



HAL
open science

De nouveaux modes de régulation d'ARPP19 éclairent la reprise de la méiose de l'ovocyte : une étude croisée chez la méduse et l'amphibien

Ferdinand Meneau

► **To cite this version:**

Ferdinand Meneau. De nouveaux modes de régulation d'ARPP19 éclairent la reprise de la méiose de l'ovocyte : une étude croisée chez la méduse et l'amphibien. *Biologie du développement*. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS363 . tel-04347669

HAL Id: tel-04347669

<https://theses.hal.science/tel-04347669>

Submitted on 15 Dec 2023

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.

Sorbonne Université

ED515 – Complexité du vivant

UMR7622-Laboratoire de biologie du développement / Biologie de l'ovocyte

De nouveaux modes de régulation d'ARPP19 éclairent la reprise de la méiose de l'ovocyte : une étude croisée chez la méduse et l'amphibien

Par **Ferdinand Meneau**

Thèse de doctorat de biologie cellulaire

Dirigée par Catherine Jessus et Marika Miot

Présentée et soutenue publiquement le 22/09/2023

Devant un jury composé de :

Dr Julien Dumont	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr Thierry Lorca	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr Evelyn Houliston	Directrice de recherche	Présidente du jury
Dr Fabienne Pituello	Directrice de recherche	Examinatrice
Dr Jean-René Huynh	Directeur de recherche	Invité
Dr Marie-Emilie Terret	Directrice de recherche	Invitée
Dr Catherine Jessus	Directrice de recherche	Directrice de thèse
Dr Marika Miot	Maître de conférences	Co-encadrante

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les Drs Julien Dumont et Thierry Lorca, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que mes examinatrices, les Drs Evelyn Houliston et Fabienne Pituello pour avoir acceptée de l'évaluer. Je souhaiterais également remercier les Drs Marie-Émilie Terret et Jean-René Huynh d'avoir bien voulu accepter mon invitation à participer à l'évaluation de ce travail de thèse.

Un grand merci à Catherine Jessus pour m'avoir permis d'intégrer son équipe pour y réaliser ma thèse. Mais aussi pour son optimisme constant, sa passion de la biologie qu'elle a su me transmettre tout au long de ces quatre années. Ce fut pour moi une grande opportunité de pouvoir te côtoyer, j'ai énormément appris. Un merci tout particulier revient à mon encadrante, Marika Miot, qui a bien voulu que je sois son premier doctorant. Merci de m'avoir, comme Catherine, aidé à avancer, progresser du début jusqu'à la fin. Merci d'avoir toujours été là dans les bons jours comme dans les mauvais et d'avoir partagé ces petites joies et ces petites déceptions qui parsèment la thèse et en font une expérience formidable. Et puis surtout d'avoir supporté mon caractère grognon.

Je tiens aussi à remercier Enrico Daldello et Tran Le. Enrico qui m'a énormément aidé lors de nombreuses discussions à mieux appréhender la science, mais aussi et surtout pour tous les bons moments de rigolade que nous avons passés ensemble grâce à sa bonne humeur constante. Tran qui a fait de ce passage dans l'équipe un moment très plaisant. Je me souviendrai toujours de nos innombrables discussions et de tous les bons moments passés au labo ou en dehors, M. Méneau te remercie très sincèrement. Par ailleurs je souhaite remercier M. Puhle avec qui j'ai passé des soirées à philosopher sur la science et pas que.

Un énorme merci à tous les membres de l'équipe « Biologie de l'ovocyte ». Merci à Sandrine et Martina pour leur gentillesse permanente et les rigolades avec Enrico à la cantine ou au labo. Merci à Jean-Christophe et Rozenn pour leur bienveillance et leurs conseils avisés. Enfin, merci à M. Ozon qui as toujours pris le temps de s'intéresser à mon travail.

Je tiens à remercier aussi les membres de mon comité de suivi de thèse : Pierre Crozet qui m'a suivi depuis le master 2, Lionel Pintard et Thomas Rubin, eux aussi pour leur sympathie.

Merci à tous mes camarades et amis doctorants rencontrés en Master (Alexis, Laura et Florestan) ou dans le couloir du 5^e étage de Cassan (Justine, Valentine, Mira, Zoheir, Raphaël, Antoine) mais aussi à tous les membres de l'équipe du B2 : Nicolas B, Mariette, Lou, Félix, Théo, Nicolas C, Achille, Maria, Emma, Martha, Pietro, Louis et notamment à Nicolas B, Félix et Théo avec qui nous avons traversé la thèse du début à la fin, merci à vous.

Enfin, un grand merci à ma mère (Anne-Marie), mon frère (Baptistin), mon père (Gilles), Solène et à ma tante (Françoise) qui ont cru en moi bien plus que je n'en étais capable... **Merci !**

Liste des Abréviations

AA : Acide Aminé
AC : Adénylate Cyclase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
Arpp19 : cAMP-regulated phosphoprotein 19 kDa
Bub3 : Budding Uninhibited by Benomyl protein 3
BubR1 : Budding uninhibited by benzamidazole
CAK : CDK activating kinase
CaMKII : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
CaN : Calcineurine
CCAN : constitutive centromere associated network
Cdc : Cell Division Cycle
Cdh1 : Cdc20 Homolog 1
CDK : Cyclin Dependent kinase
CenpA : Centromere Protein A
Chk : Checkpoint Kinase
CHX : Cycloheximide
CIP : CDK Interacting Protein
CKI : CDK inhibitor
Cly : *Clytia hemisphaerica*
CPC : Chromosomes Passenger Complex
CSF : CytoStatic Factor
D-box : Destruction box
DSB : Double Strand Break
Erp1 : Emi1-Related Protein 1
ENSA : Endosulfine Alpha protein
EXT : extrait
GAPs : GTPase-Accelerating Proteins
GEF : GTP exchange factor
GMPc : Guanosine MonoPhosphate Cyclic
GPCR : G-Protein Coupled Receptor
GPR3 : G-Protein Coupled Receptor 3
GTP/GDP : Guanosine TriPhosphate/DiPhosphate
GVBD : Germinal Vesicle Breakdown
Gwl : Greatwall
H2AX : Variant of the H2A protein family
HK : Hexokinase/Glucose
HORMA domain : for HOP1, REV7 and MAD2
IBMX : 3-IsoButyl-1-MethylXanthine
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
INCENP : INner CEnter Protein
iPR : internal Progesterone Receptor
KASH : Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology
kDa : kiloDalton
KMN complex : Kln1, Mis12 et Ndc80
LINC : Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LH : Luteizing Hormone
MI : Meiosis I
MII : Meiosis II

MASTL : Microtubule Associated Serine/Threonine Kinase Like
 Met II : Métaphase II
 Mad2 : Mitotic Arrest Deficient 2
 c-Mad2/o-Mad2 : closed or opened conformation of Mad2
 MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
 MCC : Mitotic Checkpoint Complex
 MEFs : Mouse Embryonic Fibroblasts
 MEK : MAPK kinase
 MELT motif : Méthionine-glutamate-Leucine-Thréonine
 MIH : Maturation Inducing Hormones
 MTOC : Microtubule-Organizing Center
 MPF : M-phase Promoting Factor
 MpP20 : Maturation phosphoProtein 20 Kda
 MpP32 : Maturation phosphoProtein 32 Kda
 mPR : Membrane Progesterone Receptor
 Myt1 : Membrane associated tyrosine and threonine 1
 NEBD : Nuclear Envelope BreakDown
 nPR : Nuclear Progesterone Receptor
 OA : Acide Okadaïque
 P³² : phosphore 32
 p90^{Rsk} : p90 ribosomal S6 kinase
 PAQR : Progestin and AdipoQ Receptor
 PCM : PeriCentriolar Material
 PDE : Phosphodiesterase
 Pg : Progestérone
 Phase G : phase de gap
 Phase M : phase de mitose ou méiose
 Phase S : phase de Synthèse d'ADN
 PIP : PP1-Interacting Protein
 PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc
 PKI : PKA Inhibitor
 Plx1 : Polo-Like Kinase de Xénope
 PP1 : Protein Phosphatase 1
 PP2A : Protein Phosphatase 2A
 PP2C : Protein Phosphatase 2C
 PPP : PhosphoProtein Phosphatase
 PLP : PP2A-Like Phosphatase
 Pro I : Prophase I
 RAD : DNA repair protein
 RanBP1 : Ran Binding Protein 1
 Rec8 : Meiotic Recombination protein
 RINGO : Rapid INducer of G2/M progression in Oocytes
 RZZ : Rod, Zwilch, ZW10
 SAC : Spindle Assembly Checkpoint
 SBTI : SoyBean Trypsin Inhibitor
 SCF : Skp, Cullin, F-box containing complex
 SGO2 : Shugoshin 2
 STP : Sérine/Threonine Phosphatase
 SUN : Sad1 and UNC-84 homology
 SYCP : Synaptonemal Complex Protein
 TPX2 : Targeting Protein for Xklp2
 Xe : *Xenopus laevis*

Liste des figures

- Figure 1** : Questions de la thèse dans le contexte du modèle actuel de l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope et de *Clytia*
- Figure 2** : Dessin de Walther Flemming
- Figure 3** : Planches de dessin de Édouard van Beneden décrivant les étapes de la méiose chez *Ascaris megalocephala*
- Figure 4** : Modalités de séparation des chromosomes en mitose et en méiose mâle et femelle
- Figure 5** : Les différentes étapes de la prophase de méiose I
- Figure 6** : Composition de l'axe transversal au stade leptotène
- Figure 7** : Le complexe LINC (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*)
- Figure 8** : Les mouvements du noyau, un mécanisme favorisant l'appariement des chromosomes
- Figure 9** : Structure du complexe synaptonémal aux stades zygotène et pachytène
- Figure 10** : Ségrégation des chromosomes homologues en méiose I
- Figure 11** : Structure du kinétochore
- Figure 12** : Gradient de Ran-GTP et établissement du fuseau de division
- Figure 13** : Mise en place du SAC
- Figure 14** : Les expériences de Y. Masui mettant en évidence le MPF et sa capacité d'auto-amplification
- Figure 15** : Croissance de l'ovocyte de Xénope lors de l'arrêt en prophase
- Figure 16** : Activation de PKA par la production constitutive d'AMPc dans l'ovocyte de Xénope durant l'arrêt en prophase I
- Figure 17** : De la stimulation de l'ovocyte de Xénope par la progestérone à l'activation du MPF
- Figure 18** : Boucle d'auto-amplification du MPF
- Figure 19** : Régulation de la transition MI-MII par Erp1/Emi2
- Figure 20** : Arrêts de la méiose de l'ovocyte chez les animaux
- Figure 21** : Le paradoxe « PKA » entre l'ovocyte de Xénope et l'ovocyte de *Clytia*
- Figure 22** : Échange des sites PKA entre XeARPP19 et ClyARPP19 : Cinétique de phosphorylation de la S109 par PKA
- Figure 23** : Une activité basale de Gwl dans les ovocytes en prophase phosphoryle ARPP19 en S67
- Figure 24** : La phosphorylation d'ARPP19 en S109 régule la phosphorylation basale en S67 dans l'ovocyte en prophase
- Figure 25** : Activités et inter-régulations de PKA, Gwl et PP2A-B55 régulant les phosphorylations d'ARPP19 en S67 et S109
- Figure 26** : Régulation intramoléculaire en cis d'ARPP19
- Figure 27** : L'inhibition exercée par le N-ter est due à une augmentation de sa déphosphorylation en S67
- Figure 28** : Régulation de l'effet inhibiteur du N-ter par les C-ter de Xénope et de *Clytia*
- Figure 29** : Deux domaines présents dans le C-ter régulent l'effet inhibiteur du N-ter
- Figure 30** : Niveau de phosphorylation de la S67 de la chimère inductrice Xe(A Cly)
- Figure 31** : Effets sur la maturation méiotique et niveau de phosphorylation en S67 de XeARPP19 modifiée en C-ter
- Figure 32** : Modèle de régulation intramoléculaire de la phosphorylation en S67 par les domaines A et B et la phosphorylation en S109

Sommaire

I.	Préambule	9
II.	Introduction	11
A.	La division, une phase du cycle cellulaire (1870-1970)	11
1.	Division cellulaire	11
a)	Mise en évidence.....	11
b)	La mitose.....	12
c)	Concept de cycle cellulaire.....	13
2.	La Méiose	13
a)	Contexte	13
b)	Découverte	14
c)	Les grands principes de la méiose.....	14
d)	Des différences dans la méiose des cellules reproductrices femelles et mâles	15
3.	Les phases M de méiose	16
a)	La prophase	17
(1)	Leptotène et formation de l'axe protéique, élément du futur complexe synaptonémal.....	17
(2)	Transition leptotène/zygotène et prémices de l'appariement des chromosomes par cassure de l'ADN double-brin	18
(3)	Transition leptotène/zygotène et mouvement du noyau	18
(4)	Zygotène et Pachytène.....	19
(5)	Diploène	20
(6)	Diacinèse.....	20
b)	Prométaphase/Métaphase	20
(1)	Prométaphase/Métaphase de mitose et de méiose I	21
(2)	Déroulement de la prométaphase	21
(a)	Mono-orientation des chromatides sœurs et bi-orientation des chromosomes homologues	21
(b)	Particularité de la prométaphase/métaphase pour les ovocytes	22
(c)	Système de vérification de la bonne fixation des microtubules du fuseau aux kinétochores	23
(d)	Acteurs moléculaires du système de vérification pour la transition métaphase/anaphase.....	24
c)	Anaphase I	27
d)	Télophase.....	27
e)	Cytocinèse.....	28
(1)	Déroulement.....	28
(2)	Particularité de la cytocinèse de l'ovocyte	29
f)	La méiose II	30

4.	Conclusion.....	31
B.	Qui orchestre la phase-M ?.....	31
1.	Découverte du MPF	31
2.	Identité du MPF	33
3.	Universalité du MPF chez les eucaryotes.....	34
C.	Comment est régulé le MPF ?.....	35
1.	Oscillation de l'activation du MPF	35
2.	Deux niveaux de régulation du MPF.....	36
a)	Régulation par synthèse et dégradation des Cyclines.....	36
b)	Régulation par phosphorylation et déphosphorylation du MPF.....	37
c)	Un nouveau panorama : de Cdc2-Cdc28 à Cdk1, de la Cycline aux Cyclines.....	39
D.	Modèle de régulation du MPF : la division méiotique de l'ovocyte de Xénope.....	40
1.	L'arrêt en prophase de méiose I.....	41
a)	La croissance ovocytaire chez le Xénope.....	41
b)	Mécanismes moléculaires de l'arrêt en prophase de l'ovocyte chez le Xénope.....	42
(1)	Découverte du rôle de PKA dans l'arrêt en prophase	43
(2)	Les substrats de PKA.....	44
(3)	Contrôle traductionnel de l'arrêt en prophase.....	45
(a)	Les Cyclines B	47
(b)	La kinase Mos.....	48
2.	Reprise de la méiose de l'ovocyte de Xénope.....	49
a)	Mécanismes moléculaires de la stimulation.....	50
b)	Acquisition de la compétence à reprendre la méiose au cours de la croissance des ovocytes.....	53
c)	Synthèse protéique, seconde étape incontournable de la reprise de la méiose	55
d)	Activation du MPF, troisième et dernière étape de la reprise de la méiose	57
(1)	Inhibition de Myt1 et activation initiale du MPF	57
(2)	Activation de Cdc25 et activation initiale du MPF.....	58
(a)	Cdc25.....	58
(b)	Déphosphorylation de la Ser287 de Cdc25C.....	59
(c)	Phosphorylation activatrice de Cdc25	60
(3)	Boucle d'auto-amplification	61
3.	Transition méiose I – méiose II.....	63
a)	Activité de Cdk1 entre méiose I et méiose II	64
b)	Comment éviter la réplication entre méiose I et méiose II.....	66
c)	La voie Mos/MAPK et la Cycline B3, des acteurs cruciaux de la transition méiose I-méiose II	66
4.	Arrêt en métaphase II et fécondation	68

E.	La voie PP2A-B55 α /Greatwall/ARPP19, un nouveau niveau de régulation du MPF.....	70
1.	La phosphatase PP2A-B55 α un inhibiteur du MPF connu de longue date.....	70
2.	Inhibition de la phosphatase PP2A-B55 α	71
3.	Inhibition de la phosphatase PP2A-B55 α : découverte de ARPP19/ENSA.....	74
III.	Résultats.....	78
A.	Présentation de l'article N°1 : Translational Control of Xenopus Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era	78
B.	Phosphorylation d'ARPP19 par PKA dans l'ovocyte, émergence chez les vertébrés	80
1.	Introduction	80
2.	Article 2	82
3.	Conclusions	83
C.	Étude de la régulation intramoléculaire d'ARPP19 sur la phosphorylation de la S67	86
1.	Introduction	86
2.	Résultats.....	89
a)	Une activité basale de Greatwall phosphoryle ARPP19 en S67 dans l'ovocyte en prophase I	89
b)	Le niveau de phosphorylation en S67 est régulé par celui de la S019.....	91
c)	Le niveau de phosphorylation en S67 dépend d'une régulation intramoléculaire d'ARPP19	95
(1)	Régulation de la partie N-terminale d'ARPP19 par la partie C-terminale.....	95
(2)	L'absence de phosphorylation sur S67 dans la partie N-terminale est à l'origine de son effet bloquant.....	96
(3)	Identification de deux domaines de la partie C-terminale régulant de manière opposée la partie N-terminale.....	98
(a)	Les séquences C-ter de XeARPP19 et ClyARPP19 sont interchangeables	98
(b)	Echange de deux domaines, A et B, de la partie C-ter entre XeARPP19 et ClyARPP19.....	99
(c)	Mécanisme de régulation du domaine A sur la déphosphorylation de la S67 par PP2A-B55 α	101
(d)	Mécanisme de régulation du domaine B sur la déphosphorylation de la S67 par PP2A-B55 α	102
(e)	Validation des résultats issus des chimères par une approche de troncation des partie C-terminales.....	103
3.	Discussion.....	105
IV.	Perspectives	109
V.	Bibliographie	115

