phosphorylée sur de nombreux sites et il sera intéressant de déterminer quels sites sont maintenus lorsque l'activité Cdk est perdue et que l'activité phosphatase de PP2AB55 est maintenue. La caractérisation de ces sites nous donnera la possibilité d'associer l'activité phosphatase de Cdc25 en utilisant comme substrat des complexes Cdk1-Cycline phosphorylée sur les Thréonine 14 et Tyrosine 15 par la protéine kinase Wee1. Il nous faudra, immédiatement après, démontrer que PP2AB55 peut déphosphoryler ces sites que l'on vient de lui attribuer. Cette démonstration nécessite la préparation d'un complexe PP2AB55 fonctionnel. Cela est maintenant possible au laboratoire car nous produisons chacune des 3 sous unités dans deux systèmes : bactérien et baculovirus.

Pour terminer, il nous faudrait vérifier que l'inhibition des deux phosphatases PP1 et PP2AB55 sont suffisantes pour maintenir l'ensemble des phosphorylations des substrats phosphorylés lors de la mitose. Pour répondre à ces question, nous pourrons utiliser notre système des extraits d'œufs de xénope en inhibant PP1 et PP2AB55 et en induisant dégradation de cyclines et inactivation de la kinase Cdk1.

La réponse à ces questions permettra d'apporter une partie des informations manquantes qui sont nécessaires à la compréhension des mécanismes et évènements qui conduisent les divisions cellulaires. D'autre part, la caractérisation des substrats de PP2AB55 nous permettra aussi déterminer l'existence ou pas de motifs requis dans la reconnaissance PP2AB55-substrats.

## Références

- Abrieu, a, T Brassac, S Galas, D Fisher, J C Labbé, and M Dorée. 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 ( Pt 12): 1751–57.
- Aggen, J B, a C Nairn, and R Chamberlin. 2000. "Regulation of Protein Phosphatase-1." *Chemistry & Biology* 7 (1): R13–23.
- Allen, P B, C C Ouimet, and P Greengard. 1997. "Spinophilin, a Novel Protein Phosphatase 1 Binding Protein Localized to Dendritic Spines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (18): 9956–61.
- Alonso, Andres, Joanna Sasin, Nunzio Bottini, Ilan Friedberg, Iddo Friedberg, Andrei Osterman, Adam Godzik, Tony Hunter, Jack Dixon, and Tomas Mustelin. 2004. "Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome." *Cell* 117 (6): 699–711.
- Andreassen, P R, F B Lacroix, E Villa-Moruzzi, and R L Margolis. 1998. "Differential Subcellular Localization of Protein Phosphatase-1 Alpha, gamma1, and Delta Isoforms during Both Interphase and Mitosis in Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 141 (5): 1207–15.
- Anjum, Rana, and John Blenis. 2008. "The RSK Family of Kinases: Emerging Roles in Cellular Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (10): 747–58.
- Archambault, J, R S Chambers, M S Kobor, Y Ho, M Cartier, D Bolotin, B Andrews, C M Kane, and J Greenblatt. 1997. "An Essential Component of a C-Terminal Domain Phosphatase That Interacts with Transcription Factor IIF in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14300–305.
- Archambault, Vincent, and David M Glover. 2009. "Polo-like Kinases: Conservation and Divergence in Their Functions and Regulation." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (4): 265–75.
- Arino, J, C W Woon, D L Brautigan, T B Miller, and G L Johnson. 1988. "Human Liver Phosphatase 2A: cDNA and Amino Acid Sequence of Two Catalytic Subunit Isoforms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (12): 4252–56.
- Ariño, Joaquín. 2002. "Novel Protein Phosphatases in Yeast: An Update." *European Journal of Biochemistry* 269 (4): 1072–77.
- Awumey, E M, B S Moonga, B R Sodam, a P Koval, O a Adebanjo, M Kumegawa, M Zaidi, and S Epstein. 1999. "Molecular and Functional Evidence for Calcineurin-A Alpha and Beta Isoforms in the Osteoclast: Novel Insights into Cyclosporin A Action on Bone Resorption." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254 (1): 248–52.
- Baharians, Zora, and Axel H. Schönthal. 1998. "Autoregulation of Protein Phosphatase Type 2A Expression." *Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 19019–24.
- Baldin, V, and B Ducommun. 1995. "Subcellular Localisation of Human wee1 Kinase Is Regulated during the Cell Cycle." *Journal of Cell Science* 108 ( Pt 6): 2425–32.
- Baldin, V, J Lukas, M J Marcote, M Pagano, and G Draetta. 1993. "Cyclin D1 Is a Nuclear Protein Required for Cell Cycle Progression in G1." *Genes & Development* 7 (5): 812–21.
- Barford, D. 1995. "Protein Phosphatases." *Current Opinion in Structural Biology* 5 (6): 728–34.
- Barford, D. 1996. "Molecular Mechanisms of the Protein Serine Threonine Phosphatases." *Trends Biochem Sci* 21 (11): 407–12.