I. Préambule

Le MPF (*M-Phase promoting factor*), complexe composé de la kinase Cdk1 et de la Cycline B est le facteur universel qui, chez tous les eucaryotes, assure l'ensemble des réarrangements nécessaires à la division cellulaire, qu'elle soit mitotique ou méiotique (Masui and Markert, 1971a). Chez les métazoaires, les ovogonies passent de cycles de mitose à une entrée en méiose, où elles deviennent des ovocytes. L'ovocyte débute la méiose mais est très rapidement bloqué en fin de prophase de première division méiotique (prophase I, appelée aussi prophase dans le reste du texte), un arrêt dû à l'inhibition du MPF. Cet arrêt, crucial pour l'accumulation de réserves énergétiques dans l'ovocyte, est maintenu chez les vertébrés grâce à l'activité d'une kinase : la protéine kinase dépendante de l'AMPc, PKA. Dans l'ovocyte de Xénope (*Xenopus laevis*), la phosphorylation par PKA de la protéine ARPP19 réprime par un mécanisme qui reste encore à éclaircir l'activation du MPF (Dupré *et al.*, 2014a). Cette phosphorylation est le résultat d'un équilibre entre la déphosphorylation par la phosphatase PP2A-B55 et la phosphorylation par PKA en faveur de cette dernière, ce qui permet à la forme phosphorylée d'ARPP19 d'être majoritaire dans l'ovocyte en prophase (Lemonnier *et al.*, 2021). Cet équilibre est modifié à la suite d'une stimulation hormonale des ovocytes : dans le cas du Xénope, les cellules folliculaires, qui entourent l'ovocyte, libèrent de la progestérone, conduisant à l'inactivation de PKA en une dizaine de minutes (**Fig. 1**). L'activité de la phosphatase PP2A-B55 n'étant pas affectée lors de cette étape précoce, la forme déphosphorylée d'ARPP19 devient majoritaire. Cela permet la levée de la répression qu'ARPP19 exerçait sur le pré-MPF et le blocage des ovocytes en prophase I. Une cascade de signalisation se met en place qui aboutit 4 à 5 heures plus tard à l'activation du MPF. Cette ultime étape requiert l'inactivation de PP2A-B55. En effet, cette dernière déphosphoryle les divers substrats du MPF et est donc un frein à son activité kinasique. En outre, elle régule négativement l'activateur du MPF, la phosphatase Cdc25, et positivement son inhibiteur, la kinase Myt1, ce qui empêche la conversion du pré-MPF en MPF. L'inhibition de PP2A-B55 est permise grâce à l'activation d'une kinase appelée Greatwall (Gwl), qui phosphoryle ARPP19 sur un résidu différent de celui ciblé par PKA, et le transforme en un puissant inhibiteur de PP2A-B55 permettant la reprise de la méiose (Dupré *et al.*, 2013) (**Fig. 1**).

Durant ma thèse, je me suis intéressé dans un premier temps à la conservation du rôle de la phosphorylation d'ARPP19 par PKA au sein du règne animal. En effet, les ovocytes de

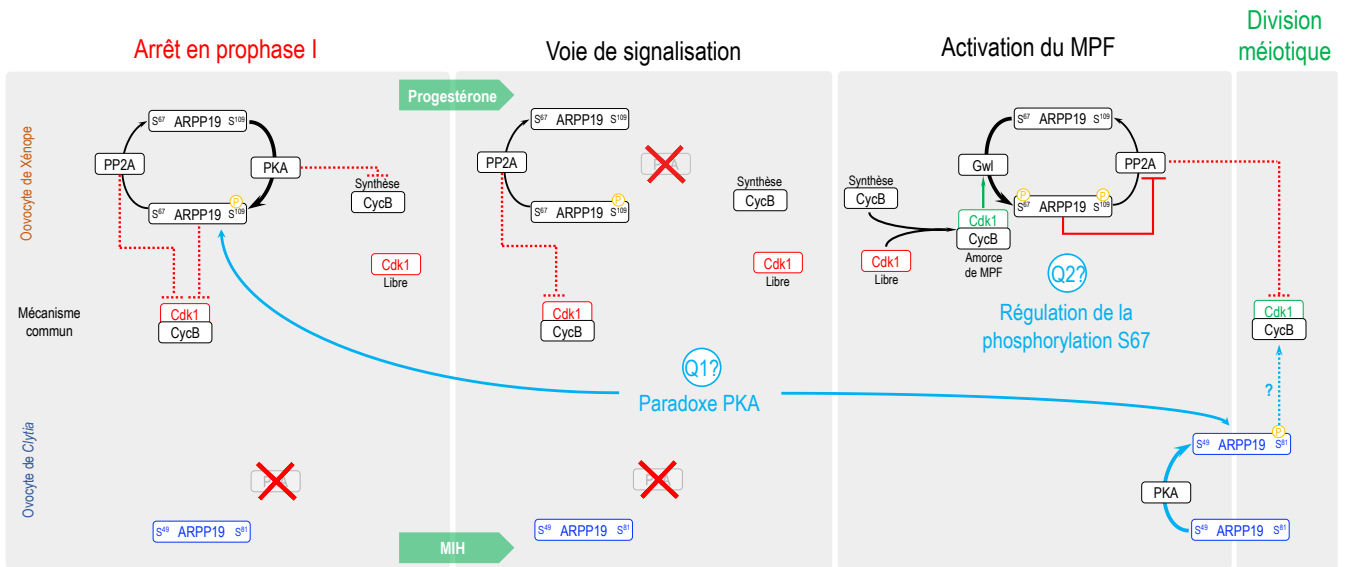


Figure 1 : Questions de la thèse dans le contexte du modèle actuel de l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope et de Clytia.

Chez tous les métazoaires, la méiose de l'ovocyte est arrêtée en prophase I et la cellule contient un stock de pré-MPF (complexe Cdk1-Cycline B) inactif. Chez tous les vertébrés, comme chez le Xénope, l'arrêt en prophase de l'ovocyte est dû à une forte activité de la kinase PKA. PKA phosphoryle la petite protéine ARPP19 sur la sérine S109 et maintient inactif le MPF par un mécanisme qui reste à éclaircir. PP2A-B55 (notée PP2A) est la phosphatase antagoniste du MPF qui déphosphoryle tous les substrats du MPF et inhibe indirectement le MPF via ses régulateurs. PP2A est active en prophase et déphosphoryle ARPP19 en S109 mais le niveau de phosphorylation de la S109 reste élevé en prophase en raison d'un équilibre en faveur de PKA. Au contraire, la sérine S67 n'est pas phosphorylée puisque Gwl est inactive. La forme majoritaire d'ARPP19 dans l'ovocyte en prophase est donc une forme phosphorylée en S109 par PKA et déphosphorylée en S67.

Chez certains invertébrés tels que *Clytia*, le mécanisme de reprise de la méiose est inversé. L'hormone inductrice de la maturation (MIH) induit en effet l'activation de PKA et non son inhibition comme chez les vertébrés. L'activation de PKA devrait induire la phosphorylation d'ARPP19 chez *Clytia*. Or la forme phosphorylée en S109 bloque le passage en méiose chez les vertébrés. Ce paradoxe qui porte sur une forme phosphorylée d'ARPP19 au moment de la reprise de la méiose est l'objet de la première partie de ma thèse (Q1-article 2).

Chez le Xénope à la suite de la stimulation par la progestérone, PKA est inactivée. ARPP19 reste substrat de PP2A-B55 et passe donc sous un état déphosphorylé sur la sérine 109..

La synthèse de Cycline B, inhibée par PKA en prophase (mécanisme inconnu), reprend et permet la formation d'une amorce active de MPF par association au Cdk1 libre. Gwl est activé par phosphorylation par l'amorce active de MPF puis par auto-phosphorylation. Elle phosphoryle ARPP19 sur la sérine 67 (S⁶⁷), le convertissant en un puissant inhibiteur direct de PP2A-B55, ce qui conduit à l'activation du MPF.

La forme d'ARPP19 majoritaire est une forme phosphorylée sur S67, mais aussi sur S109. En effet, la S109 est rephosphorylée par une kinase encore non-identifiée au moment de l'activation du MPF et la fonction de cette rephosphorylation n'est pas comprise.

La phosphorylation en S67 est dominante par rapport à la S109. Elle constitue donc un élément crucial pour l'activation du MPF. Je me suis focalisé sur cette phosphorylation pour comprendre son état « off/on » en prophase/M-phase méiotique et sa régulation fine qui conditionne la décision de la cellule de se diviser ou non (Q2).

nombreux invertébrés présentent un mécanisme de reprise de la méiose ne dépendant pas d'une chute mais au contraire d'une hausse de l'activité de PKA pour activer le MPF (Deguchi, Takeda and Stricker, 2011). ARPP19 est exprimé dans l'ovocyte de certaines de ces espèces, comme la méduse *Clytia hemisphaerica* (Leclère *et al.*, 2019). Étant donné que la phosphorylation par PKA d'ARPP19 maintient l'ovocyte de Xénope en prophase, j'ai cherché à comprendre pourquoi il n'en était pas de même dans l'ovocyte de *Clytia* (**Fig. 1**). Effectivement, il y a ici un paradoxe : PKA, dont l'activation est nécessaire pour celle du MPF chez *Clytia*, devrait phosphoryler ARPP19. Or, chez les vertébrés, la forme phosphorylée d'ARPP19 empêche le MPF de s'activer. Comment n'est-ce pas le cas chez *Clytia* ?

Afin de résoudre ce paradoxe (**Fig. 1, Question Q1**), je me suis intéressé à deux critères permettant à ARPP19 d'inhiber la reprise de la méiose : (1) sa capacité à être phosphorylé par PKA, et (2) lorsqu'il est phosphorylé par PKA, sa capacité à bloquer l'ovocyte en prophase I. J'ai pu démontrer qu'ARPP19 de *Clytia* ne répondait pas à ces deux critères : c'est un mauvais substrat de la kinase PKA (en comparaison avec ARPP19 de Xénope) et de plus, il reste incapable d'inhiber la méiose lorsqu'il est injecté sous sa forme phosphorylée dans l'ovocyte de *Clytia* ou de Xénope.

Je me suis ensuite intéressé à la régulation intramoléculaire d'ARPP19 chez le Xénope (**Fig. 1, Question Q2**). Premièrement, mes résultats révèlent l'existence d'une activité basale de la kinase Gwl dans l'ovocyte en prophase I. Deuxièmement, j'ai montré par des expériences *in vitro* et *in vivo* que la phosphorylation d'ARPP19 par Gwl est contrecarrée par celle de PKA en prophase I. La phosphorylation par PKA d'ARPP19 participerait ainsi au maintien d'une phosphorylation minimale d'ARPP19 en S67 et éviterait une activation intempestive du MPF. Enfin, j'ai pu identifier le réseau de motifs au sein de la partie C-terminale d'ARPP19 qui, par des remaniements structurels, régulent la phosphorylation du site Gwl.

L'ensemble de mes travaux permet de mieux comprendre le mécanisme par lequel la petite protéine ARPP19 joue un double rôle crucial dans la régulation de l'activation du MPF, rôle inhibiteur ou activateur, et comment ces deux fonctions ont évolué chez les animaux.

II. Introduction

L'avènement de la microscopie au milieu du XVII^{ème} siècle avec notamment Robert Hooke (1635-1703) et Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), permit la découverte de la brique fondamentale du vivant : la cellule (Hooke, 1665). A la suite de cette avancée majeure dans la compréhension de l'organisation du vivant, une question émergea : d'où proviennent ces cellules, comment sont-elles produites ?

A. La division, une phase du cycle cellulaire (1870-1970)

1. Division cellulaire

a) Mise en évidence

Plusieurs décennies après ces premières observations, au début du XIX^{ème} siècle, une nouvelle génération de scientifiques s'intéressa à la cellule, et parmi eux Henri Dutrochet (1776-1847). Dutrochet fut le premier à décrire les cellules animales et végétales comme des sacs dont le contenu est séparé de l'extérieur par une membrane. Par la suite, en 1833, Robert Brown (1773-1858) mit en évidence chez ces mêmes cellules, une structure interne ovoïde qui fut nommée noyau. Ces éléments conduisirent à l'établissement de la théorie cellulaire en 1838 par Matthias Schleiden (1804-1881) et Theodor Schwann (1810-1882). Cette théorie repose sur trois grands principes : (1) tout organisme est constitué d'une ou plusieurs cellules ; (2) la cellule est l'unité fondamentale de la structure et de l'organisation des êtres vivants ; (3) les cellules proviennent de la cristallisation de matériel intercellulaire. Ce troisième principe proposé par Schleiden fut fortement débattu car, à cette même période, Barthélemy Dumortier (1797-1878) et Hugo von Mohl (1805-1872) observèrent des cellules végétales, dites mères, en train de se multiplier par division et donner deux cellules dites filles. Ces observations faites par Dumortier, von Mohl ou encore Robert Remak (1815-1865) ou Rudolf Virchow (1821-1902) n'eurent pas de retentissement immédiat sur la théorie cellulaire. En effet, cette théorie cellulaire ne sera modifiée qu'en 1855 par Virchow qui en substituera le dernier principe par la phrase latine : « *Omnis cellula e cellula* », *chaque cellule provient d'une cellule*. Cet événement marqua le début de l'étude de la division cellulaire définie comme le processus de multiplication des cellules eucaryotes (cellules possédant un noyau) par opposition aux cellules procaryotes (cellules sans noyau) qui se divisent par scissiparité.

b) La mitose

La mitose, définie pour la première fois par Walther Flemming en 1882, provient du grec : « *mitos* » pour *filament* et « *osis* » pour *processus/acte*. Flemming, ainsi qu'Anton Schneider (1831-1890), firent partie des premiers à décrire les changements que subit le noyau lors de la division de la cellule. Flemming observa, à l'aide de différentes techniques de coloration, qu'en amont de la division le contenu du noyau se condense et devient filiforme (**Fig. 2**). Ces structures seront nommées par la suite chromosomes (« *corps coloré* » du grec « *chromos* » (couleur) et « *soma* » (corps)) par Wilhelm von Waldeyer-Hartz (1836-1921). Les chromosomes, dont nous savons maintenant qu'ils correspondent à l'association de deux chromatides-sœurs, se séparent de manière équitable puis se décondensent pour former deux nouveaux noyaux identiques à celui de la cellule mère, au sein de deux cellules-filles (**Fig. 3**). L'étape suivante est une proposition faite indépendamment par Theodor Boveri (1862-1915) et Walter Sutton (1877-1916) en 1902 selon laquelle les chromosomes seraient le support de l'hérédité. Ceci ne fut confirmé que bien des années plus tard, en 1913, par Thomas Hunt Morgan (1866-1945) grâce à son travail sur la transmission des gènes à la descendance chez *Drosophila melanogaster*. Bien plus tard, en 1953, Alma Howard (1913-1984) et Stephen Pelc, utilisèrent l'autoradiographie pour étudier la synthèse des acides désoxyribonucléiques (ADN) des cellules racinaires en division ou non chez la fève, *Vicia faba*. Ils découvrirent en suivant l'incorporation de phosphore 32 (P^{32}) que lors de la période séparant deux divisions, appelée interphase, un pic d'incorporation de P^{32} était observé, indiquant une synthèse d'ADN. Cette synthèse correspond à la réplication de l'ADN génomique, dont la structure bi-hélicoïdale est découverte la même année, en 1953, par James Watson (né en 1928), Francis Crick (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958). Le mode de réplication semi-conservatif de l'ADN sera mis en évidence en 1958 par Matthew Meselson (né en 1930) et Franklin Stahl (né en 1929). Ainsi la mitose correspond au processus de duplication non seulement des constituants cellulaires mais aussi du génome afin de le répartir équitablement entre deux cellules-filles, qui seront donc rigoureusement identiques. Chez les êtres multicellulaires, elle intervient lors de processus tels que le développement embryonnaire et larvaire, le renouvellement des tissus ou encore la régénération, autant de processus nécessitant de nouvelles cellules afin de construire ou remplacer les cellules vieillissantes, abîmées ou mortes. Chez les unicellulaires, elle assure la reproduction clonale, dite « asexuée », de l'espèce. On voit ainsi que la division de la cellule est essentielle à la vie.

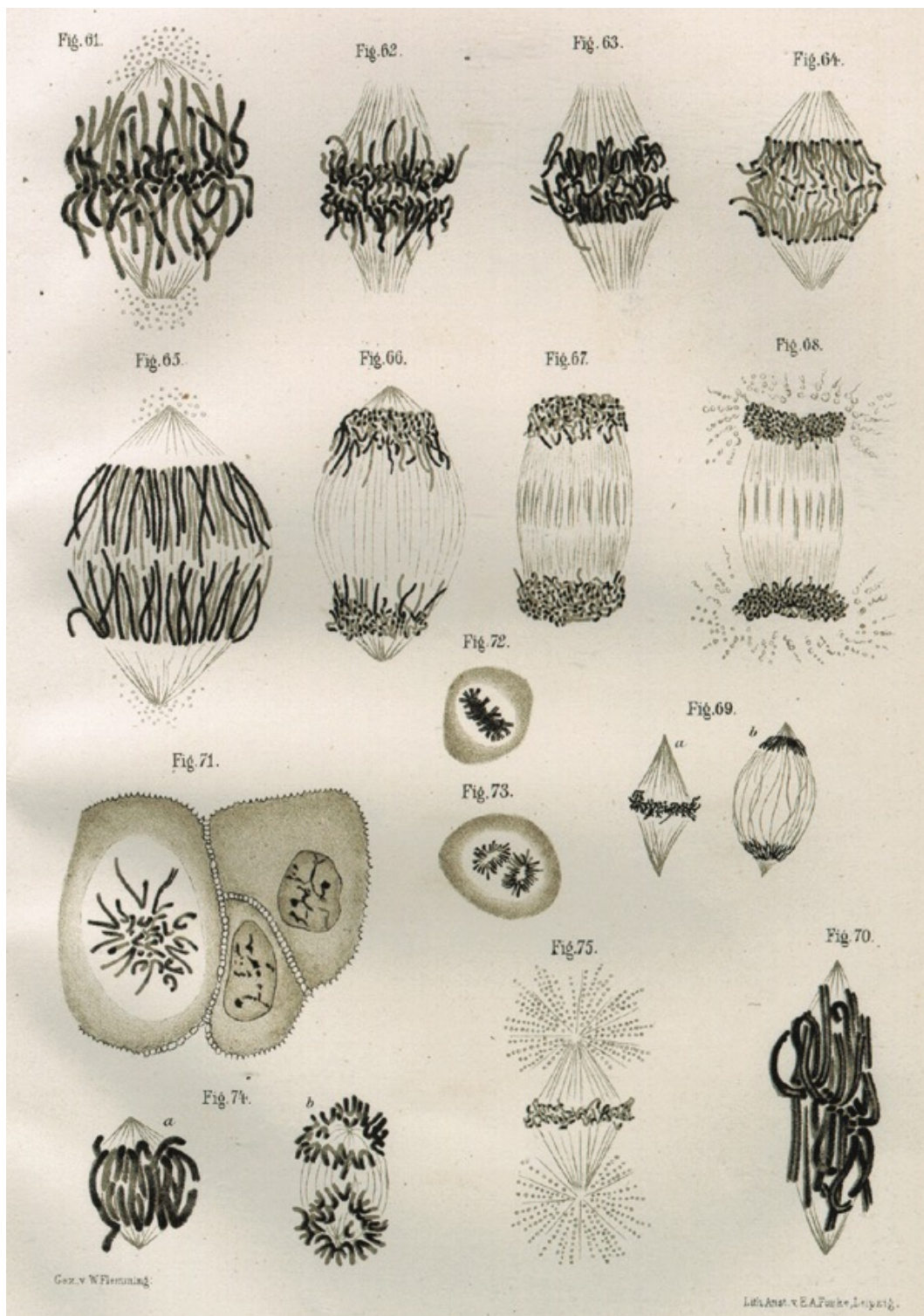


Figure 2 : Dessin de Walther Flemming.

L'une des très nombreuses planches de dessins de Walther Flemming décrivant dès 1882, les évènements qui caractérisent la mitose. Les cellules viennent des espèces suivantes: *Liliun corceum* (N°61-68), *Iris sibirica* (N°69), *Liliun tigrinum* (N°70), cornée humaine (N°71-73), testicules de salamandre (N°74) et l'œuf de l'oursin *Toxopneustes lividus* (N°75). Les images sont extraites du livre de W. Flemming « Zellsbstanz, Kern und Zelltheilung », 1882.

c) Concept de cycle cellulaire

Jusqu'aux années 1940, l'interphase semblait simplement correspondre à une période quiescente séparant deux divisions. Cependant, comme l'ont montré Howard et Pelc en 1953, l'interphase est cruciale par la réplication du génome durant la phase S (S pour Synthèse). Ils identifièrent quatre phases distinctes durant l'interphase. Ils découvrirent que la phase S et la division (appelée phase M - M pour mitose) sont chacune séparées par une phase appelée G, pour gap (écart) : la phase G1 dans laquelle entrent les cellules suite à la phase M et qui précède la phase S, et la phase G2 dans laquelle entrent les cellules à la suite de la phase S et qui précède la phase M. Ainsi à la sortie de la phase M, les deux cellules-filles vont chacune initier un nouveau cycle, en passant de la phase G1 en phase S avant d'entrer en phase G2 puis en phase M. Au sein des organismes multicellulaires ayant achevé leur développement, toutes les cellules ne sont pas constamment en division. Ceci s'explique par l'existence d'une cinquième phase du cycle cellulaire, la phase G0 dite de quiescence. Cette phase fut mise en évidence par Laszlo Lajtha (1920-1995) et Henry Quastler (1908-1963) en 1962 au sein de cellules de la moelle osseuse, montrant de ce fait l'universalité du cycle cellulaire. En sortie de phase M, les cellules ont le choix, entre initier un nouveau cycle en entrant de nouveau en G1, et ne pas se diviser et entrer en phase G0. Durant cette phase G0, les cellules peuvent être soit en quiescence avant de rentrer dans un nouveau cycle cellulaire, soit dans un état différencié, qu'il soit irréversible (cellules sénescents « post-mitotiques ») ou réversible.

2. La Méiose

a) Contexte

A la fin du XIX^{ème} siècle, de nombreux scientifiques s'opposent concernant la nature et le mode de transmission des caractères à la descendance. A cette époque, August Weismann (1834-1914) défend la théorie du plasma germinatif selon laquelle les êtres multicellulaires sont constitués de cellules somatiques et germinales, ces dernières étant les seules à transmettre à la descendance les caractères innés.

b) Découverte

C'est à cette période que les travaux d'Oscar Hertwig (1849-1922) et Edouard van Beneden (1846-1910) vont mettre en lumière le mode de division particulier des cellules germinales. Tout d'abord, Hertwig fit en 1876 une découverte cruciale dans la compréhension de ce mécanisme : il observa chez l'oursin qu'il y avait une fusion des gamètes mâle et femelle, processus connu sous le nom de fécondation. Cette observation fut le point de départ des travaux de Van Beneden qui s'intéressa à la fécondation de l'ovocyte du parasite *Ascaris megalocephala*. En 1884, il livre une description des plus précises du processus de division à l'origine de la formation des gamètes : la méiose (Van Beneden, 1883)(**Fig. 3**). Il visualisa les deux divisions de l'ovocyte d'*Ascaris*, déclenchées chez cette espèce par la pénétration du spermatozoïde. Dans l'ovocyte se trouvent alors le noyau de l'ovocyte, appelé vésicule germinative, et le noyau du spermatozoïde. Les deux divisions concernent les chromosomes de l'ovocyte, mais le noyau du spermatozoïde reste intact sans être affecté par les divisions de la cellule qui l'abrite. Lors de la première division de l'ovocyte, le nombre de chromosomes est réduit de moitié, la moitié des chromosomes étant éliminée de l'ovocyte par formation d'un globule polaire, petite structure entourée d'une membrane contenant essentiellement les chromosomes éliminés mais très peu de cytoplasme (Schmerler and Wessel, 2011) (**Figs. 3 et 4**). De même, il décrit la seconde division de l'ovocyte d'*Ascaris*. Lorsque celle-ci est achevée, chaque chromosome de l'ovocyte ayant été séparé en deux (les chromatides sœurs sont ségréguées), un noyau se reforme : il s'agit du pronucléus femelle. En même temps, le noyau du spermatozoïde, resté quiescent tout au long des deux divisions, se transforme en pronucléus mâle. La fusion des deux pronuclei signe la fécondation proprement dite (**Fig. 3**).

c) Les grands principes de la méiose

Dès cette époque il est compris, entre autres par Weismann, que la réduction du nombre de chromosomes est l'objectif principal de la méiose. Contrairement à la mitose, le but de la méiose n'est pas de générer deux cellules identiques à l'originale, mais d'obtenir un gamète, terme choisi par Gregor Mendel (1822-1884) pour désigner la cellule reproductrice femelle (l'ovule) ou mâle (le spermatozoïde). Les gamètes sont dits haploïdes, c'est-à-dire que le nombre de leurs chromosomes, dont chacun ne contient qu'une seule chromatide, est réduit de moitié par rapport au nombre de chromosomes des cellules somatiques dites diploïdes. Comme l'a défini Van Beneden, la méiose se produit en deux étapes (**Fig. 4**). La première se

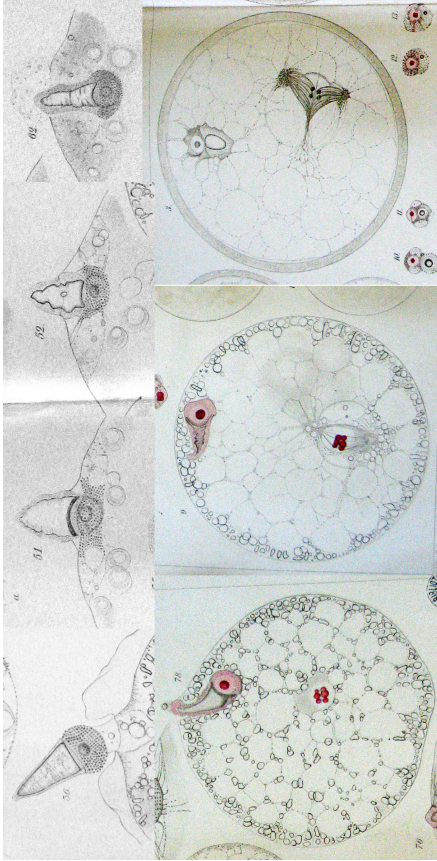
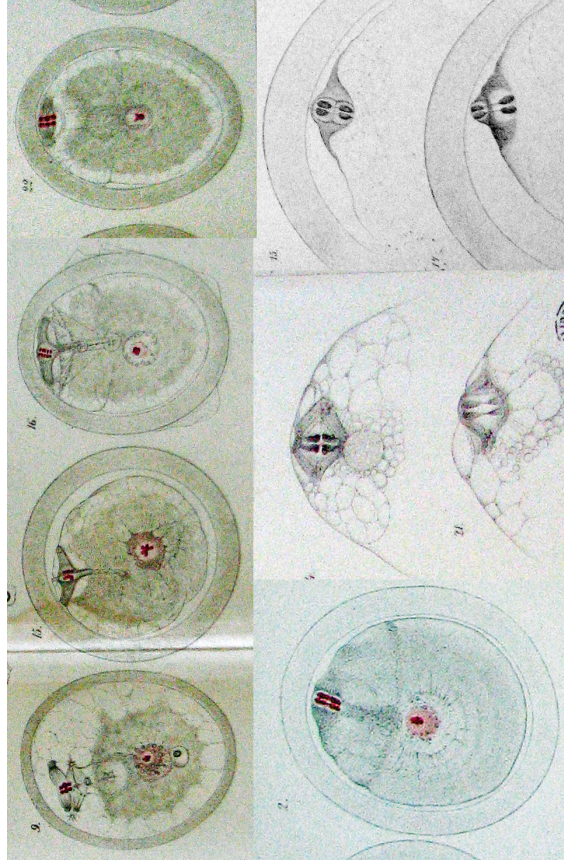
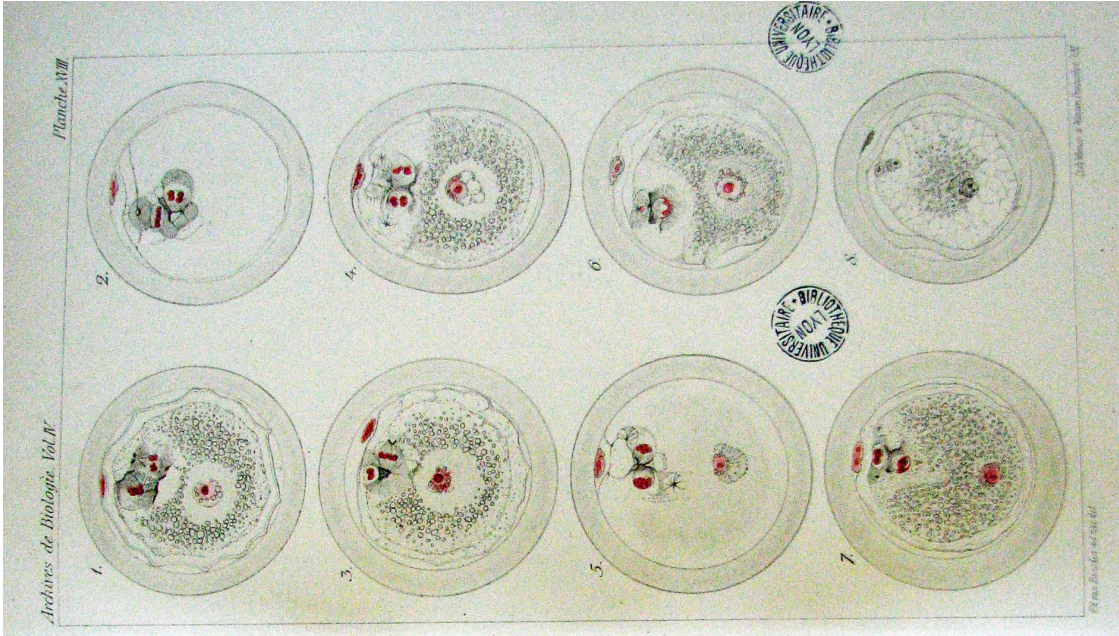
A**B****C**

Figure 3 : Planches de dessin de Édouard van Beneden décrivant les étapes de la méiose chez *Ascaris megalocephala*.

(A) Fécondation de l'ovocyte d'*Ascaris* (en prophase) et mise en place du premier fuseau de division méiotique de l'ovocyte. (B) Représentation de la première division méiotique. (C) Représentation de la seconde division méiotique.

Extrait de : Édouard van Beneden-Archives de Biologie (1883)

distingue fortement d'une mitose. Le génome est répliqué lors de la phase S qui la précède, chaque chromosome étant formé de deux chromatides, comme dans une phase G2 classique. Un premier élément original survient lors de la prophase de la 1^{ère} division méiotique : les chromosomes homologues, paternels et maternels, s'apparient, puis, grâce à des crossing-over, des processus de recombinaisons homologues donnent lieu à des échanges entre chromatides de chromosomes homologues. Suite à ces événements, un second élément original survient : les chromosomes homologues restent attachés par couple et lors de la division, ce sont les chromosomes homologues qui sont séparés dans deux cellules-filles, et non les chromatides, comme cela se produit dans une mitose. Les deux cellules-filles contiennent donc un nombre de chromosomes réduit par deux, d'où le nom de cette première division méiotique originale à la méiose : « réductionnelle ». La seconde division ressemble à une mitose classique. Elle a lieu sans réplication préalable du génome, et les chromatides-sœurs sont séparées dans chacune des cellules-filles : il s'agit d'une division « équationnelle ». La méiose correspond donc à deux phases M sans phase S intermédiaire, appelées première (réductionnelle) et seconde (équationnelle) division méiotique, qui produisent quatre cellules haploïdes dont les chromosomes n'ont qu'une seule chromatide. La méiose est donc le processus à l'origine des gamètes femelles et mâles qui après fusion, la fécondation chez les métazoaires, restaureront la diploïdie chez la cellule œuf, ou zygote. Ce dernier possède un lot de chromosomes paternels issus du gamète mâle, et un lot de chromosomes maternels issus du gamète femelle, chacun formé d'une seule chromatide. Le zygote entame les divisions dites embryonnaires en commençant par une phase S de telle sorte que chaque chromosome est équipé de deux chromatides. Le zygote est la cellule à l'origine de toutes les cellules du futur organisme qui partageront ainsi toutes le même génome, résultat de l'héritage des gènes maternels et paternels.

d) Des différences dans la méiose des cellules reproductrices femelles et mâles

Plusieurs différences distinguent la méiose chez la femelle et chez le mâle. Chez les mâles, la méiose permet, comme décrit ci-dessus, d'obtenir à partir d'une cellule, quatre spermatozoïdes. Les spermatogonies, cellules précurseurs des spermatozoïdes, vont produire, suite à la méiose, quatre spermatides qui, après leur différenciation, deviendront chacune un spermatozoïde (**Fig. 4**). Entre les deux divisions méiotiques mâles, un noyau se reforme, bien sûr non-répliquant. Chez les femelles, les ovogonies sont les cellules précurseurs des ovocytes.