- Bettencourt-Dias, M, R Giet, R Sinka, a Mazumdar, Wg Lock, F Balloux, Pj Zafiroopoulos, et al. 2004. "Genome-Wide Survey of Protein Kinases Required for Cell Cycle Progression.," no. cdc.
- Bollen, M. 2001. "Combinatorial Control of Protein Phosphatase-1." *Trends in Biochemical Sciences* 26 (7): 426–31.
- Bollen, Mathieu, Daniel W. Gerlich, and Bart Lesage. 2009. "Mitotic Phosphatases: From Entry Guards to Exit Guides." *Trends in Cell Biology* 19 (10): 531–41.
- Bollen, Mathieu, Wolfgang Peti, Michael J. Ragusa, and Monique Beullens. 2010. "The Extended PP1 Toolkit: Designed to Create Specificity." *Trends in Biochemical Sciences* 35 (8): 450–58.
- Bosch, M., X. Cayla, C. Van Hoof, B. a. Hemmings, R. Ozon, W. Merlevede, and J. Goris. 1995. "The PR55 and PR65 Subunits of Protein Phosphatase 2A from *Xenopus Laevis* - Molecular Cloning and Developmental Regulation of Expression." *European Journal of Biochemistry* 230 (3): 1037–45.
- Boutros, Rose, Christine Dozier, and Bernard Ducommun. 2006. "The When and Wheres of CDC25 Phosphatases." *Current Opinion in Cell Biology* 18 (2): 185–91.
- Braun, T, E Bober, M a Rudnicki, R Jaenisch, and H H Arnold. 1994. "MyoD Expression Marks the Onset of Skeletal Myogenesis in Myf-5 Mutant Mice." *Development (Cambridge, England)* 120 (11): 3083–92.
- Brazil, Derek P., Zhong Zhou Yang, and Brian a. Hemmings. 2004. "Advances in Protein Kinase B Signalling: AKTion on Multiple Fronts." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (5): 233–42.
- Burgess, Andrew, Suzanne Vigneron, Estelle Brioudes, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca, and Anna Castro. 2010. "Loss of Human Greatwall Results in G2 Arrest and Multiple Mitotic Defects due to Dereglulation of the Cyclin B-Cdc2/PP2A Balance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (28): 12564–69.
- Ceulemans, Hugo, and Mathieu Bollen. 2004. "Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button." *Physiological Reviews* 84 (1): 1–39.
- Ceulemans, Hugo, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 2002. "Regulator-Driven Functional Diversification of Protein Phosphatase-1 in Eukaryotic Evolution." *BioEssays* 24 (4): 371–81.
- Chambers, R S, and C M Kane. 1996. "Purification and Characterization of an RNA Polymerase II Phosphatase from Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24498–504.
- Chambers, Ross S., and Michael E. Dahmus. 1994. "Purification and Characterization of a Phosphatase from HeLa Cells Which Dephosphorylates the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II." *Journal of Biological Chemistry* 269 (42): 26243–48.
- Chen, Dongrong, Caroline R M Wilkinson, Stephen Watt, Christopher J Penkett, W Mark Toone, Nic Jones, and Jürg Bähler. 2008. "Multiple Pathways Differentially Regulate Global Oxidative Stress Responses in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 19 (1): 308–17.
- Chen, Rey Huei. 2002. "BubR1 Is Essential for Kinetochore Localization of Other Spindle Checkpoint Proteins and Its Phosphorylation Requires Mad1." *Journal of Cell Biology* 158 (3): 487–96.
- Cheng, a, N M Dean, and R E Honkanen. 2000. "Serine/threonine Protein Phosphatase Type 1gamma1 Is Required for the Completion of Cytokinesis in Human A549 Lung Carcinoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (3): 1846–54.
- Cheng, Yih-shyun E, and Lan Bo Chen. 1983. "Characterization of a Phosphotyrosyl" 258 (12): 7852–57.

- Cho, Helen, Tae-kyung Kim, Helena Mancebo, William S Lane, Osvaldo Flores, and Danny Reinberg. 1999. "A Protein Phosphatase Functions to Recycle RNA Polymerase II A Protein Phosphatase Functions to Recycle RNA Polymerase II," 1540–52.
- Cho, Uhn Soo, and Wenqing Xu. 2007. "Crystal Structure of a Protein Phosphatase 2A Heterotrimeric Holoenzyme." *Nature* 445 (7123): 53–57.
- Clarke, P R, I Hoffmann, G Draetta, and E Karsenti. 1993. "Dephosphorylation of cdc25-C by a Type-2A Protein Phosphatase: Specific Regulation during the Cell Cycle in Xenopus Egg Extracts." *Molecular Biology of the Cell* 4 (4): 397–411.
- Cohen, Patricia T W. 1997. "Novel Protein Serine/threonine Phosphatases: Variety Is the Spice of Life." *Trends in Biochemical Sciences* 22 (7): 245–51.
- Devault, a, a M Martinez, D Fesquet, J C Labbé, N Morin, J P Tassan, E a Nigg, J C Cavadore, and M Dorée. 1995. "MAT1 ('menage À Trois') a New RING Finger Protein Subunit Stabilizing Cyclin H-cdk7 Complexes in Starfish and Xenopus CAK." *The EMBO Journal* 14 (20): 5027–36.
- Dickman, M B, and O Yarden. 1999. "Serine/threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi." *Fungal Genetics and Biology : FG & B* 26 (2): 99–117.
- Drachman, J G, G P Jarvik, and M G Mehaffey. 2000. "Autosomal Dominant Thrombocytopenia: Incomplete Megakaryocyte Differentiation and Linkage to Human Chromosome 10." *Blood* 96 (1): 118–25.
- Draviam, Viji Mythily, Simona Orrechia, Martin Lowe, Ruggero Pardi, and Jonathon Pines. 2001. "The Localization of Human Cyclins B1 and B2 Determines CDK1 Substrate Specificity and Neither Enzyme Requires MEK to Disassemble the Golgi Apparatus." *Journal of Cell Biology* 152 (5): 945–58.
- Dudek, Steven M, Eddie T Chiang, Sara M Camp, Yurong Guo, Jing Zhao, Mary E Brown, Patrick a Singleton, et al. 2010. "Abl Tyrosine Kinase Phosphorylates Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase to Regulate Endothelial Barrier Function." *Molecular Biology of the Cell* 21 (22): 4042–56.
- Duesbery, Nicholas S., and George F. Vande Woude. 1998. "Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes." *Biology of the Cell* 90 (6-7): 461–66.
- Dulić, V, E Lees, and S I Reed. 1992. "Association of Human Cyclin E with a Periodic G1-S Phase Protein Kinase." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5078): 1958–61.
- Dunphy, W G, and a Kumagai. 1991. "The cdc25 Protein Contains an Intrinsic Phosphatase Activity." *Cell* 67 (1): 189–96.
- Egloff, Marie-Pierre, Deborah F Johnson, Greg Moorhead, Patricia T W Cohen, Philip Cohen, and David Barford. 1997. "Structural Basis for the Recognition of Regulatory Subunits by the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1." *The EMBO Journal* 16 (8): 1876–87.
- Elia, Andrew E H, Peter Rellos, Lesley F. Haire, Jerry W. Chao, Frank J. Ivins, Katja Hoepker, Duaa Mohammad, Lewis C. Cantley, Stephen J. Smerdon, and Michael B. Yaffe. 2003. "The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain." *Cell* 115 (1): 83–95.
- Emanuele, Michael J, Weijie Lan, Miri Jwa, Stephanie a Miller, Clarence S M Chan, and P Todd Stukenberg. 2008. "Aurora B Kinase and Protein Phosphatase 1 Have Opposing Roles in Modulating Kinetochores Assembly." *The Journal of Cell Biology* 181 (2): 241–54.
- Esteves, Sara L.C., Sara C. Domingues, Odete a.B. da Cruz e Silva, Margarida Fardilha, and Edgar F. da Cruz e Silva. 2012. "Protein Phosphatase 1 $\alpha$  Interacting Proteins in the Human Brain." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16 (1-2): 3–17.

- Fardilha, Margarida, Sara L C Esteves, Luís Korrodi-Gregório, Ana Paula Vintém, Sara C. Domingues, Sandra Rebelo, Nick Morrice, Patricia T W Cohen, Odete a B Da Cruz E Silva, and Edgar F. Da Cruz E Silva. 2011. "Identification of the Human Testis Protein Phosphatase 1 Interactome." *Biochemical Pharmacology* 82 (10): 1403–15.
- Fayard, Elisabeth, Lionel a Tintignac, Anne Baudry, and Brian a Hemmings. 2005. "Protein Kinase B/Akt at a Glance." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 24): 5675–78.
- Félix, M a, P Cohen, and E Karsenti. 1990. "Cdc2 H1 Kinase Is Negatively Regulated by a Type 2A Phosphatase in the *Xenopus* Early Embryonic Cell Cycle: Evidence from the Effects of Okadaic Acid." *The EMBO Journal* 9 (3): 675–83.
- Feng, B., and P. M. Stemmer. 2001. "Ca<sup>2+</sup> Binding Site 2 in Calcineurin-B Modulates Calmodulin-Dependent Calcineurin Phosphatase Activity." *Biochemistry* 40 (30): 8808–14.
- Feng, Bo, and Paul M. Stemmer. 1999. "Interactions of Calcineurin A, Calcineurin B, and Ca<sup>2+</sup>." *Biochemistry* 38 (38): 12481–89.
- Feng, Zhehui, Susan E. Wilson, Zao Yuan Peng, Keith K. Schlender, Erwin M. Reimann, and Robert J. Trumbly. 1991. "The Yeast *GLC7* Gene Required for Glycogen Accumulation Encodes a Type 1 Protein Phosphatase." *Journal of Biological Chemistry* 266 (35): 23796–801.
- Ferguson, Angela M, Lynn S White, Peter J Donovan, Helen Piwnica-worms, Ferguson E T Al, and M O L C E L L B Iol. 2005. "Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking *Cdc25B* and *Cdc25C* Protein Phosphatases." *Society* 25 (7): 2853–60.
- Fernandez, a., D. L. Brautigan, and N. J C Lamb. 1992. "Protein Phosphatase Type 1 in Mammalian Cell Mitosis: Chromosomal Localization and Involvement in Mitotic Exit." *Journal of Cell Biology* 116 (6): 1421–30.
- Fesquet, D, J C Labbé, J Derancourt, J P Capony, S Galas, F Girard, T Lorca, J Shuttleworth, M Dorée, and J C Cavadore. 1993. "The *MO15* Gene Encodes the Catalytic Subunit of a Protein Kinase That Activates *cdc2* and Other Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) through Phosphorylation of Thr161 and Its Homologues." *The EMBO Journal* 12 (8): 3111–21.
- Frödin, Morten, Torben L. Antal, Bettina a. Dümmler, Claus J. Jensen, Maria Deak, Steen Gammeltoft, and Ricardo M. Biondi. 2002. "A Phosphoserine/threonine-Binding Pocket in AGC Kinases and PDK1 Mediates Activation by Hydrophobic Motif Phosphorylation." *EMBO Journal* 21 (20): 5396–5407.
- G, Manning, Plowman Gd, Hunter T, and Sudarsanam S. 2002. "Evolution of Protein Kinase Signaling from Yeast to Man." *Trends in Biochemical Sciences* 27 (10): 514–20.
- García-Gimeno, Maria Adelaida, Iván Muñoz, Joaquín Ariño, and Pascual Sanz. 2003. "Molecular Characterization of *Ypi1*, a Novel *Saccharomyces Cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 47744–52.
- Gautier, J, C Norbury, M Lohka, P Nurse, and J Maller. 1988. "Purified Maturation-Promoting Factor Contains the Product of a *Xenopus* Homolog of the Fission Yeast Cell Cycle Control Gene *cdc2+*." *Cell* 54 (3): 433–39.
- Gautier, J, M J Solomon, R N Booher, J F Bazan, and M W Kirschner. 1991. "Cdc25 Is a Specific Tyrosine Phosphatase That Directly Activates P34Cdc2." *Cell* 67 (1): 197–211.
- Gavet, Olivier, and Jonathon Pines. 2010. "Activation of Cyclin B1-Cdk1 Synchronizes Events in the Nucleus and the Cytoplasm at Mitosis." *Journal of Cell Biology* 189 (2): 247–59.

- Gonzalez, Cayetano, Claudio E. Sunkel, and David M. Glover. 1998. "Interactions between Mgr, Asp, and Polo: Asp Function Modulated by Polo and Needed to Maintain the Poles of Monopolar and Bipolar Spindles." *Chromosoma* 107 (6-7): 452–60.
- Gooch, Jennifer L. 2006. "An Emerging Role for Calcineurin A Alpha in the Development and Function of the Kidney." *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, no. 11: 769–76.
- Gooch, Jennifer L, Yves Gorin, Bin-Xian Zhang, and Hanna E Abboud. 2004. "Involvement of Calcineurin in Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Regulation of Extracellular Matrix Accumulation." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 15561–70.
- Götz, J, a Probst, E Ehler, B Hemmings, and W Kues. 1998. "Delayed Embryonic Lethality in Mice Lacking Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit Calpha." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12370–75.
- Grallert, Agnes, Elvan Boke, Anja Hagting, Ben Hodgson, and Yvonne Connolly. 2015. "Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A PP1 / PP2A Phosphatase Relay Controls Mitotic Progression" *M* (7532): 94–98.
- Green, D D, S I Yang, and M C Mumby. 1987. "Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Catalytic Subunit of Bovine Type 2A Protein Phosphatase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (14): 4880–84.
- Groves, Matthew R., Neil Hanlon, Patric Turowski, Brian a. Hemmings, and David Barford. 1999. "The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs." *Cell* 96 (1): 99–110.
- Guo, Chang Y., David L. Brautigan, and James M. Larner. 2002. "Ionizing Radiation Activates Nuclear Protein Phosphatase-1 by ATM-Dependent Dephosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41756–61.
- Hagting, Anja, Christina Karlsson, Paul Clute, Mark Jackman, and Jonathon Pines. 1998. "MPF Localization Is Controlled by Nuclear Export." *EMBO Journal* 17 (14): 4127–38.
- Hanks, S K, and Tony Hunter. 1995. "Protein Kinases 6. The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (catalytic) Domain Structure and Classification." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (8): 576–96.
- Hartwell, L H, and T a Weinert. 1989. "Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events." *Science (New York, N.Y.)* 246 (4930): 629–34.
- Hauge, Camilla, Torben L Antal, Daniel Hirschberg, Ulrik Doehn, Katrine Thorup, Leila Idrissova, Klaus Hansen, et al. 2007. "Mechanism for Activation of the Growth Factor-Activated AGC Kinases by Turn Motif Phosphorylation." *The EMBO Journal* 26 (9): 2251–61.
- Heald, R, M McLoughlin, and F McKeon. 1993. "Human wee1 Maintains Mitotic Timing by Protecting the Nucleus from Cytoplasmically Activated Cdc2 Kinase." *Cell* 74 (3): 463–74.
- Hégarat, Nadia, Clare Vesely, P. K. Vinod, Cory Ocasio, Nisha Peter, Julian Gannon, Antony W. Oliver, Béla Novák, and Helfrid Hochegger. 2014. "PP2A/B55 and Fcp1 Regulate Greatwall and Ensa Dephosphorylation during Mitotic Exit." *PLoS Genetics* 10 (1).
- Hendrickx, Annick, Monique Beullens, Hugo Ceulemans, Tom Den Abt, Aleyde Van Eynde, Emilia Nicolaescu, Bart Lesage, and Mathieu Bollen. 2009. "Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1." *Chemistry and Biology* 16 (4). Elsevier Ltd: 365–71.