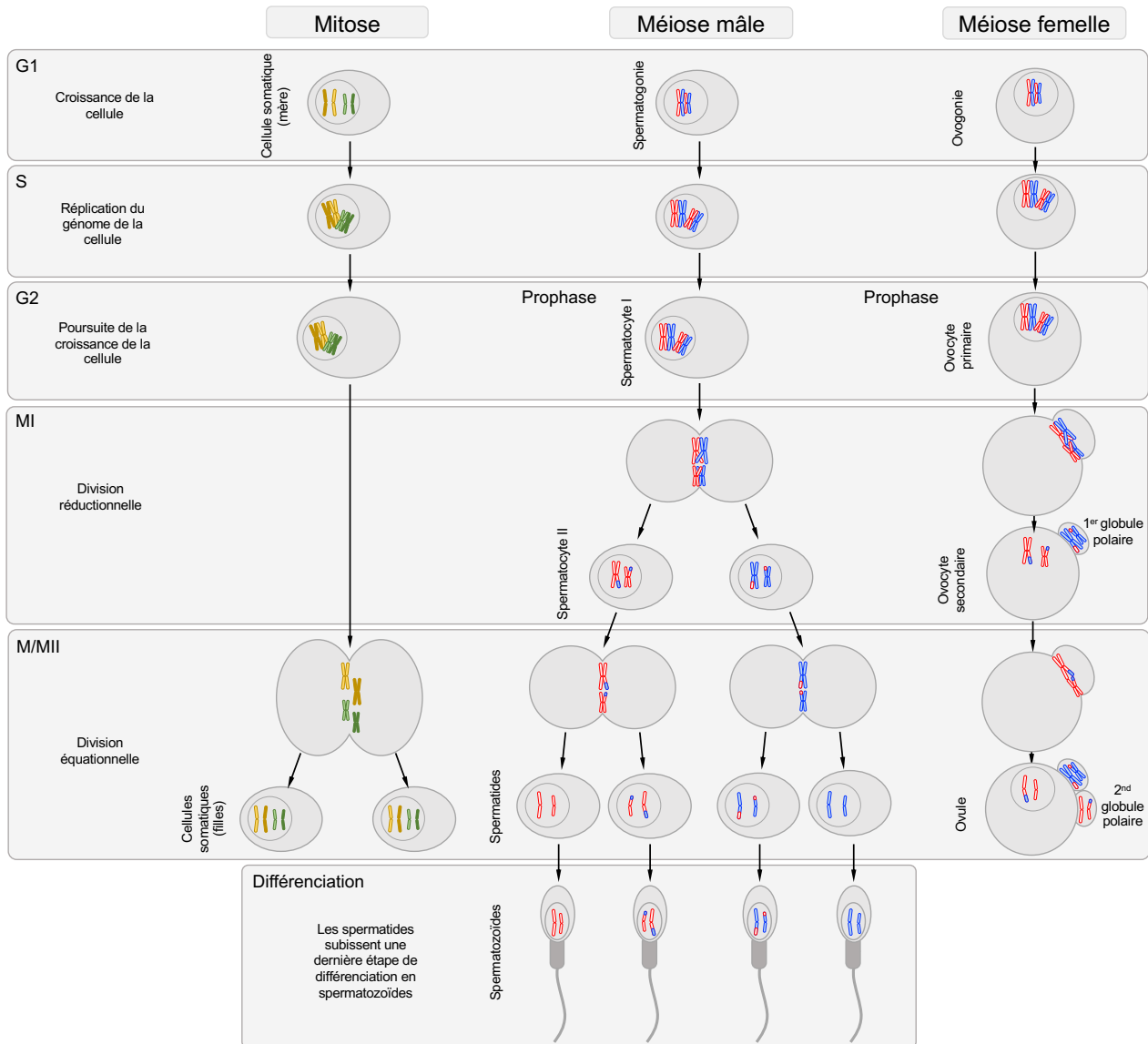


Figure 4 : Modalités de séparation des chromosomes en mitose et en méiose mâle et femelle.

La mitose et méiose II sont des divisions de type équationnel avec séparation des chromatides-sœurs, alors que la méiose I est une division réductionnelle (passant de $2n$ chromosomes à n chromosomes) avec séparation des chromosomes homologues.

Elles entament la méiose, on les appelle alors ovocytes I. La première division méiotique, réductionnelle, produit non pas deux cellules identiques mais un ovocyte II et un globule polaire, une cellule miniature, chacun haploïde. Seul l'ovocyte subit la seconde division, donnant un ovule et un second globule polaire, toujours haploïdes bien sûr. Les globules polaires sont des structures cellulaires qui, suivant les espèces, sont amenées à disparaître (comme chez les vertébrés) ou bien à jouer des rôles dans la formation de tissu nourricier et protecteur ou de l'endosperme chez certaines plantes (Schmerler and Wessel, 2011). Ainsi à la fin de la méiose, l'ovogonie donnera non pas quatre mais un seul gamète haploïde (**Fig. 4**).

3. Les phases M de méiose

Il est important de noter que la phase M a été nommée ainsi en référence à la mitose. Désormais, elle désigne aussi l'étape de division cellulaire qui intervient en méiose. Dans la suite de ce texte, il sera nommé phase M l'étape de division de la cellule, qu'elle soit mitotique ou méiotique. La phase M correspond à un ensemble de bouleversements structuraux de la cellule requis pour assurer sa division. Elle est organisée selon quatre grandes périodes. Tout commence par la prophase qui constitue l'étape cruciale lors de laquelle le matériel génétique de la cellule se compacte. Cette compaction est essentielle pour permettre la ségrégation des chromatides-sœurs qui forment chaque chromosome lors de la phase suivante. Il serait en effet impossible de ségréger des filaments longs de plusieurs microns, alors que cela est plus aisé lorsqu'ils sont sous une forme compactée (facteur de compaction d'environ 10 000 fois). La métaphase permet l'attachement des chromosomes au fuseau microtubulaire de division, puis leur alignement selon un plan équatorial. La ségrégation des deux chromatides-sœurs qui forment chaque chromosome a lieu lors de l'anaphase. Enfin, lors de la télophase, dernière étape de la phase M, le fuseau de division est désassemblé, la cytotélerèse sépare les deux cellules-filles, les chromosomes se décondensent et deux nouveaux noyaux sont formés au sein de chaque cellule-fille. Cette description correspond à une division dite équationnelle qui se produit lors de la mitose ou bien lors de la seconde division méiotique. En revanche, la première division méiotique (méiose I) présente de nombreuses modifications que nous avons déjà brièvement abordées, ce qui en fait une division dite réductionnelle.

a) La prophase

Durant la période de l'interphase, dont la durée est très variable suivant les espèces, la cellule poursuit sa croissance initiée lors de la phase G1, en prévision de la division. Des mécanismes de contrôle (appelés « *checkpoint* ») vérifient lors des phases S et G2 un certain nombre de critères : taille de la cellule, absence d'altération du génome, qualité de la duplication de l'ADN, ploïdie. Si des erreurs sont détectées, des mécanismes moléculaires procèdent aux réparations. Si les dommages sont irréparables, la cellule peut s'autodétruire par apoptose. Si toutes les conditions sont réunies, alors les cellules quittent la phase G2 et basculent en prophase de phase M. La prophase se caractérise comme l'avaient déjà observé Flemming et Van Beneden, par une compaction du matériel génétique. Cette étape est très différente entre mitose et méiose. En mitose, la prophase correspond à une étape de compaction du matériel génétique. En revanche, en méiose I, la prophase est bien plus complexe et est elle-même subdivisée en plusieurs étapes : Leptotène, Zygotène, Pachytène, Diplotène et Diacinèse (**Fig. 5**). Outre la compaction de l'ADN, elle a pour objectifs supplémentaires par rapport à la mitose, l'appariement des chromosomes homologues, la production d'échanges entre chromosomes homologues ce qui augmente la diversité génétique des gamètes, et chez les animaux, une très forte croissance cellulaire.

(1) Leptotène et formation de l'axe protéique, élément du futur complexe synaptonémal

Le mot leptotène provient du grec *leptos* (mince) et *tainia* (ruban). Les chromosomes se condensent. Chacun, composé de deux chromatides, est formé de boucles de chromatine ancrées sur un axe protéique. Ce dernier est composé des protéines à domaines HORMA (des domaines d'interaction protéine-protéine variant selon les environnements chromatiniens), HORMAD1/2 ainsi que de SYCP2 et SYCP3 chez les vertébrés. Ces quatre protéines forment l'axe longitudinal sur lequel les boucles de chromatines formant chaque chromosome se fixent en certains points. Les boucles de chromatine sont liées et maintenues sur l'axe via des cohésines (**Fig. 6**). Les cohésines, protéines formant une structure en forme d'anneau circulaire, jouent un rôle crucial car l'anneau qu'elles forment enserre les chromatides-sœurs et les maintient liées l'une à l'autre jusqu'en anaphase de seconde division méiotique. En méiose, la kléistine RAD21 (aussi nommée Scc1), une protéine fermant la boucle que forment les cohésines autour des chromatides, est remplacée par Rec8 et Rad21L. Rec8 est incorporée dès la phase

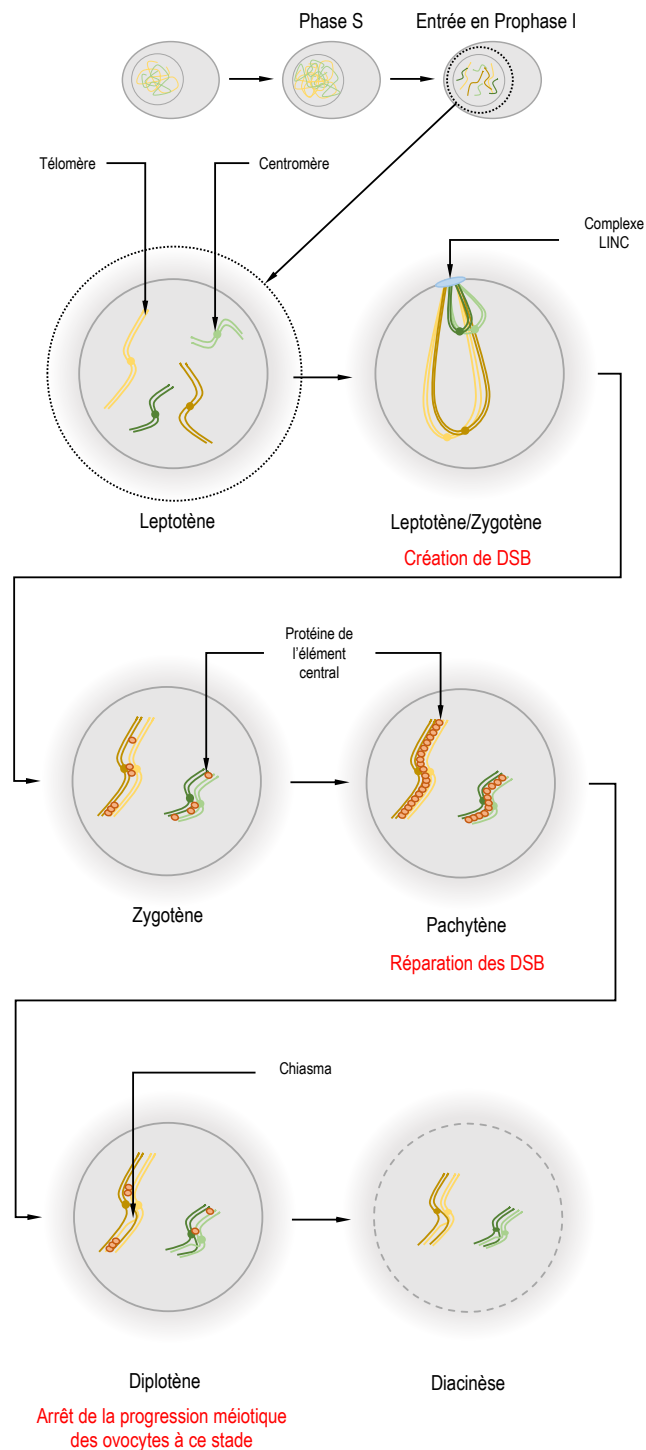


Figure 5 : Les différentes étapes de la prophase de méiose I.

Les futurs gamètes commencent la prophase I en entrant au stade leptotène suite à la réplication de la phase S pré-méiotique. Lors du stade leptotène, les chromosomes homologues commencent à se lier au complexe LINC. A la suite de leur appariement, les premières cassures double brins (DSBs) se produisent. Les cellules entrent ensuite au stade zygotène avec la mise en place des complexes synaptonémaux qui correspondent à des assemblages de protéines de l'élément central. Cette mise en place est complète lors du stade pachytène qui marque l'arrêt de la production de DSBs et leur réparation qui est à l'origine des chiasmata. Au stade diplotène, les complexes synaptonémaux se désassemblent laissant apparaître les chiasmata. La méiose des ovocytes s'arrête à ce stade. Elle reprendra après une intense phase de croissance en réponse à une stimulation hormonale, l'ovocyte entre alors dans le stade diacinèse, où les chromosomes se recomparent et les divisions méiotiques s'enclenchent ensuite.

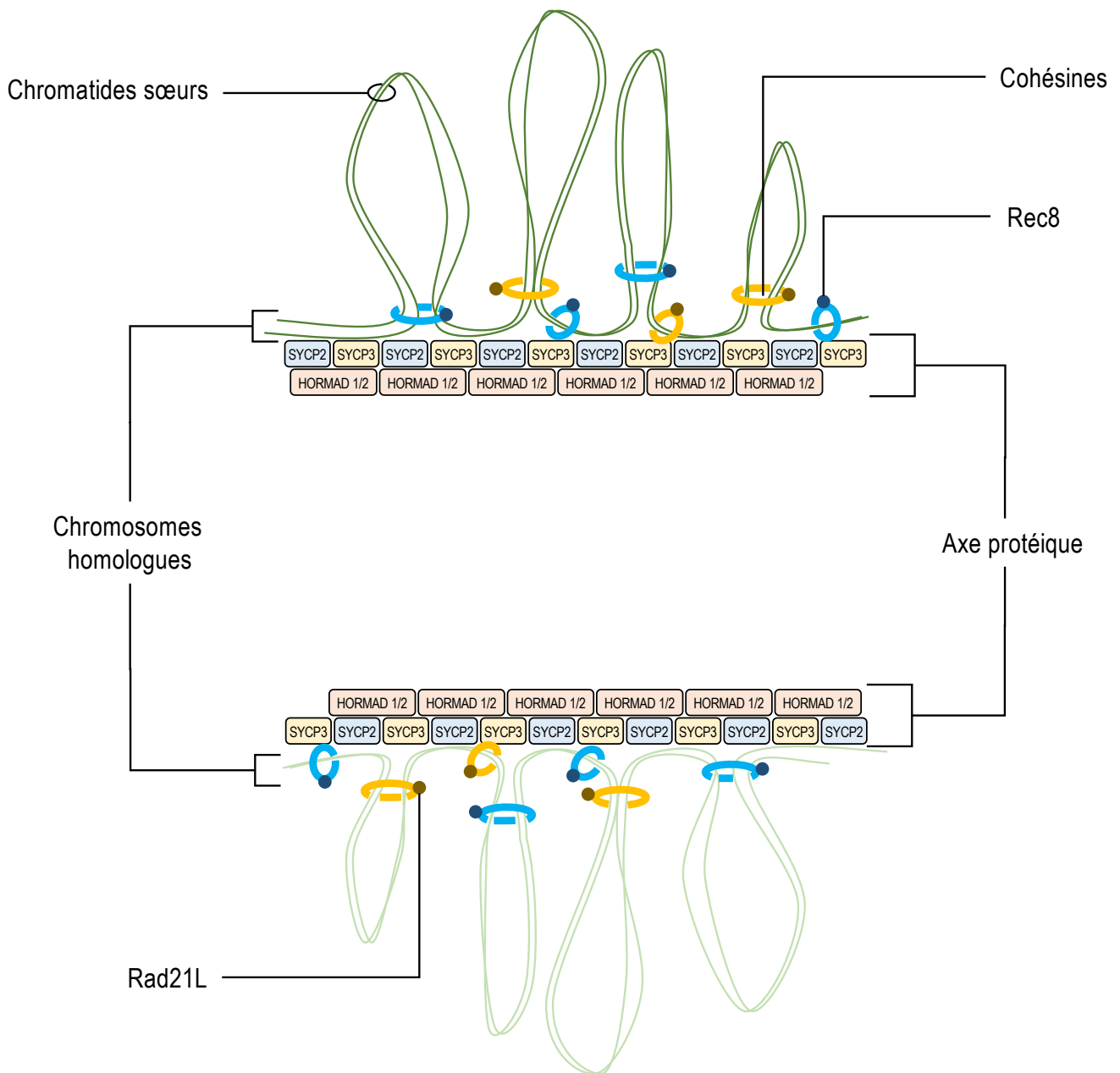


Figure 6 : Composition de l'axe transversal au stade leptotène.

Un axe protéique se forme le long des chromatides-sœurs composée des protéines SYCP2 et SYCP3. Via les cohésines, les protéines à domaines HORMA : HORMAD 1 et 2 vont y être recrutées. Au stade leptotène, l'anneau de cohésines formé autour des chromatides se ferme grâce à la kléisine Rec8 (en bleu) ou la kléisine Rad21L (en jaune). Les cohésines participent ainsi au maintien des chromatides-sœurs liées l'une à l'autre, mais aussi au maintien des boucles de chromatine.

S pré-méiotique mais l'est principalement lors du stade leptotène comme Rad21L (Lee and Hirano, 2011). Par ailleurs, plusieurs études laissent à penser que Rec8 serait impliqué dans le correct établissement de l'axe (Ishiguro *et al.*, 2014; Agostinho *et al.*, 2016; Ishiguro and Watanabe, 2016).