- Heroes, Ewald, Bart Lesage, Janina Görnemann, Monique Beullens, Luc Van Meervelt, and Mathieu Bollen. 2013. "The PP1 Binding Code: A Molecular-Lego Strategy That Governs Specificity." *FEBS Journal* 280 (2): 584–95.
- Hilioti, Zoe, and Kyle W. Cunningham. 2003. "The RCN Family of Calcineurin Regulators." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (4): 1089–93.
- Hilioti, Zoe, Deirdre a. Gallagher, Shalini T. Low-Nam, Priya Ramaswamy, Pawel Gajer, Tami J. Kingsbury, Christine J. Birchwood, Andre Levchenko, and Kyle W. Cunningham. 2004. "GSK-3 Kinases Enhance Calcineurin Signaling by Phosphorylation of RCNs." *Genes and Development* 18 (1): 35–47.
- Hoffmann, I, P R Clarke, M J Marcote, E Karsenti, and G Draetta. 1993. "Phosphorylation and Activation of Human cdc25-C by cdc2--Cyclin B and Its Involvement in the Self-Amplification of MPF at Mitosis." *The EMBO Journal* 12 (1): 53–63.
- Hoffmann, I, G Draetta, and E Karsenti. 1994. "Activation of the Phosphatase Activity of Human cdc25A by a cdk2-Cyclin E Dependent Phosphorylation at the G1/S Transition." *The EMBO Journal* 13 (18): 4302–10.
- Hsu, J Y, Z W Sun, X Li, M Reuben, K Tatchell, D K Bishop, J M Grushcow, 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 (3): 279–91.
- Huai, Qing, Hwa-Young Kim, Yudong Liu, Yingdong Zhao, Angelo Mondragon, Jun O Liu, and Hengming Ke. 2002. "Crystal Structure of Calcineurin-Cyclophilin-Cyclosporin Shows Common but Distinct Recognition of Immunophilin-Drug Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12037–42.
- Huse, Morgan, and John Kuriyan. 2002. "The Conformational Plasticity of Protein Kinases." *Cell* 109 (3): 275–82.
- Irniger, S, S Piatti, C Michaelis, and K Nasmyth. 1995. "Genes Involved in Sister Chromatid Separation Are Needed for B-Type Cyclin Proteolysis in Budding Yeast." *Cell* 81 (2): 269–78.
- Ishii, Kojiro. 1994. "Of Potential in Regulation" 13 (22): 5310–18.
- Ito, Hiromi, Yuhei Koyama, Makoto Takano, Kohei Ishii, Mitsugu Maeno, Kazuhiro Furukawa, and Tsuneyoshi Horigome. 2007. "Nuclear Envelope Precursor Vesicle Targeting to Chromatin Is Stimulated by Protein Phosphatase 1 in Xenopus Egg Extracts." *Experimental Cell Research* 313 (9): 1897–1910.
- Izumi, T, D H Walker, and J L Maller. 1992. "Periodic Changes in Phosphorylation of the Xenopus cdc25 Phosphatase Regulate Its Activity." *Molecular Biology of the Cell* 3 (8): 927–39.
- Jackman, M, M Firth, and J Pines. 1995. "Human Cyclins B1 and B2 Are Localized to Strikingly Different Structures: B1 to Microtubules, B2 Primarily to the Golgi Apparatus." *The EMBO Journal* 14 (8): 1646–54.
- Janssens, V, and J Goris. 2001. "Phosphatases Implicated in Cell Growth and Signalling." *Society* 439 (Pt 3): 417–39.
- Jinno, Shigeki, Kimihiko Sutol, Akihisa Nagata, Makoto Igarashi, Yoshihide Kanaoka, and Hiroshi Nojima. 1994. "Is Cell Cycle" 13 (7): 1549–56.
- Johnson, H Jan, Manish J Gandhi, Ebrahim Shafizadeh, Nathaniel B Langer, L Eric, Barry H Paw, Diana M Gilligan, and Jonathan G Drachman. 2010. "NIH Public Access" 37 (8): 901–8.
- Johnson, Sam a, and Tony Hunter. 2005. "Kinomics: Methods for Deciphering the Kinome." *Nature Methods* 2 (1): 17–25.

- Jones, S W, E Erikson, J Blenis, J L Maller, and R L Erikson. 1988. "A Xenopus Ribosomal Protein S6 Kinase Has Two Apparent Kinase Domains That Are Each Similar to Distinct Protein Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (10): 3377–81.
- Karaïskou, a, X Cayla, O Haccard, C Jessus, and R Ozon. 1998. "MPF Amplification in Xenopus Oocyte Extracts Depends on a Two-Step Activation of cdc25 Phosphatase." *Experimental Cell Research* 244 (2): 491–500.
- Karaïskou, a, C Jessus, T Brassac, and R Ozon. 1999. "Phosphatase 2A and Polo Kinase, Two Antagonistic Regulators of cdc25 Activation and MPF Auto-Amplification." *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 21): 3747–56.
- Karaïskou, Anthi, Anne-Claire Leprêtre, Golbahar Pahlavan, David Du Pasquier, René Ozon, and Catherine Jessus. 2004. "Polo-like Kinase Confers MPF Autoamplification Competence to Growing Xenopus Oocytes." *Development (Cambridge, England)* 131 (7): 1543–52.
- Karlsson, Christina, Stephanie Katich, Anja Hagting, Ingrid Hoffmann, and Jonathon Pines. 1999. "Cdc25B and Cdc25C Differ Markedly in Their Properties as Initiators of Mitosis." *Journal of Cell Biology* 146 (3): 573–83.
- Kim, Young Mi, Takuo Watanabe, Patrick B. Allen, Young Myoung Kim, Shin Jeong Lee, Paul Greengard, Angus C. Nairn, and Young Guen Kwon. 2003. "PNUTS, a Protein Phosphatase 1 (PP1) NUClear Targeting Subunit: Characterization of Its PP1 and RNA-Binding Domains and Regulation by Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13819–28.
- Kimata, Yukio, Yuki I Kimata, Yusuke Shimizu, Hiroshi Abe, Ileana C Farcasanu, Masato Takeuchi, Mark D Rose, and Kenji Kohno. 2003. "Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins." *Molecular Biology of the Cell* 14 (June): 2559–69.
- Kinoshita, N, Hiro Ohkura, and M Yanagida. 1990. "Distinct, Essential Roles of Type 1 and 2A Protein Phosphatases in the Control of the Fission Yeast Cell Division Cycle." *Cell* 63 (2): 405–15.
- Kinoshita, N, H Yamano, H Niwa, T Yoshida, and M Yanagida. 1993. "Negative Regulation of Mitosis by the Fission Yeast Protein Phosphatase ppa2," 1059–71.
- Kobor, M S, L D Simon, J Omichinski, G Zhong, J Archambault, and J Greenblatt. 2000. "A Motif Shared by TFIIF and TFIIB Mediates Their Interaction with the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 20 (20): 7438–49.
- Kobor, Michael S, Jacques Archambault, William Lester, Frank C P Holstege, Opher Gileadi, David B Jansma, Ezra G Jennings, et al. 1999. "Required for Transcription by RNA Polymerase II and CTD Dephosphorylation in *S. Cerevisiae*" 4: 55–62.
- Koff, a, a Giordano, D Desai, K Yamashita, J W Harper, S Elledge, T Nishimoto, D O Morgan, B R Franza, and J M Roberts. 1992. "Formation and Activation of a Cyclin E-cdk2 Complex during the G1 Phase of the Human Cell Cycle." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5077): 1689–94.
- Komander, David, Gursant Kular, Maria Deak, Dario R. Alessi, and D. M F Van Aalten. 2005. "Role of T-Loop Phosphorylation in PDK1 Activation, Stability, and Substrate Binding." *Journal of Biological Chemistry* 280 (19): 18797–802.
- Kondo, Hisayo, Ryoko Kuriyama, and Haruo Kanatani. 1982. "Generality of the Action of Various Factors Maturating-Promoting." *Experimental Cell Research* 137: 121–26.
- Kornbluth, S, B Sebastian, T Hunter, and J Newport. 1994. "Membrane Localization of the Kinase Which Phosphorylates p34cdc2 on Threonine 14." *Molecular Biology of the Cell* 5 (3): 273–82.

- Kumagai, a, and W G Dunphy. 1991. "The cdc25 Protein Controls Tyrosine Dephosphorylation of the cdc2 Protein in a Cell-Free System." *Cell* 64 (5): 903–14.
- Kumagai, a, and W G Dunphy. 1996. "Purification and Molecular Cloning of Plx1, a Cdc25-Regulatory Kinase from *Xenopus* Egg Extracts." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5280): 1377–80.
- Kumagai, a, P S Yakowec, and W G Dunphy. 1998. "14-3-3 Proteins Act as Negative Regulators of the Mitotic Inducer Cdc25 in *Xenopus* Egg Extracts." *Molecular Biology of the Cell* 9 (2): 345–54.
- Kumagai, a., and W. G. Dunphy. 1992. "Regulation of the cdc25 Protein during the Cell Cycle in *Xenopus* Extracts." *Cell* 70 (1): 139–51.
- Kumagai, Akiko, and William G. Dunphy. 1999. "Binding of 14-3-3 Proteins and Nuclear Export Control the Intracellular Localization of the Mitotic Inducer Cdc25." *Genes and Development* 13 (9): 1067–72.
- Kwon, Y G, S Y Lee, Y Choi, P Greengard, and a C Nairn. 1997. "Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of Mammalian Protein Phosphatase 1 by cdc2 Kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2168–73.
- Labbé, J C, J P Capony, D Caput, J C Cavadore, J Derancourt, M Kaghad, J M Lelias, a Picard, and M Dorée. 1989. "MPF from Starfish Oocytes at First Meiotic Metaphase Is a Heterodimer Containing One Molecule of cdc2 and One Molecule of Cyclin B." *The EMBO Journal* 8 (10): 3053–58.
- Landsverk, Helga B, Marie Kirkhus, Mathieu Bollen, Thomas Küntziger, and Philippe Collas. 2005. "PNUTS Enhances in Vitro Chromosome Decondensation in a PP1-Dependent Manner." *The Biochemical Journal* 390 (Pt 3): 709–17.
- Lechward, Katarzyna, Olubunmi S. Awotunde, Wojciech Świątek, and Grazyna Muszyńska. 2001. "Protein Phosphatase 2A: Variety of Forms and Diversity of Functions." *Acta Biochimica Polonica* 48 (4): 921–33.
- Lesage, Bart, Monique Beullens, Leda Pedelini, Maria Adelaida Garcia-Gimeno, Etienne Waelkens, Pascual Sanz, and Mathieu Bollen. 2007. "A Complex of Catalytically Inactive Protein Phosphatase-1 Sandwiched between Sds22 and Inhibitor-3." *Biochemistry* 46 (31): 8909–19.
- Lindqvist, Arne, Helena Källström, Andreas Lundgren, Emad Barsoum, and Christina Karlsson Rosenthal. 2005. "Cdc25B Cooperates with Cdc25A to Induce Mitosis but Has a Unique Role in Activating Cyclin B1-Cdk1 at the Centrosome." *Journal of Cell Biology* 171 (1): 35–45.
- Liu, F, J J Stanton, Z Wu, and H Piwnica-Worms. 1997. "The Human Myt1 Kinase Preferentially Phosphorylates Cdc2 on Threonine 14 and Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex." *Molecular and Cellular Biology* 17 (2): 571–83.
- Liu, Ying, David M Virshup, and Raymond L White. 2002. "Regulation of BRCA1 Phosphorylation by Interaction with Protein Phosphatase 1 A Regulation of BRCA1 Phosphorylation by Interaction with Protein Phosphatase 1  $\mu$  1," 6357–61.
- Lorca, T, D Fesquet, F Zindy, F Le Bouffant, M Cerruti, C Brechot, G Devauchelle, and M Dorée. 1991. "An Okadaic Acid-Sensitive Phosphatase Negatively Controls the Cyclin Degradation Pathway in Amphibian Eggs." *Molecular and Cellular Biology* 11 (2): 1171–75.
- Ludlow, J W, and D a Nelson. 1995. "Control and Activity of Type-1 Serine/threonine Protein Phosphatase during the Cell Cycle." *Seminars in Cancer Biology* 6 (4): 195–202.
- Lundgren, K, N Walworth, R Booher, M Dembski, M Kirschner, and D Beach. 1991. "Mik1 and Wee1 Cooperate in the Inhibitory Tyrosine Phosphorylation of Cdc2." *Cell* 64 (6): 1111–22.