(2) Transition leptotène/zygotène et prémices de l'appariement des chromosomes par cassure de l'ADN double-brin

C'est aussi durant la fin du stade leptotène que vont se produire les cassures double-brin (ou DSB pour *Double Strand Break*) catalysées par la topoisomérase Spo11. Ces cassures se comptent par centaines dans le noyau, et sont visualisables grâce à l'incorporation du variant d'histone γ H2AX (au sein des nucléosomes situés à proximité de la DSB). Elles sont rigoureusement contrôlées et sont primordiales pour la suite de la méiose car les réparations par homologie de l'ADN induites par ces cassures jouent un rôle central dans l'appariement des chromosomes homologues, qu'elles soient ou non à l'origine de crossing-over. En effet, l'homologie de séquence nécessaire pour réparer la cassure est à l'origine d'une interaction entre les deux chromosomes homologues. Ces réparations s'étendent sur la majeure partie des stades leptotène à pachytène, contribuant ainsi au maintien de l'appariement des chromosomes homologues. Les DSBs ne représentent que la première étape de l'appariement des chromosomes qui ne sera total que lorsque les cellules auront atteint le stade pachytène. En fin de stade leptotène, l'appariement des chromosomes commence à partir de ces cassures et se propage de bout en bout par la formation de ponts protéiques entre les axes protéiques des deux chromosomes homologues, formant ce que l'on appelle les complexes synaptonémaux (Fig. 5).

(3) Transition leptotène/zygotène et mouvement du noyau

A noter que chez certaines espèces (levure, plantes supérieures, souris), les télomères et parfois les centromères de chaque chromosome s'associent chacun à un pôle opposé du noyau. Cette fixation joue elle-aussi un rôle dans l'appariement des chromosomes homologues. Les centromères comme les télomères, sont fixés à la paroi interne du noyau par le complexe LINC (pour *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) (Figs 5, 7 et 8). Ce complexe est composé des protéines nommées SUN (*Sad1 and UNC-84 homology*) fixées à la membrane interne du

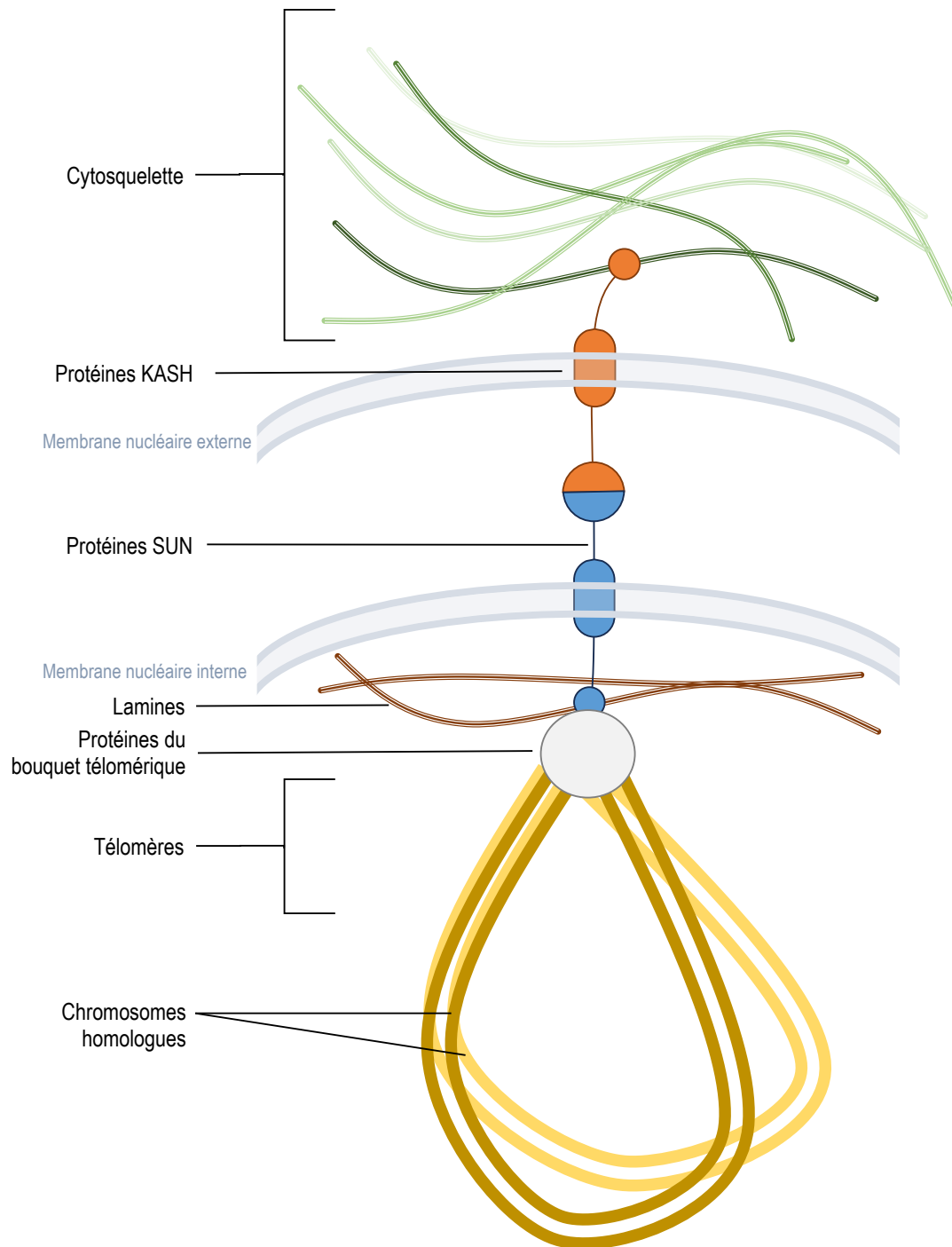


Figure 7 : Le complexe LINC (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*).

Chez de nombreuses espèces, lors de la méiose, les télomères se lient en un point du noyau appelé bouquet télomérique. Il est constitué des télomères, de protéines télomériques comme Taz1 et Rap1 et des protéines Bqt1/2 dites protéines du bouquet télomérique (Chikashige *et al.*, 2006). Cette fixation participe à l'appariement des chromosomes homologues. Les télomères sont liés indirectement au cytosquelette de la cellule par l'intermédiaire du complexe LINC, composé des protéines SUN et KASH. Ce sont les protéines du bouquet télomérique qui servent d'intermédiaire entre les télomères et les protéines SUN (figurées en bleu) situées dans la membrane interne du noyau. SUN interagit avec KASH (figurées en orange), protéines transmembranaires de la membrane externe du noyau. Ceci permet d'obtenir un réseau de protéines reliant les chromosomes au cytosquelette.

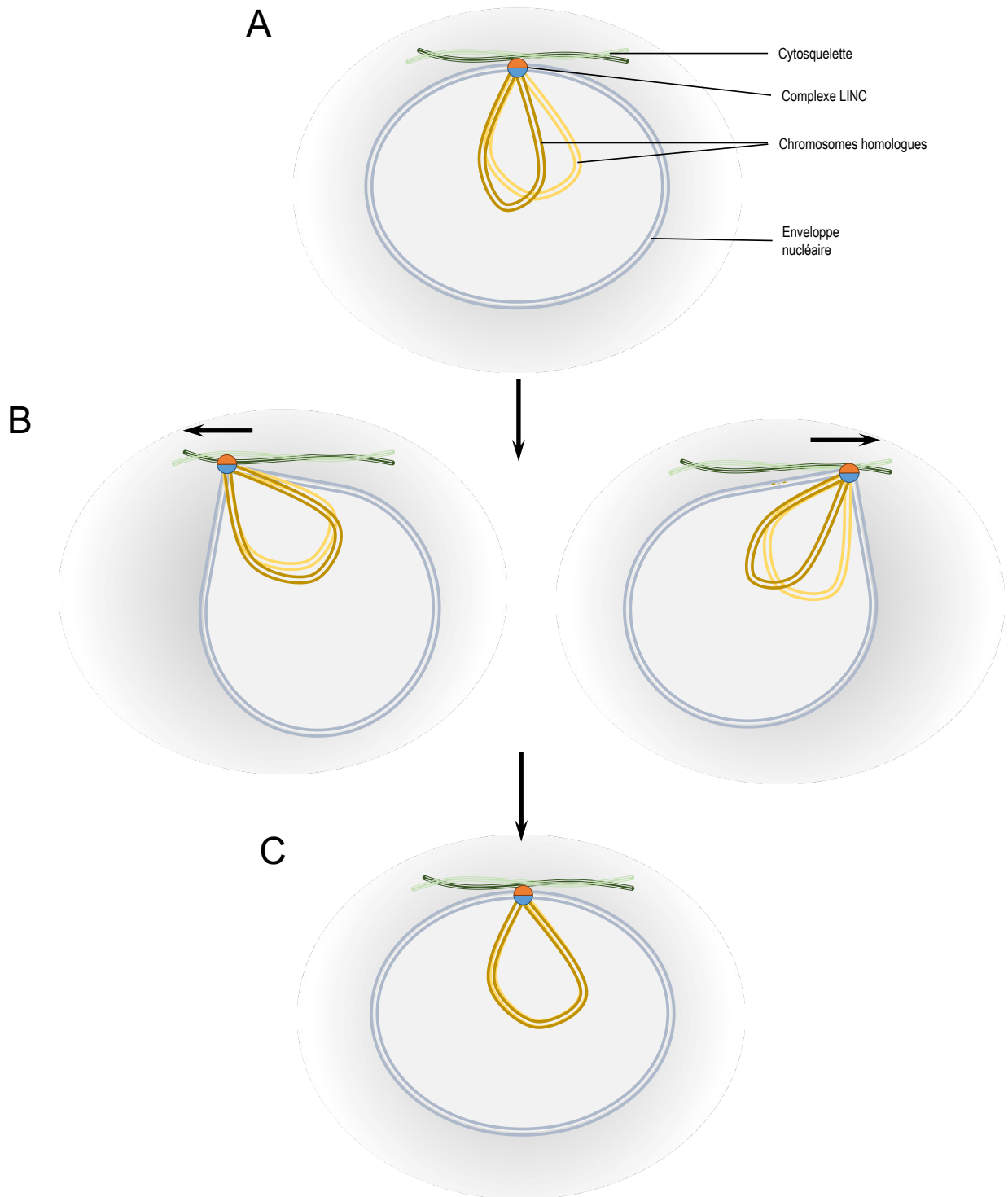


Figure 8 : Les mouvements du noyau, un mécanisme favorisant l'appariement des chromosomes.

Afin de permettre aux chromosomes de s'apparier entre homologues, l'un des mécanisme consiste à mettre en mouvement le noyau. **(A)** Comme vu dans la **Figure 7**, les télomères sont liés par le complexe LINC (SUN et KASH respectivement en bleu et orange) au cytosquelette de la cellule (fibres vertes). **(B)** Par leur intermédiaire, le cytosquelette va permettre d'imposer des mouvements au noyau qui se répercutent par des mouvements latéraux aux chromosomes, favorisant l'appariement des homologues. **(C)** Les chromosomes qui sont homologues présentent des propriétés mécaniques identiques: ils vont donc se mouvoir de manière similaire dans le noyau facilitant ainsi leur appariement.

noyau et des protéines KASH (*Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology*) fixées à la membrane externe. Les centromères et les télomères sont liés aux protéines SUN qui elles-mêmes interagissent avec les protéines KASH fixées au cytosquelette de la cellule (Burke, 2012). Ce lien entre toutes ces structures est essentiel puisqu'il va permettre au cytosquelette d'imprimer des mouvements au noyau (**Fig. 8**). Ces mouvements aident les chromosomes à trouver leur homologue. En effet, par leur liaison indirecte au cytosquelette via l'enveloppe nucléaire, les chromosomes deviennent solidaires du noyau sur le plan mécanique et se déforment de manière similaire lors des mouvements du noyau, potentialisant les chances de rencontre et d'appariement entre homologues. De plus, ces mouvements déstabilisent les appariements potentiels entre chromosomes non-homologues dont la stabilité est beaucoup moins forte.

(4) Zygotène et Pachytène

L'initiation de la synapsis (appariement des chromosomes homologues de bout en bout) signe le début du stade zygotène. Durant cette période, les complexes synaptonémaux se mettent en place le long des chromosomes homologues. Ces derniers sont essentiels car ils promeuvent la formation de crossing-over lors de la réparation des DSBs et ont aussi pour effet de réduire, au fur et à mesure de leur assemblage, l'activité de Spo11, ce qui met fin aux cassures. Les axes protéiques longitudinaux de chaque chromosome homologue forment les deux éléments latéraux du complexe synaptonémal. L'élément central est formé par diverses protéines. Chez les vertébrés, c'est la protéine SYCP1 qui joue le rôle de pont entre chacun des chromosomes homologues et leur axe. SYCP1 et les protéines SYCE1 à 3 s'associent au complexe SYCP2-SYCP3 des axes des deux chromosomes homologues et forment ainsi l'élément central du complexe synaptonémal (**Fig. 9**). Ainsi durant cette période, chaque chromosome va progressivement s'apparier de bout en bout avec son homologue. Le point culminant est atteint lors du stade pachytène lorsque l'ensemble des chromosomes est organisé en paires, raison pour laquelle ils apparaissent ainsi plus épais (pachytène venant du grec « pakhus » qui signifie épais). C'est durant ce troisième stade de la prophase que vont s'effectuer les événements de recombinaison homologue donnant lieu à des crossing-over entre chromosomes homologues.

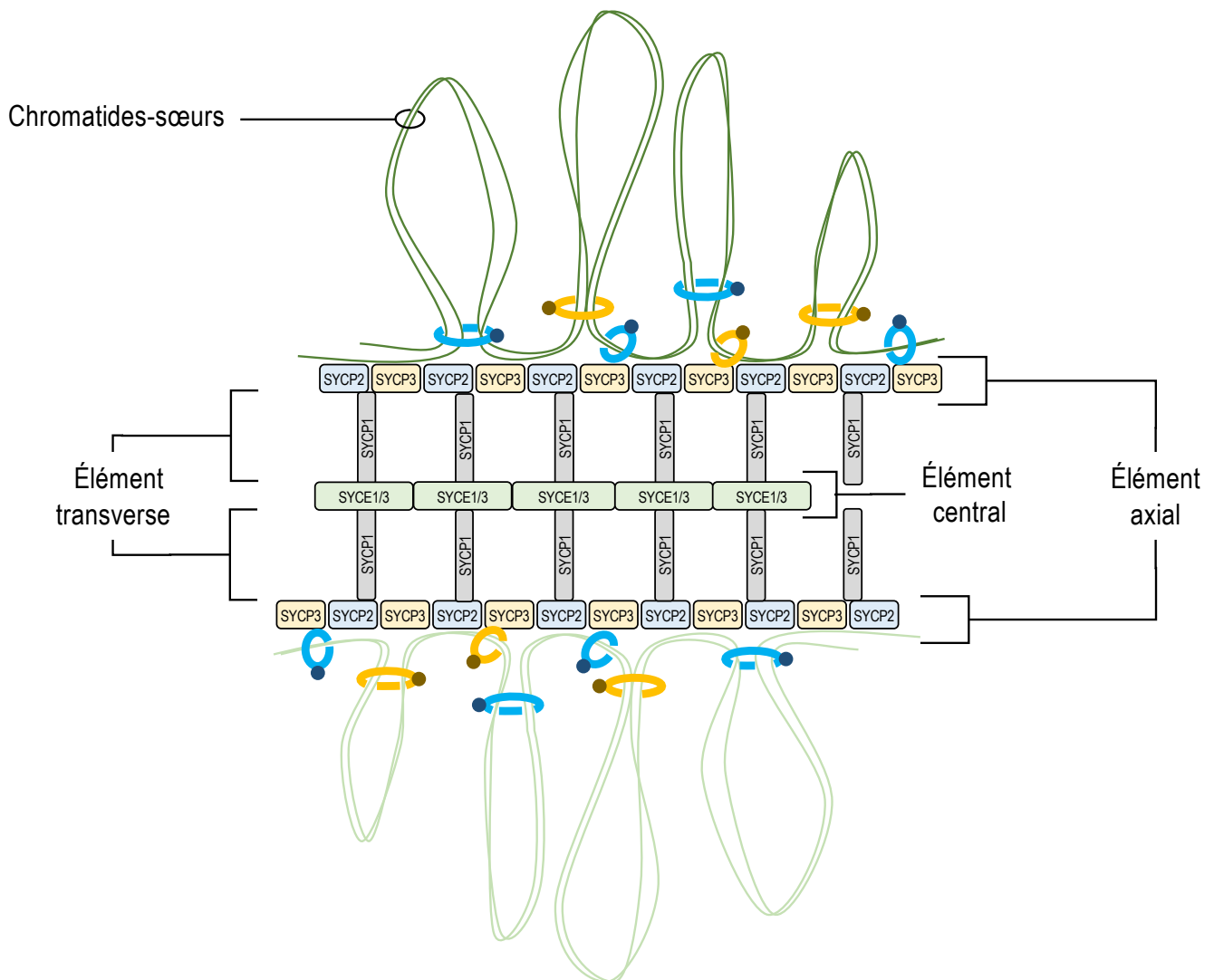


Figure 9 : Structure du complexe synaptonémal aux stades zygotène et pachytène.