- Manchado, Eusebio, María Guillamot, Guillermo de Cárcer, Manuel Eguren, Michelle Trickey, Irene García-Higuera, Sergio Moreno, Hiroyuki Yamano, Marta Cañamero, and Marcos Malumbres. 2010. "Targeting Mitotic Exit Leads to Tumor Regression In Vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55 $\alpha$ , $\delta$  Phosphatase." *Cancer Cell* 18 (6): 641–54.
- Manning, G, D B Whyte, R Martinez, T Hunter, and S Sudarsanam. 2002. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600): 1912–34.
- Margolis, Seth S., and Sally Kornbluth. 2004. "When the Checkpoints Have Gone: Insights into Cdc25 Functional Activation." *Cell Cycle* 3 (4): 425–28.
- Margolis, Seth S., Susan Walsh, Douglas C. Weiser, Minoru Yoshida, Shirish Shenolikar, and Sally Kornbluth. 2003. "PP1 Control of M Phase Entry Exerted through 14-3-3-Regulated Cdc25 Dephosphorylation." *EMBO Journal* 22 (21): 5734–45.
- Masui, Y. 2001. "From Oocyte Maturation to the in Vitro Cell Cycle: The History of Discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF)." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 69 (1): 1–17.
- McGowan, C H, and P Russell. 1993. "Human Wee1 Kinase Inhibits Cell Division by Phosphorylating p34cdc2 Exclusively on Tyr15." *The EMBO Journal* 12 (1): 75–85.
- Minshull, J, a Straight, a D Rudner, a F Dernburg, a Belmont, and a W Murray. 1996. "Protein Phosphatase 2A Regulates MPF Activity and Sister Chromatid Cohesion in Budding Yeast." *Current Biology : CB* 6 (12): 1609–20.
- Miranda, Kildare, Douglas a Pace, Roxana Cintron, Juliany C F Rodrigues, Jianmin Fang, Alyssa Smith, Peter Rohloff, et al. 2011. "NIH Public Access" 76 (6): 1358–75.
- Mochida, Satoru, Satoshi Ikeo, Julian Gannon, and Tim Hunt. 2009. "Regulated Activity of PP2A-B55 Delta Is Crucial for Controlling Entry into and Exit from Mitosis in Xenopus Egg Extracts." *The EMBO Journal* 28 (18). Nature Publishing Group: 2777–85.
- Mueller, P R, T R Coleman, and W G Dunphy. 1995. "Cell Cycle Regulation of a Xenopus Wee1-like Kinase." *Molecular Biology of the Cell* 6 (1): 119–34.
- Mueller, Paul R, Thomas R Coleman, Akiko Kumagai, and William G Dunphy. 1995. "Myti: A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2" 270 (October).
- Nakojima, Hiroyuki, Fumiko Toyoshima-Morimoto, Eri Taniguchi, and Eisuke Nishida. 2003. "Identification of a Consensus Motif for PK (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate." *Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25277–80.
- Nasmyth, Kim, and Christian H Haering. 2005. "The Structure and Function of SMC and Kleisin Complexes." *Annual Review of Biochemistry* 74: 595–648.
- Nigavekar, Shraddha S., Y. S H Tan, and John F. Cannon. 2002. "Glc8 Is a Glucose-Repressible Activator of Glc7 Protein Phosphatase-1." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 404 (1): 71–79.
- Niida, Hiroyuki, and Makoto Nakanishi. 2006. "DNA Damage Checkpoints in Mammals." *Mutagenesis* 21 (1): 3–9.
- Ohkura, H, Y Adachi, N Kinoshita, O Niwa, T Toda, and M Yanagida. 1988. "Cold-Sensitive and Caffeine-Supersensitive Mutants of the Schizosaccharomyces Pombe Dis Genes Implicated in Sister Chromatid Separation during Mitosis." *The EMBO Journal* 7 (5): 1465–73.