Le complexe synaptonémal s'établit à partir de l'axe chromosomique préexistant (voir Figure 6) qui devient l'élément axial. Lorsque les chromosomes homologues sont appariés, leurs axes se retrouvent face à face, ce qui va permettre la mise en place d'éléments transversaux et centraux du complexe. L'élément transversal est constitué de la protéine SYCP1, qui sert de pont entre l'axe protéique et les éléments centraux du complexe synaptonémal composé des protéines SYCE1 à 3. Ainsi le complexe synaptonémal s'assemble à l'image d'une fermeture éclair qui se ferme progressivement, liant les homologues l'un à l'autre pour permettre la réparation par recombinaison homologue des DSBs.

(5) Diplotène

Durant cette période, les chromosomes se désappariaient par désassemblage des complexes synaptonémaux, laissant apparaître des structures entre les chromosomes homologues : les chiasmas. Les chiasmas correspondent aux points où la réparation des DSBs a eu lieu. La résolution de la jonction de Holliday n'ayant pas encore eu lieu, les deux homologues restent liés l'un à l'autre. Le maintien de cette liaison est cruciale jusqu'en fin de métaphase : les deux chromosomes homologues restant attachés l'un à l'autre, ils sont obligatoirement ségrégués dans des cellules-filles distinctes, ce qui ne serait pas le cas s'ils étaient séparés l'un de l'autre et ainsi ségrégués aléatoirement dans les cellules-filles. Au moins un chiasma par paire d'homologues est nécessaire pour assurer un lien entre les chromosomes jusqu'à leur ségrégation. Chez toutes les femelles des métazoaires, les ovocytes arrêtent leur progression méiotique à ce stade de la prophase. La chromatine se décondense partiellement, formant de très longues boucles transcriptionnellement très actives. Cet arrêt en prophase I des ovocytes leur permet d'accumuler protéines et ARN nécessaires notamment pour assurer le développement embryonnaire à venir. Une stimulation hormonale ou la fécondation suivant l'espèce, provoque la reprise de la méiose, au moment de l'ovulation. L'ovocyte passe ainsi au dernier stade de la prophase I : la diacinèse.

(6) Diacinèse

Une fois ce stade atteint, les chromosomes se condensent de nouveau. En parallèle, la membrane nucléaire commence à se disloquer et forme de petites vésicules et le nucléole (zone du noyau impliquée dans la synthèse des ribosomes) se dissout en préparation de la future ségrégation des chromosomes.

b) Prométaphase/Métaphase

A la suite de la prophase débute la métaphase (« meta » signifiant « après », et « phase » signifiant processus en grec). Cette phase correspond à la formation du fuseau mitotique ou méiotique et à son association avec les chromosomes au niveau de leur centromère en vue de leur ségrégation.

(1) Prométaphase/Métaphase de mitose et de méiose I

La différence entre la division équationnelle (valable pour la mitose) et la division réductionnelle (valable pour la méiose I) est due aux évènements qui ont lieu pendant la prophase (les chromosomes homologues sont liés l'un à l'autre) et pendant la métaphase. Lors de la première division méiotique, ce ne sont pas les chromatides de chacun des chromosomes homologues qui vont être ségrégués dans les cellules-filles, mais les chromosomes homologues eux-mêmes. Ceci est dû en partie au fait que les chromosomes homologues sont liés l'un à l'autre via les chiasmas, mais aussi au fait que les chromatides-sœurs d'un chromosome sont toutes deux associées à un même pôle du fuseau. En revanche, chacun des chromosomes homologues d'une même paire est associé à un pôle opposé du fuseau méiotique. C'est cette association particulière des chromosomes propre à la méiose I qui lui donne son caractère réductionnel (**Fig. 10**). La cellule passera de deux copies à une copie de chaque chromosome. En outre, chaque chromosome est le fruit d'un mélange de séquences paternelles et maternelles à la suite des crossing-over produits durant la prophase. Ainsi, bien que dérivant d'ovogonies ayant des génomes identiques, les cellules-filles issues de la méiose sont très diverses sur le plan génomique, à la fois à cause des remaniements chromosomiques mais aussi des ségrégations variées entre chromosomes paternels et maternels.

(2) Déroulement de la prométaphase

(a) Mono-orientation des chromatides sœurs et bi-orientation des chromosomes homologues

En métaphase, les chromosomes sont alignés au centre de la cellule, sur un plan équatorial, attachés par leur centrosome aux microtubules du fuseau mitotique : cet ensemble forme la plaque métaphasique. La prométaphase correspond à toutes les étapes qui conduisent à l'obtention de cette organisation. Cette dernière nécessite que les chromosomes soient reliés aux microtubules du fuseau par une interface protéique appelée kinétochore. Le kinétochore s'assemble sur les centrosomes de chaque chromatide. Les centrosomes sont constitués de nucléosomes particuliers contenant le variant d'histone CENP-A et des séquences répétées qui se trouvent à la jonction des deux bras des chromatides. Le kinétochore est une structure protéique de très grande taille composée de centaines de protéines, organisée en deux couches : les couches interne (interaction avec les centromères) et externe (interaction avec les microtubules). Le kinétochore interne est composé de plusieurs complexes protéiques

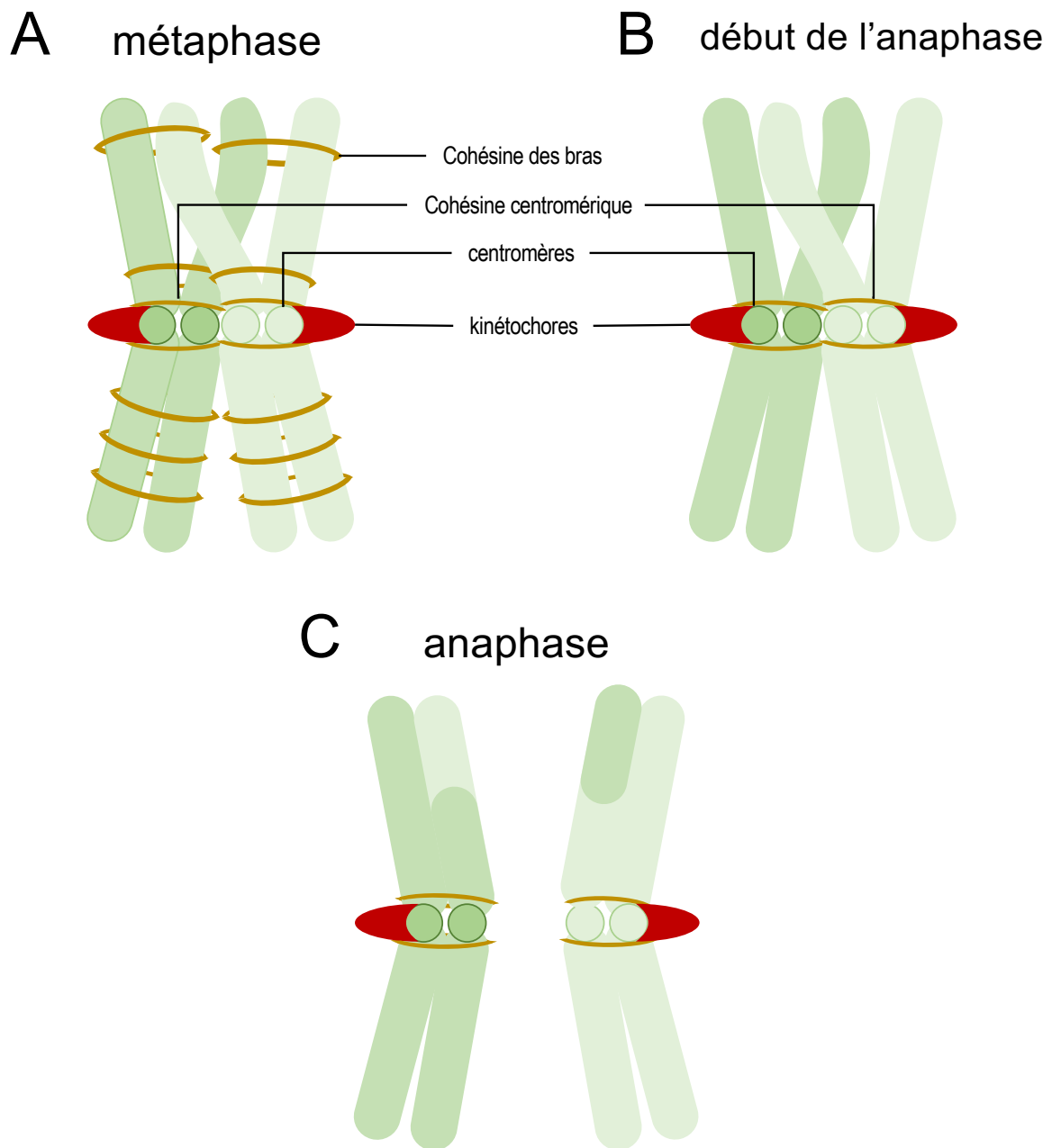


Figure 10 : Ségrégation des chromosomes homologues en méiose I.

(A) En prométaphase I et métaphase I, les chromatides-sœurs sont liées au niveau centromérique ainsi qu'au niveau des bras par des cohésines (ici en marron) alors que les homologues sont liés l'un à l'autre via les chiasmats. **(B)** L'entrée en anaphase I est marquée par l'activation de la Séparase qui va dégrader les cohésines. Néanmoins, afin de conserver une cohésion entre les chromatides-sœurs qui ne seront ségrégués que lors de l'anaphase II, seules les cohésines des bras vont être dégradées. Les cohésines centromériques sont protégées de la dégradation par la protéine Shugoshin SGO2. **(C)** Ainsi, suite à la résolution des jonctions de Holliday par l'action des résolvasés et d'endonucléases, seuls les chromosomes homologues seront ségrégués. La structure rouge au niveau centromérique correspond aux kinétochores. Ces derniers sont mono-orientés vis-à-vis des chromatides-sœurs et bi-orientés vis-à-vis des homologues, afin de permettre leur ségrégation chacun à un pôle opposé du fuseau.

formant le réseau CCAN (*constitutive centromere associated network*) : CENP-HIKM, CENP-OPQUR, CENP-LN, CENP-TWSX et CENP-C (Yan *et al.*, 2019; Pesenti *et al.*, 2022). Le kinétochore externe est constitué de l'assemblage de complexes protéiques KMN composé des complexes Kln1 (Kln1 et Zwint), Mis12 (Dsn1, Mis12, Nsl1 et Nnf1) et Ndc80 (Ndc80, Nuf2, Spc25 et Spc24) (Rago, Gascoigne and Cheeseman, 2015; Weir *et al.*, 2016) (**Fig. 11**). Selon que ce sont les chromatides ou les chromosomes qui se séparent, la géométrie du kinétochore est variable. Lors de la mitose, les chromatides-soeurs présentent chacune un kinétochore orienté de manière opposé afin de permettre leur ségrégation, chacune à un pôle opposé du fuseau. En revanche, en méiose I, les chromatides-sœurs d'un même chromosome doivent ségréger ensemble vers un même pôle du fuseau puisque la ségrégation porte sur les chromosomes. Ceci implique que leurs kinétochores soient orientés de façon identique, vers un même pôle. Cette mono-orientation des chromatides-sœurs est obtenue par différents mécanismes selon les espèces. Chez les organismes supérieurs tels que la souris, c'est la kléisine Rec8 spécifique de la méiose qui interviendrait. Son clivage artificiel par la protéase TEV au niveau des kinétochores des chromatides-sœurs conduit à une bi-orientation en absence de chiasmas, suggérant un rôle de Rec8 dans la mono-orientation des chromatides (Tachibana-Konwalski *et al.*, 2013). Ainsi, Rec8 ne joue pas seulement un rôle dans la cohésion des chromatides-sœurs aux centromères mais aussi dans l'orientation de leurs kinétochores.

(b) Particularité de la prométaphase/métaphase pour les ovocytes

De manière étonnante, chez la grande majorité des espèces animales, les centrioles sont absents dans les ovocytes. Chez les chordés, la drosophile et les nématodes, les centrioles disparaissent à la fin du pachytène (Manandhar, Schatten and Sutovsky, 2005). Or, les centrioles forment, avec le matériel péricentriolaire (PCM), les centrosomes, qui sont dotés d'une activité appelée MTOC (*Microtubule-Organizing Centers*) (Conduit, Wainman and Raff, 2015). Les centrosomes, dupliqués lors de la phase S en mitose, se positionnent en prophase de part et d'autre du noyau puis forment en métaphase les deux pôles du fuseau mitotique à partir desquels les microtubules polymérisent. Certains d'entre eux, les microtubules astraux, ancrent le fuseau à la membrane plasmique. D'autres vont d'un pôle à l'autre et donnent sa forme fusiforme à cette structure bipolaire. Enfin, les microtubules kinétochoriens correspondent à ceux dont le bout (+) a capturé un kinétochore. L'absence de centrioles dans les ovocytes paraît paradoxale étant donné l'importance de la bonne ségrégation des

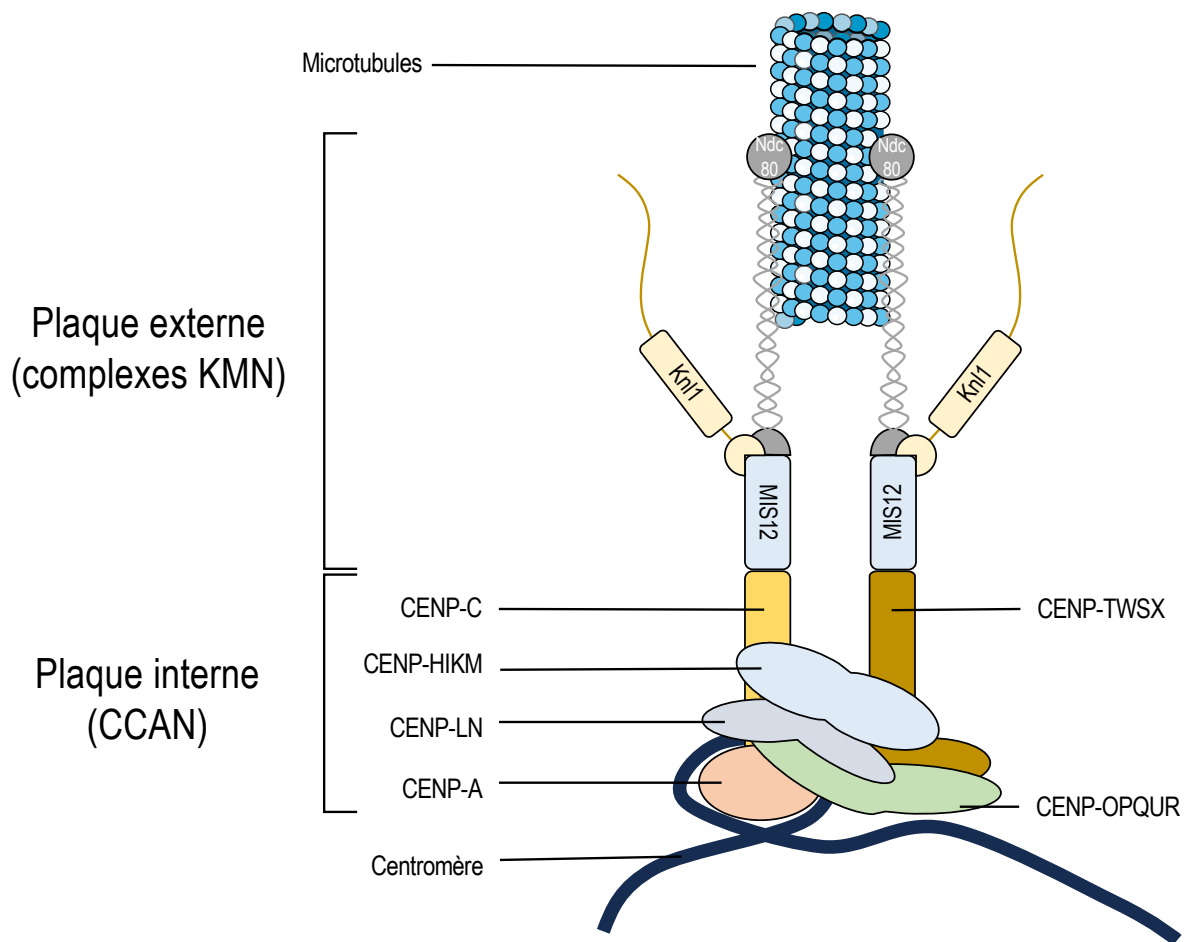


Figure 11 : Structure du kinétochore.

Au sein des nucléosomes centromériques, l’histone H3 est remplacé par le variant CENP-A qui joue le rôle de fondation de la structure du kinétochore. Différents complexes, qui constituent le CCAN, vont se fixer et se structurer. Ce réseau est constitué de CENP-C qui se lie à CENP-A, sur lequel viennent s’ajouter les complexes CENP-LN (constitué des CENP-L et N), CENP-HIKM (CENP-H, I, K et M), CENP-OPQUR (CENP-O,P,Q,U et R) et CENP-TWSX (CENP-T, W, S et X). L’ensemble des complexes du CCAN correspond à la plaque interne du kinétochore sur laquelle va venir se lier la plaque externe principalement constituée des complexes KMN pour Knl1, Mis12 et Ndc80. La plaque externe sera le lieu de l’interaction entre le kinétochore et les microtubules via Ndc80, reliant ainsi les chromosomes au fuseau.

chromosomes lors de ce processus. Néanmoins, les ovocytes sont capables de former un fuseau avec deux pôles distincts en méiose et cela en l'absence de centrioles. Ceci est permis d'une part car le matériel péricentriolaire est quant à lui toujours présent (les plantes sont également dépourvues de centrioles mais ont un MTOC actif dû au matériel péricentriolaire), et d'autre part grâce à la mise en place de mécanisme(s) alternatif(s) qui compense(nt) cette absence de centriole, en particulier le gradient de Ran-GTP (Gruss *et al.*, 2001; Dumont and Verlhac, 2013; Gruss, 2018) (**Fig. 12**). Bien qu'indispensable en méiose II, ce gradient ne serait pas nécessaire en méiose I chez la souris et le Xénope lors de laquelle un autre mécanisme indépendant du gradient interviendrait (Dumont *et al.*, 2007; Brunet *et al.*, 2008).