- Ohkura, H, N Kinoshita, S Miyatani, T Toda, and M Yanagida. 1989. "The Fission Yeast *dis2+* Gene Required for Chromosome Disjoining Encodes One of Two Putative Type 1 Protein Phosphatases." *Cell* 57 (6): 997–1007.
- Oliveria, Seth F., Lisa L. Gomez, and Mark L. Dell'Acqua. 2003. "Imaging Kinase-AKAP79-Phosphatase Scaffold Complexes at the Plasma Membrane in Living Cells Using FRET Microscopy." *Journal of Cell Biology* 160 (1): 101–12.
- Pagano, M, R Pepperkok, F Verde, W Ansorge, and G Draetta. 1992. "Cyclin A Is Required at Two Points in the Human Cell Cycle." *The EMBO Journal* 11 (3): 961–71.
- Papadopoulos, V, a S Brown, and P F Hall. 1989. "Isolation and Characterisation of Calcineurin from Adrenal Cell Cytoskeleton: Identification of Substrates for Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Dependent Phosphatase Activity." *Molecular and Cellular Endocrinology* 63 (1-2): 23–38.
- Parker, L L, and H Piwnica-Worms. 1992. "Inactivation of the p34cdc2-Cyclin B Complex by the Human WEE1 Tyrosine Kinase." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5078): 1955–57.
- Peng, Aimin, Ling Wang, and Laura a. Fisher. 2011. "Greatwall and Polo-like Kinase 1 Coordinate to Promote Checkpoint Recovery." *Journal of Biological Chemistry* 286 (33): 28996–4.
- Peng, Aimin, Tomomi M. Yamamoto, Michael L. Goldberg, and James L. Maller. 2010. "A Novel Role for Greatwall Kinase in Recovery from DNA Damage." *Cell Cycle* 9 (21): 4364–69.
- Perdiguero, Eusebio, and Angel R. Nebreda. 2004. "Regulation of Cdc25C Activity during the Meiotic G2/M Transition." *Cell Cycle* 3 (6): 733–37.
- Perry, Jennifer a, and Sally Kornbluth. 2007. "Cdc25 and Wee1: Analogous Opposites?" *Cell Division* 2: 12.
- Peters, Jan Michael. 1998. "SCF and APC: The Yin and Yang of Cell Cycle Regulated Proteolysis." *Current Opinion in Cell Biology* 10 (6): 759–68.
- Picard, A, J P Capony, D L Brautigam, and M Dor. 1989. "Involvement of Protein Phosphatases 1 and 2A in the Control of M Phase- Promoting Factor Activity in Starfish." *The Journal of Cell Biology* 109 (6): 3347–54.
- Pii, Pergamon, Great Britain, Suming Masakazu, Kobayashit Kong, and Fujisawa Pharmaceutical Co. 1997. "Tissue and Cellular Distribution." *Science* 34 (8): 663–69.
- Poon, R Y, and T Hunter. 1995. "Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the Cyclin-Dependent Kinase-Interacting Phosphatase KAP in the Absence of Cyclin." *Science (New York, N.Y.)* 270 (5233): 90–93.
- Qian, Junbin, Bart Lesage, Monique Beullens, Aleyde Van Eynde, and Mathieu Bollen. 2011. "PP1/repo-Man Dephosphorylates Mitotic Histone H3 at T3 and Regulates Chromosomal Aurora B Targeting." *Current Biology* 21 (9). Elsevier Ltd: 766–73.
- Rebelo, Sandra, Mariana Santos, Filipa Martins, Edgar F. da Cruz e Silva, and Odete a.B. da Cruz e Silva. 2015. *Protein Phosphatase 1 Is a Key Player in Nuclear Events. Cellular Signalling*. Elsevier B.V.
- Ruediger, R, M Hentz, J Fait, M Mumby, and G Walter. 1994. "Molecular Model of the A Subunit of Protein Phosphatase 2A: Interaction with Other Subunits and Tumor Antigens." *Journal of Virology* 68 (1): 123–29.
- Ruediger, R, D Roedel, J Fait, a Bergqvist, G Magnusson, and G Walter. 1992. "Identification of Binding Sites on the Regulatory A Subunit of Protein Phosphatase 2A for the Catalytic C Subunit and for Tumor Antigens of Simian Virus 40 and Polyomavirus." *Molecular and Cellular Biology* 12 (11): 4872–82.

- Russell, P, and P Nurse. 1987. "Negative Regulation of Mitosis by *wee1+*, a Gene Encoding a Protein Kinase Homolog." *Cell* 49 (4): 559–67.
- Seitz, D. P., M. K. Pasha, B. Singh, a. Chu, and R. K. Sharma. 2002. "Localization and Characterization of Calcineurin in Bovine Eye." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43 (1): 15–21.
- Shenolikar, S. 1994. "Protein Serine/threonine Phosphatases--New Avenues for Cell Regulation." *Annual Review of Cell Biology* 10: 55–86.
- Shi, Yigong. 2009. "Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure." *Cell* 139 (3): 468–84.
- Silberman, S R, M Speth, R Nemani, M K Ganapathi, V Dombradi, H Paris, and E Y Lee. 1984. "Isolation and Characterization of Rabbit Skeletal Muscle Protein Phosphatases C-I and C-II." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (5): 2913–22.
- Solomon, M J, J W Harper, and J Shuttleworth. 1993. "CAK, the p34cdc2 Activating Kinase, Contains a Protein Identical or Closely Related to p40MO15." *The EMBO Journal* 12 (8): 3133–42.
- Solomon, M J, T Lee, and M W Kirschner. 1992. "Role of Phosphorylation in p34cdc2 Activation: Identification of an Activating Kinase." *Molecular Biology of the Cell* 3 (1): 13–27.
- Stark, Michael J R. 1996. "Yeast Protein Serine/threonine Phosphatases: Multiple Roles and Diverse Regulation." *Yeast* 12 (16): 1647–75.
- Steen, Rikke L., Sandra B. Martins, Kjetil Taskén, and Philippe Collas. 2000. "Recruitment of Protein Phosphatase 1 to the Nuclear Envelope by A-Kinase Anchoring Protein AKAP149 Is a Prerequisite for Nuclear Lamina Assembly." *Journal of Cell Biology* 150 (6): 1251–61.
- Su, Q., M. Zhao, E. Weber, H. P. Eugster, and B. Ryffel. 1995. "Distribution and Activity of Calcineurin in Rat Tissues - Evidence for Post-Transcriptional Regulation of Testis-Specific Calcineurin B." *European Journal of Biochemistry* 230 (2): 469–74.
- Sudakin, V, D Ganoth, a Dahan, H Heller, J Hershko, F C Luca, J V Ruderman, and a Hershko. 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 (2): 185–97.
- Sunkara, P S, D a Wright, and P N Rao. 1979. "Mitotic Factors from Mammalian Cells Induce Germinal Vesicle Breakdown and Chromosome Condensation in Amphibian Oocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (6): 2799–2802.
- Tanuma, Nobuhiro, Sei Eun Kim, Monique Beullens, Yao Tsubaki, Shinya Mitsuhashi, Miyuki Nomura, Takeshi Kawamura, et al. 2008. "Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPP1) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-Associated Protein 155 (Sap155)." *Journal of Biological Chemistry* 283 (51): 35805–14.
- Terry-Lorenzo, Ryan T., Elizabeth Elliot, Douglas C. Weiser, Todd D. Prickett, David L. Brautigan, and Shirish Shenolikar. 2002. "Neurabins Recruit Protein Phosphatase-1 and Inhibitor-2 to the Actin Cytoskeleton." *Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 46535–43.
- Thompson, Larry J, Mathieu Bollen, P Fields, and Alan P Fields. 1997. "Identification of Protein Phosphatase 1 as a Mitotic Lamin Phosphatase Identification of Protein Phosphatase 1 as a Mitotic Lamin Phosphatase \*." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (47): 29693–97.
- Toyoshima-Morimoto, Fumiko, Eri Taniguchi, and Eisuke Nishida. 2002. "Plk1 Promotes Nuclear Translocation of Human Cdc25C during Prophase." *EMBO Reports* 3 (4): 341–48.