Ran est une petite GTPase de la super-famille Ras, qui est retrouvée sous deux formes : une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Dans les ovocytes, il existe un gradient de la protéine Ran-GTP autour de la chromatine. La protéine Rcc1, fixée aux chromosomes, est la GEF (*GTP Exchange Factor*) qui permet de remplacer le GDP de Ran-GDP par un GTP, ce qui rend Ran actif à proximité de la chromatine (Carazo-Salas *et al.*, 1999). Au contraire, au niveau cytosolique, se trouve RanBP1 (*Ran Binding Protein*) et RanGAP qui sont responsables de l'hydrolyse du GTP et de l'inactivation de Ran. Cette distribution des GEFs et GAPs de Ran explique le gradient d'activité de Ran à proximité de la chromatine qui est le point de départ d'évènements complexes à l'origine de l'élaboration du fuseau. En particulier, Ran-GTP permet le recrutement de protéines telles que TPX2, un facteur de nucléation des microtubules (Gruss *et al.*, 2001, 2002; Brunet *et al.*, 2008). Les microtubules polymérisent donc à partir des chromosomes vers les pôles, et non l'inverse comme dans les cas plus classiques des fuseaux mitotiques, et permettent la formation du fuseau en interaction avec les protéines du matériel péricentriolaire.

(c) Système de vérification de la bonne fixation des microtubules du fuseau aux kinétochores

Une fois les kinétochores de deux chromatides-sœurs d'un même chromosome orientés dans la bonne direction, un autre aspect critique est que tous les microtubules qui y sont associés proviennent du même pôle. Cette fixation des deux kinétochores d'un chromosome au même pôle du fuseau est dite synthélique et s'observe uniquement lors de la méiose I (Watanabe, 2012). A l'inverse, en mitose ou en méiose II, la fixation est dite amphithélique, les kinétochores des chromatides-sœurs d'un chromosome étant reliés chacun

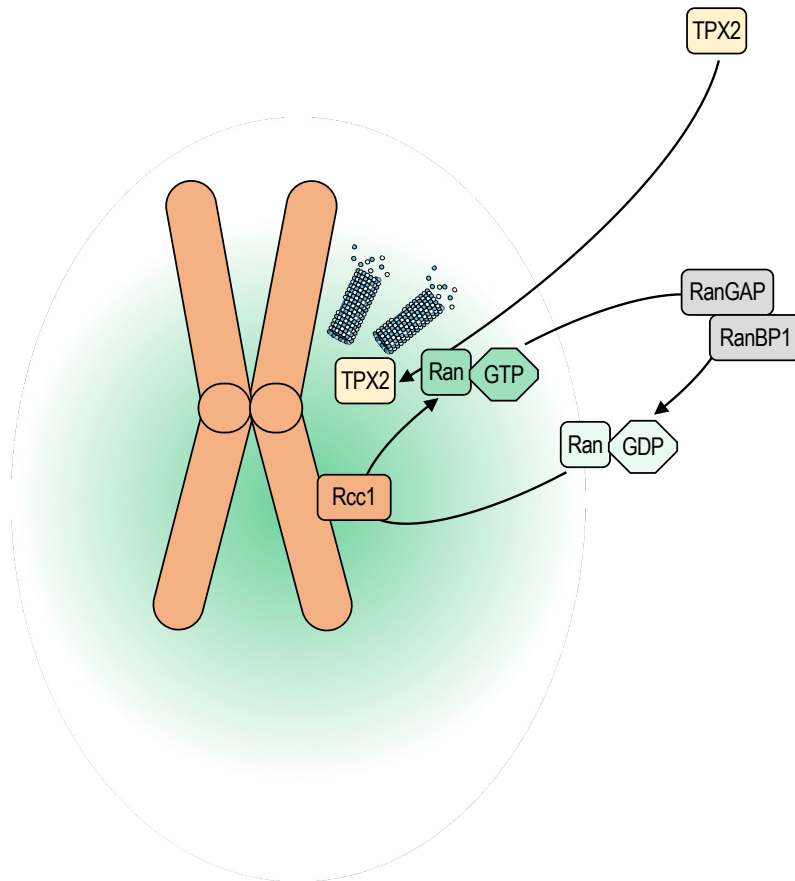


Figure 12 : Gradient de Ran-GTP et établissement du fuseau de division.

Au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire, le fuseau de division se met en place dans l'ovocyte à partir des centrosomes. Chez la plupart des espèces animales, les centrioles sont absents mais néanmoins, le matériel péricentriolaire (PMC), qui constitue une partie du centrosome, est présent. Des voies alternatives indépendantes du centrosome sont mises en place pour l'établissement du fuseau de division. L'établissement d'un gradient de Ran (Ran-GTP) actif au niveau de la chromatine est nécessaire, au moins en méiose II, pour la formation du fuseau méiotique. Ce dernier est permis par l'activité GEF de la protéine Rcc1 localisée au niveau de la chromatine. Rcc1 échange le GDP de Ran par du GTP, le rendant actif. Au niveau cytosolique, ce sont RanBP1 et RanGAP qui inactiveront Ran en hydrolysant le GTP. Un gradient de concentration en Ran-GTP s'établit avec une concentration maximale à proximité de la chromatine. Ceci permet le recrutement à ce niveau précis des protéines nécessaires à la mise en place du fuseau tel que TPX2, un facteur de nucléation des microtubules.

à un pôle opposé du fuseau. Un troisième type de fixation non productif et délétère pour le futur gamète s'il survient en méiose I, est dit mérothélique et correspond à l'ancrage d'un même kinétochore aux deux pôles du fuseau (Watanabe, 2012). Afin d'empêcher ce dernier type de fixation, la cellule a mis en place un impressionnant système de contrôle reposant sur la perception des tensions exercées au niveau des kinétochores par leur attachement aux microtubules du fuseau. Plusieurs types de tensions sont prises en compte par ce système : les tensions intra-kinétochoriennes au sein du kinétochore ou les tensions inter-kinétochoriennes qui s'exercent entre les deux kinétochores bi-orientés des chromatides-sœurs (McVey, Cosby and Nannas, 2021). Cette dernière tension étant absente en méiose I, du fait de la mono-orientation des kinétochores des chromatides, une autre tension est prise en compte : celle s'exerçant au niveau des chiasmas, zones de rattachement des chromosomes homologues l'un à l'autre. La mesure de ce type de tension est en effet le reflet indirect d'une bonne orientation des kinétochores : plus ces tensions sont importantes, plus les chromosomes homologues sont soumis à des forces émanant des pôles opposés, c'est-à-dire que les attachements de leurs kinétochores sont opposés et donc adaptés à une bonne ségrégation des chromosomes (Watanabe, 2012). Durant la métaphase I, de nombreux attachements des kinétochores vont se mettre en place de façon incorrecte (appariements de type amphithélique ou mérothélique) et seront éliminés par des mécanismes de contrôle moléculaire très complexes. Seuls les attachements de type monothélique seront conservés en méiose I. Ainsi, à la fin de ce processus « d'essais et d'erreurs », les homologues seront fixés de manière correcte au fuseau entraînant une forte tension intra-kinétochorienne et au niveau des chiasmas. Si la mesure de ces tensions est correcte, elle constitue un signal positif pour la transition métaphase/anaphase.

(d) Acteurs moléculaires du système de vérification pour la transition métaphase/anaphase

Le point de vérification ou de surveillance de la bonne fixation des microtubules du fuseau aux chromosomes et des tensions s'exerçant au niveau des kinétochores et des chiasmas, qui permet le passage de métaphase I à anaphase I, correspond au SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) (Fig. 13). Il fait intervenir de nombreux complexes protéiques : l'APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), le MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*), et le CPC (*Chromosomes Passenger Complex*). Tout d'abord, la résolution des chiasmas et la séparation

des chromosomes homologues en anaphase nécessitent le clivage des cohésines des chromatides-sœurs par une protéase nommée Séparase (Wassmann, 2022). Jusqu'en métaphase, la Séparase est liée à une protéine appelée Sécurine qui l'empêche de cliver la kléisine Rec8, ce qui maintient ainsi les homologues liés ensemble. L'entrée en anaphase I est marquée par la dégradation de la Sécurine qui est assurée grâce à l'APC/C fixé à son adaptateur Cdc20 (d'où sa dénomination APC/C^{Cdc20}), un complexe protéique à activité E3 ubiquitine ligase. Le SAC est capable de détecter les kinétochores non-attachés, et dans ce cas, d'activer son effecteur, le complexe MCC qui va retarder la transition métaphase I/anaphase I en séquestrant Cdc20, ce qui maintient l'APC/C inactif (Sudakin, Chan and Yen, 2001) (**Fig. 13**). Tant que le complexe MCC n'est pas dissout, aucune dégradation de la Sécurine n'est donc possible. Pendant toute la métaphase I, Cdc20 reste séquestré par le complexe MCC composé des protéines BubR1 (*Budding Uninhibited by Benzimidazole 1-Related 1*), Bub3 (*Budding Uninhibited by Benomyl protein 3*) et Mad2 (*Mitotic Arrest Deficient 2*) dans sa conformation active fermée (c-Mad2 pour *closed-Mad2*). Le complexe MCC s'assemble sur le kinétochore et plus précisément sur la protéine du kinétochore externe Knl1. Lorsque Knl1 est phosphorylé sur les motifs MELT (méthionine-glutamate-leucine-thréonine) par la master kinase du SAC, Mps1 (Ji *et al.*, 2017), Knl1 recrute Bub1-Bub3/BubR1-Bub3 qui lient à leur tour le complexe Mad1-Mad2. Mad1 est aussi recruté au kinétochore par une autre voie (Silió, McAinsh and Millar, 2015). En effet, les phosphorylations multiples de Knl1 par Mps1 permettent aussi le recrutement au kinétochore du complexe RZZ (Rod, Zwilch, ZW10) qui lui-même permet la liaison à la protéine Mad1 (Karess, 2005). Mad1, une fois fixé au kinétochore, va recruter Mad2 et modifier sa conformation, de la forme inactive ouverte à sa forme active fermée capable d'interagir avec Cdc20. Ainsi, via l'assemblage du MCC, le SAC est responsable de l'inhibition de l'APC/C et permet l'élaboration de la métaphase I mais retarde aussi la ségrégation des chromosomes homologues en cas de défauts d'attachements des kinétochores aux microtubules. C'est la sous-unité Ndc80 du complexe KMN (pour KNL, Mis12 et Ndc80) formant la plaque externe du kinétochore, qui constitue le point d'ancrage direct des microtubules (Cheeseman *et al.*, 2006). Soit Mps1 se fixe à Ndc80, phosphoryle alors Knl1 et entraîne, comme décrit précédemment, le recrutement des protéines du MCC et l'activation du SAC ; soit ce sont les microtubules qui se fixent à Ndc80. Cette compétition entre Mps1 et les microtubules pour la fixation au kinétochore via Ndc80 va donc déterminer l'activation du SAC ou, au contraire, sa levée et la poursuite de la division. Ce mécanisme complexe fait que le SAC est un véritable

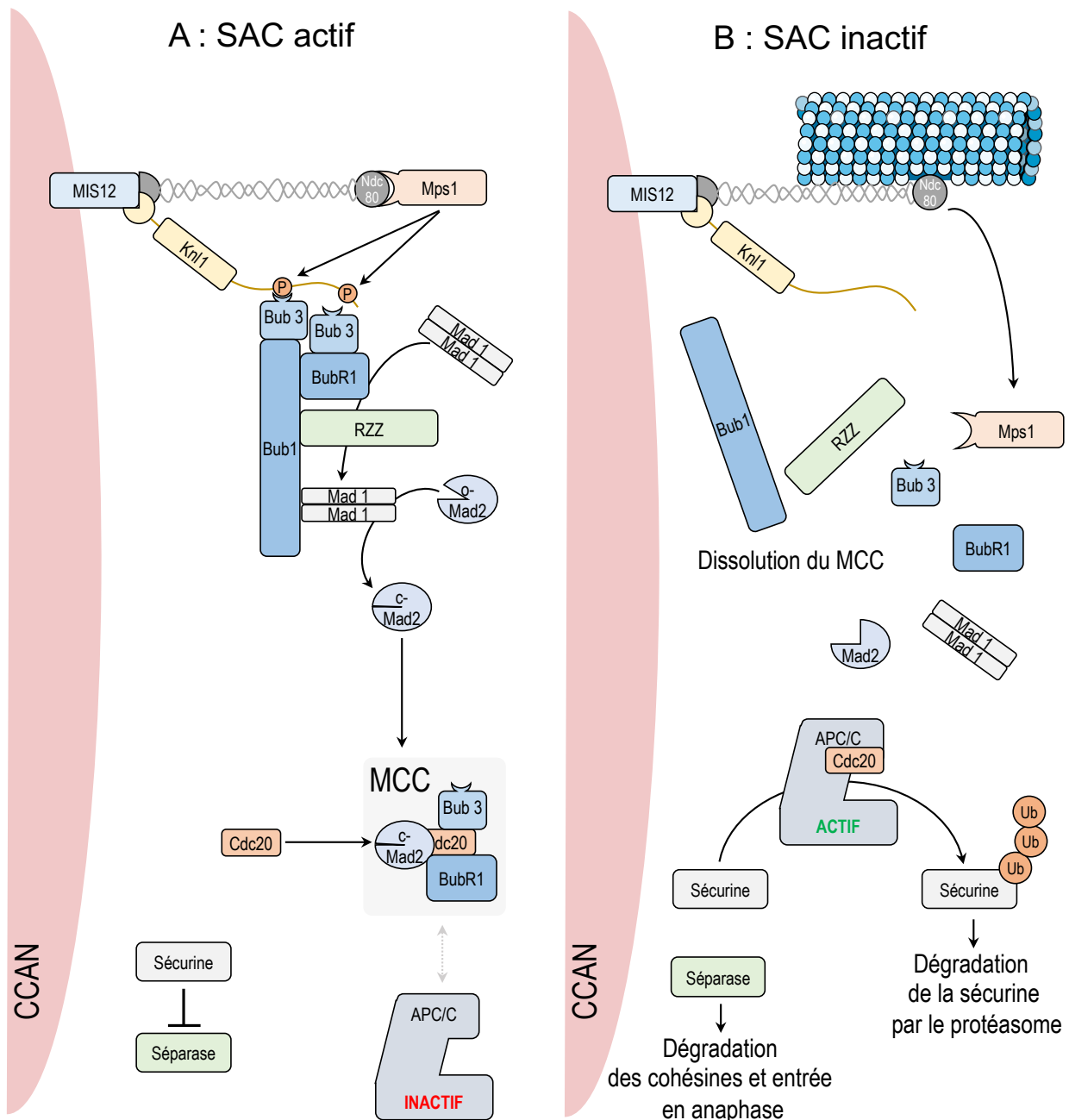


Figure 13 : Mise en place du SAC.