- Trinkle-Mulcahy, Laura, Jens Andersen, Wah Lam Yun, Greg Moorhead, Matthias Mann, and Angus I. Lamond. 2006. "Repo-Man Recruits PP1?? To Chromatin and Is Essential for Cell Viability." *Journal of Cell Biology* 172 (5): 679–92.
- Tumlin, J a. 1997. "Expression and Function of Calcineurin in the Mammalian Nephron: Physiological Roles, Receptor Signaling, and Ion Transport." *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 30 (6): 884–95.
- Venter, J Craig, Mark D Adams, Eugene W Myers, Peter W Li, Richard J Mural, Granger G Sutton, Hamilton O Smith, et al. 2001a. "The Sequence of the Human Genome." *Science* 291 (5507): 1304–51.
- Vidal, Anxo, and Andrew Koff. 2000. "Cell-Cycle Inhibitors: Three Families United by a Common Cause." *Gene* 247 (1-2): 1–15.
- Vigneron, Suzanne, Estelle Brioudes, Andrew Burgess, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca, and Anna Castro. 2009. "Greatwall Maintains Mitosis through Regulation of PP2A." *The EMBO Journal* 28 (18): 2786–93.
- Virshup, David M. 2000. "Protein Phosphatase 2A: A Panoply of Enzymes." *Current Opinion in Cell Biology* 12 (2): 180–85.
- Visconti, Roberta, Luca Palazzo, Rosa Della Monica, and Domenico Grieco. 2012. "Fcp1-Dependent Dephosphorylation Is Required for M-Phase-Promoting Factor Inactivation at Mitosis Exit." *Nature Communications* 3 (May). Nature Publishing Group: 894.
- Voets, Erik, and Rob M F Wolthuis. 2010. "MASTL Is the Human Orthologue of Greatwall Kinase That Facilitates Mitotic Entry, Anaphase and Cytokinesis." *Cell Cycle* 9 (17): 3591–3601.
- Wadzinski, Brian E., Bartholomew J. Eisfelder, Leonard F. Peruski, Marc C. Mumby, and Gary L. Johnson. 1992. "NH<sub>2</sub>-Terminal Modification of the Phosphatase 2A Catalytic Subunit Allows Functional Expression in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 267 (24): 16883–88.
- Wang, Peng, Xavier Pinson, and Vincent Archambault. 2011. "Pp2a-Twins Is Antagonized by Greatwall and Collaborates with Polo for Cell Cycle Progression and Centrosome Attachment to Nuclei in Drosophila Embryos." *PLoS Genetics* 7 (8).
- Wera, Stefaan, and Brian A Hemmingst. 1995. "Serine / Threonine Protein Phosphatases" 29: 17–29.
- Wilkins, Benjamin J., Yan Shan Dai, Orlando F. Bueno, Stephanie a. Parsons, Jian Xu, David M. Plank, Fred Jones, Thomas R. Kimball, and Jeffery D. Molkentin. 2004. "Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but Not Physiological, Cardiac Hypertrophy." *Circulation Research* 94 (1): 110–18.
- Wilkins, Benjamin J., and Jeffery D. Molkentin. 2004. "Calcium-Calcineurin Signaling in the Regulation of Cardiac Hypertrophy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (4): 1178–91.
- Williams, Byron C., Joshua J. Filter, Kristina a. Blake-Hodek, Brian E. Wadzinski, Nicholas J. Fuda, David Shalloway, and Michael L. Goldberg. 2014. "Greatwall-Phosphorylated Endosulfine Is Both an Inhibitor and a Substrate of PP2A-B55 Heterotrimers." *eLife* 2014 (3): 1–34.
- Wozniak, E, S Ołdziej, and J Ciarkowski. 2000. "Molecular Modeling of the Catalytic Domain of Serine/threonine Phosphatase-1 with the Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> Di-Nuclear Ion Centers in the Active Site." *Computers & Chemistry* 24 (3-4): 381–90.
- Wu, Judy Qiju, Jessie Yanxiang Guo, Wanli Tang, Chih-sheng Yang, D Freel, Chen Chen, Angus C Nairn, and Sally Kornbluth. 2010. "NIH Public Access." *Cell* 11 (5): 644–51.

- Xu, Yanhui, Yongna Xing, Yu Chen, Yang Chao, Zheng Lin, Eugene Fan, Jong W. Yu, Stefan Strack, Philip D. Jeffrey, and Yigong Shi. 2006. "Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme." *Cell* 127 (6): 1239–51.
- Yanagida, Mitsuhiro. 1996. "Cyclosome / APC for the Onset of Anaphase Is Lessened by the Dosage Increase of a Novel Gene." *EMBO Journal* 15 (23): 6629–40.
- Yang, S. a., and C. B. Klee. 2000. "Low Affinity Ca<sup>2+</sup>-Binding Sites of Calcineurin B Mediate Conformational Changes in Calcineurin A." *Biochemistry* 39 (51): 16147–54.
- Yu, Jiangtao, Shawna L. Fleming, Byron Williams, Erika V. Williams, ZeXiao Li, Patrizia Somma, Conly L. Rieder, and Michael L. Goldberg. 2004. "Greatwall Kinase: A Nuclear Protein Required for Proper Chromosome Condensation and Mitotic Progression in *Drosophila*." *Journal of Cell Biology* 164 (4): 487–92.
- Yu, Jiangtao, Yong Zhao, ZeXiao Li, Simon Galas, and Michael L. Goldberg. 2006. "Greatwall Kinase Participates in the Cdc2 Autoregulatory Loop in *Xenopus* Egg Extracts." *Molecular Cell* 22 (1): 83–91.
- Zeitlin, Samantha G., Richard D. Shelby, and Kevin F. Sullivan. 2001. "CENP-A Is Phosphorylated by Aurora B Kinase and Plays an Unexpected Role in Completion of Cytokinesis." *Journal of Cell Biology* 155 (7): 1147–57.
- Zhou, Jin, Huong T. Pham, Ralf Ruediger, and Gernot Walter. 2003. "Characterization of A $\alpha$  and A $\beta$  Subunit Isoforms of PP2A: Differences in Expression, Subunit Interaction, and Evolution." *The Biochemical Journal* 369: 387–98.
- Zolnierowicz, Stanislaw. 2000. "Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways." *Biochemical Pharmacology* 60 (8): 1225–35.