Afin d'éviter que l'entrée en anaphase ne se produise avant que tous les chromosomes ne soient attachés au fuseau, il existe un point de contrôle appelé le SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*). **(A)** Le SAC conditionne l'activation de l'APC/C qui ne pourra se produire que lorsque tous les chromosomes seront attachés aux microtubules du fuseau. La kinase du SAC, Mps1, fixée à la plaque externe du kinétochore par Ndc80, se trouve à proximité de Knl1 tant que l'attachement des chromosomes aux microtubules n'est pas effectué. Mps1 phosphoryle Knl1 au niveau de son domaine MELT. Ces phosphorylations permettent d'une part le recrutement du complexe Bub1/Bub3/BubR1 au kinétochore mais aussi du complexe RZZ. Ces complexes vont conjointement recruter les protéines Mad1 et Mad2 au kinétochore. Mad1 permet la conversion de la conformation ouverte inactive à la conformation fermée active (o-Mad2 à c-Mad2). C-Mad2 forme avec Bub3, BubR1 et la protéine Cdc20, le complexe MCC (*mitotic checkpoint complex*). MCC séquestre Cdc20, l'adaptateur de l'APC/C, qui est essentiel au fonctionnement de l'APC/C. **(B)** Cette situation est maintenue jusqu'à la fixation des microtubules à Ndc80, indiquant l'attachement du chromosome au fuseau. Ceci permet d'écarter Mps1 de Ndc80 et d'éviter la phosphorylation de Knl1. Le MCC est alors dissout, ce qui permet la libération de Cdc20 et l'activation de l'APC/C. Ce dernier peut alors via l'ubiquitinylation de la sécurine, induire la libération de la séparase et permettre, au final, l'entrée en anaphase. CCAN : *Constitutive Centromere Associated Network*.

capteur de l'attachement ou non des chromosomes au fuseau. Cependant, si ce point de contrôle vérifie s'il y a, ou non, attachement, il ne permet néanmoins pas de déterminer si l'orientation des attachements est correcte. Pour cela, un autre complexe intervient : le CPC composé de la Survivine qui fixe le complexe aux centromères, de la kinase Aurora-B/C constituant le cœur enzymatique, de la Boréoline et d'INCENP (*INner CEnter Protein*) qui régulent l'activité d'Aurora-B/C (Sasai *et al.*, 2016) mais joueraient aussi un rôle dans la localisation de CPC (Haase *et al.*, 2017). Le complexe CPC a un rôle non seulement dans la détection de l'attachement des kinétochores aux microtubules mais également dans la détection de l'orientation des attachements. Il existe en effet un gradient de phosphorylations protéiques à partir du centromère, généré par Aurora-B/C. Les protéines cibles d'Aurora-B/C, comme Mis12 et Ndc80 du complexe KMN situé dans la plaque externe du kinétochore, vont être plus ou moins proches d'Aurora B/C suivant la tension appliquée aux kinétochores par la fixation des microtubules (Welburn *et al.*, 2010). Ainsi, si l'attachement des microtubules est incorrect (amphithélique ou mérothélique en méiose I), la tension intra-kinétochorienne sera faible, rapprochant les protéines cibles (Mis12, Ndc80) d'Aurora-B/C, qui pourra alors les phosphoryler. Le CPC est donc capable de détecter la tension ou l'absence de tension au kinétochore qui reflète l'orientation des attachements des kinétochores aux microtubules. De plus, le CPC est capable d'apporter une réponse aux mauvais attachements : la phosphorylation de ses protéines cibles a pour effet de déstabiliser les microtubules et de les détacher du kinétochore. Dans la situation contraire, lorsque l'orientation de l'attachement des microtubules au kinétochore est correcte (monothélique), alors la tension sera maximum. Ceci se traduit alors par un éloignement des protéines cibles d'Aurora-B/C et leur déphosphorylation par PP2A-B56, la phosphatase qui s'oppose aux phosphorylations effectuées par Aurora-B/C. Ceci entraîne une stabilisation de l'attachement (McVey, Cosby and Nannas, 2021).

Pour résumer, lorsque l'ensemble des chromosomes est correctement attaché aux microtubules, événement qui signe la fin de la métaphase, le CPC n'a aucune cible à phosphoryler, le SAC ne se met pas en place et le complexe MCC est dissous. La libération de Cdc20 permet son association à l'APC/C, qui activé, permet la dégradation de la Sécurine et libère la Séparase. Celle-ci pourra cliver les cohésines des bras des chromatides-sœurs, et permettre ainsi une ségrégation des chromosomes homologues et l'entrée en anaphase I.

c) Anaphase I

En début d'anaphase I, la Séparase est donc libérée de l'inhibition exercée par la Sécurine et peut cliver ses cibles, les cohésines. Les cohésines sont retrouvées au niveau des bras des chromatides-sœurs, mais aussi au niveau des centromères. En anaphase I, seules les cohésines des bras sont clivées, permettant la résolution des chiasmas et la ségrégation des chromosomes homologues (**Fig. 10**). Au contraire, les cohésines centromériques doivent être absolument protégées pour que seuls les homologues soient ségrégés et non pas les chromatides-sœurs. Cette protection des cohésines centromériques est permise en méiose par la protéine SGO2 (Shugoshin 2) (El Yakoubi *et al.*, 2017) (**Fig. 10**). SGO2 recrute la phosphatase PP2A-B56 au niveau centromérique. Comme nous l'avons précédemment, PP2A-B56 déphosphoryle les cibles du CPC mais elle déphosphoryle aussi Rec8 (Kitajima *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Rattani *et al.*, 2013). Or, la phosphorylation de Rec8 par Aurora-B/C conduit à son clivage par la Séparase. Le recrutement de PP2A-B56 par SGO2 permet donc de maintenir Rec8 sous cette forme déphosphorylée au niveau centromérique. Ceci la rend invisible pour la Séparase, et maintient ainsi la cohésion entre les chromatides-sœurs (Llano *et al.*, 2008; Keating, Touati and Wassmann, 2020; Nikalayevich *et al.*, 2022). En revanche, le clivage des cohésines des bras chromosomiques provoque la résolution des chiasmas, les seuls liens qui maintenaient les chromosomes homologues attachés l'un à l'autre. Plusieurs protéines et complexes protéiques interviennent au niveau des doubles jonctions de Holliday qui constituent les chiasmas, comme la résolvasse Gen1 (Rass *et al.*, 2010; Matos and West, 2014), les endonucléases MUS81-EME1 (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001), SLX1-SLX4 (Fekairi *et al.*, 2009) ou encore Mlh1,3 et EXO1 (Rogacheva *et al.*, 2014) (**Fig. 10**). Ces protéines sont impliquées dans la résolution des crossing-over et par conséquent dans la séparation correcte des chromosomes homologues, chacun vers un pôle du fuseau. Je ne détaillerai pas les processus complexes de polymérisation/dépolymérisation des microtubules kinétochoriens et des microtubules polaires, et la contribution essentielle des moteurs moléculaires des familles des kinésines et dynéines, qui permettent la traction des chromosomes vers les pôles du fuseau (Barton and Goldstein, 1996; Kline-Smith and Walczak, 2004).

d) Téléphase

La téléphase est caractérisée par la formation de deux nouveaux noyaux qui viennent entourer les deux groupes de chromosomes séparés à l'issue de l'anaphase. Pour ce faire,

l'ensemble des constituants de la membrane nucléaire précédemment dissous ou à l'état de vésicules membranaires lors de la diacinese en prophase I, vont se réassembler. Leur dissolution dans le cytoplasme a été induite lors de la diacinese à la suite de leur phosphorylation. En effet, les lamines (constituant majoritaire du nucléosquelette) (Gerace and Blobel, 1980; Heald and McKeon, 1990), les protéines des pores nucléaires (Laurell *et al.*, 2011; Linder *et al.*, 2017), les protéines impliquées dans l'interaction entre la membrane nucléaire et les chromosomes, etc... ont subi des phosphorylations lors du passage de prophase en métaphase (Cundell *et al.*, 2016). Ceci a conduit à la dislocation des structures nucléaires dans lesquelles ces protéines intervenaient. En télophase, ces phosphorylations sont éliminées par de nombreuses phosphatases telles que PP2A-C ou B, PP1 ou encore PP4 (Cundell *et al.*, 2016) (Archambault *et al.*, 2022). Ceci va permettre la reformation de ces structures autour des chromosomes ségrégués et aboutir à la formation de deux nouveaux noyaux.

e) Cytocinèse

En parallèle aux événements décrits ci-dessus, la cytokinèse débute en fin d'anaphase. Ce processus, qui clôt la phase M, correspond à la division physique de la cellule. La cellule, encore dite mère, contient très provisoirement deux noyaux formés lors de la télophase. Cette cellule-mère va se scinder en deux parts égales (le plus souvent, mais pas toujours : cas de la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, ou cas des divisions méiotiques des ovocytes) ce qui génère deux nouvelles cellules.

(1) Déroulement

La cytokinèse débute parallèlement à la ségrégation des chromosomes lorsque le fuseau est toujours présent. Sur ce fuseau se fixe un complexe protéique nommé centralspindlin (HsCYK-4 and MKLP-1) (Mishima, Kaitna and Glotzer, 2002) qui va permettre le recrutement dans la région équatoriale au niveau de la membrane plasmique de ECT2 (appelé Pebble chez la drosophile), une protéine Rho-GEF (Basant and Glotzer, 2018). Cette dernière permet la conversion du Rho-GDP inactif en Rho-GTP actif. Une fois actif, Rho est à l'origine de ce qui est appelé l'anneau contractile, qui se forme tout le long de la face interne de la membrane de la cellule au niveau de son équateur. Ce cercle est formé d'actomyosine (F-actine et myosine II) et de septine, liés entre eux par une protéine appelée Aniline (Rezig *et al.*, 2023). La contraction de cet anneau par dépolymérisation progressive de ses filaments conduit à la formation du

sillon de clivage et à terme coupe la cellule à parts égales pour la mitose ou inégales pour la méiose, générant deux cellules-filles.

(2) Particularité de la cytokinèse de l'ovocyte

Comme l'avait observé Édouard Van Beneden chez l'ascaris, la division de l'ovocyte est asymétrique : elle produit un ovocyte de taille similaire à la cellule-mère tandis que l'autre cellule-fille, appelée globule polaire, est de très petite taille. Cette asymétrie est permise par une modification de la cytokinèse dans l'ovocyte qui permet de conserver au sein d'une même cellule, l'ensemble des réserves nécessaires au futur développement de l'embryon. Contrairement à la méiose mâle, le fuseau méiotique de l'ovocyte est localisé à un niveau cortical, près de la membrane plasmique, là où il s'est formé ou a migré à partir du centre de la cellule. Rappelons que l'ovocyte est en général une cellule géante, la plus grosse de l'organisme (150 μm chez l'être humain, 80 μm chez la souris, 500 μm chez la drosophile, 100 μm chez l'oursin, 1,2 mm chez le Xénope), et que le fuseau est long d'une dizaine de microns. C'est donc une minuscule structure en regard du volume de l'ovocyte. Dans cette localisation corticale atypique, le gradient de Ran-GTP entourant la chromatine (voir § Particularité de la prométaphase/métaphase chez les ovocytes) va induire des modifications du cytosquelette cortical. Très souvent, le fuseau initialement parallèle à la membrane plasmique effectue une rotation qui le positionne perpendiculairement à la membrane, suivant différentes modalités propres à chaque espèce (Huchon *et al.*, 1981; C, D and R, 1986; Gard, 1992; Fabritius, Ellefson and McNally, 2011). *In fine*, le fuseau s'ancre dans le cortex membranaire par l'un de ses pôles. La proximité entre le fuseau et le cortex membranaire permet l'émission de signaux qui modifient localement le cytosquelette, induisant un enrichissement local en F-actine. Comme pour la méiose mâle, un anneau d'actomyosine est recruté par les protéines de la famille Rho (RhoA et Cdc42 chez *Xenopus*, Rac chez la souris)(Sun and Schatten, 2006), elles-mêmes recrutées au niveau du fuseau. Ce dernier va se contracter autour du fuseau en son centre, contribuant ainsi à ce qu'une moitié des chromosomes soit ségréguée vers le pôle du fuseau ancré à la membrane, ce qui produit l'émission du globule polaire, la seconde moitié étant conservée à l'intérieur de l'ovocyte. Cette division asymétrique permet ainsi de réduire la ploïdie de l'ovocyte avec une perte minimale de son contenu cytoplasmique.

f) La méiose II

À la suite de cette première division méiotique, les futurs gamètes entrent de nouveau en phase-M sans répliquer leur génome. Ceci permet au terme de la division d'obtenir une (cas de la femelle) ou bien quatre (cas du mâle) cellules haploïdes contenant chacune un nombre de chromosomes réduit de moitié, chacun étant formé d'une seule chromatide. Le déroulement de la méiose II est très différent entre ovocytes et spermatocytes. Chez ces derniers, un noyau se reforme suite à la première division méiotique. La phase S ne se produit pas car la machinerie de réplication est absente dans les spermatocytes mâles. Puis, les cellules condensent à nouveau leur matériel génétique, constitué d'une copie de chaque chromosome, chacun composé de deux chromatides-sœurs. Durant la prométaphase/métaphase II, ces chromatides vont de nouveau être prises en charge par un fuseau méiotique mais cette fois-ci, de manière amphithélique (bi-orientées) de façon à ce que chaque chromatide-sœur soit ségrégée à un pôle du fuseau lors de l'anaphase, de façon comparable à ce qui se passe en mitose. En anaphase II, SGO2 ne protège plus les cohésines centromériques permettant leur clivage par la Séparase et la bonne ségrégation des chromatides (Chambon *et al.*, 2013; Keating, Touati and Wassmann, 2020). La seconde division méiotique mâle aboutit à nouveau à deux cellules-filles équivalentes. Les quatre spermatocytes issus des deux divisions méiotiques vont se différencier en spermatozoïdes.

Dans les ovocytes, la situation est très distincte. De manière surprenante, chez les femelles de nombreuses espèces, par exemple *Xenopus laevis* (amphibien) ou *Asteria pectinifera* (échinoderme), la machinerie répllicationnelle est en place dans l'ovocyte dès la transition prophase I/métaphase I (Lemaître, Bocquet and Méchali, 2002; Whitmire, Khan and Coué, 2002). Il est donc nécessaire de l'inhiber de façon à empêcher qu'une phase S s'initie entre les méioses I et II (Daldello *et al.*, 2015). Chez le Xénope, l'étoile de mer ou la souris, la phase S est évitée grâce à l'activité de la kinase Mos, qui induit l'activation de la voie des MAP kinases, ce qui a pour effet d'inhiber la réplication (Colledge *et al.*, 1994; Furuno *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1994; Tachibana *et al.*, 2000; Dupré, Haccard and Jessus, 2011). Suite à l'émission du premier globulaire, aucun noyau ne se reforme dans l'ovocyte, et le lot de chromosomes gardé au sein du cytoplasme ne se décondense pas. Il est enrobé dans un paquet de microtubules, et l'ensemble se réorganise rapidement en un fuseau de division assez similaire au fuseau de première division : d'une taille équivalente (10 μm), initialement parallèle à la membrane plasmique puis ancré dans le cortex membranaire suite à une rotation

(Huchon *et al.*, 1981; C, D and R, 1986; Gard, 1992; Bennabi, Terret and Verlhac, 2016). Mais l'attachement des microtubules aux kinétochores est bien sûr amphithélique, permettant une division équationnelle comme en mitose. Ce fuseau de métaphase est stable pendant plusieurs heures dans l'ovocyte des vertébrés, une autre caractéristique exceptionnelle, car chez ces espèces, c'est la fécondation qui déclenche l'anaphase II. Enfin suite à la télophase et la cytokinèse, un second globule polaire est émis, et l'ovocyte, devenu ovule ou cellule-œuf, donnera le zygote diploïde après fécondation.

4. Conclusion

Comme nous l'avons vu, la phase M est constituée de quatre grandes phases : la prophase, la prométaphase/métaphase, l'anaphase et la télophase. Ces différentes phases qui se produisent les unes après les autres toujours dans le même ordre, correspondent chacune à des changements spectaculaires dans la structure de la cellule. La complexité inouïe de ces événements mais aussi leur progression ordonnée soulève une question : quel(s) acteur(s) moléculaire(s) coordonne(nt) ces remaniements structuraux de grande ampleur dans la cellule ?

B. Qui orchestre la phase-M ?

Comme nous venons de le voir, la division cellulaire correspond à d'importants remaniements structuraux du noyau, de la chromatine et du cytosquelette pour permettre une séparation contrôlée du matériel génétique au sein de deux cellules-filles. La complexité et l'ordonnement de ces changements structuraux pose une question : Comment sont orchestrés ces événements ?

Cette question obtint une première partie de réponse à l'orée des années 1970 avec la mise en évidence de l'existence d'un facteur cytoplasmique capable d'induire la division méiotique d'ovocytes bloqués au stade diplotène de prophase I.

1. Découverte du MPF

L'une des premières mises en évidence de l'existence d'un tel facteur est fournie par Rao et Johnson en 1970 (Johnson and Rao, 1970). Par des expériences de fusion de cellules somatiques humaines, ils montrèrent que la fusion d'une cellule entrant en phase-M avec une

cellule en phase G1 ou S, conduit inévitablement cette seconde cellule à compacter son matériel génétique comme lors de l'entrée en prophase de mitose. Ces expériences soulignèrent l'existence d'un facteur diffusible responsable de l'induction de la phase de mitose. Ces travaux furent suivis par ceux de Masui et Markert en 1971. Ils montrèrent d'abord que l'ajout de progestérone dans le milieu externe conduit les ovocytes de l'amphibien *Rana pipiens* à maturer (Masui, 1967), c'est-à-dire sortir de l'arrêt en prophase I pour reprendre la division méiotique. Cette reprise de la méiose se caractérise morphologiquement par l'apparition d'une tâche dépigmentée au pôle animal de l'ovocyte. Cette tâche correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire, appelée GVBD (pour *Germinal Vesicle BreakDown*), qui signale l'entrée en division de l'ovocyte (les globules polaires sont trop petits pour être discernés sous loupe binoculaire, contrairement à l'apparition de la tâche dépigmentée). Cet effet de la progestérone ne fonctionne que lorsqu'elle est ajoutée au milieu externe et non pas injectée dans l'ovocyte, indiquant que cette hormone pourrait induire, par son interaction avec un récepteur membranaire, un effet cytoplasmique (Masui and Markert, 1971a). Ils réalisèrent surtout une autre expérience-clé (**Fig. 14**). Ils prélevèrent du cytoplasme d'un ovocyte stimulé par la progestérone et ayant réalisé GVBD, et l'injectèrent dans un ovocyte immature non stimulé par l'hormone. Cette injection induisit la maturation. De plus, l'expérience put être répétée par des prélèvements séquentiels : le cytoplasme d'un ovocyte ayant réalisé GVBD, suite à une injection de cytoplasme et sans avoir été en contact avec la progestérone, induit GVBD quand il est injecté dans un nouvel ovocyte. Le cytoplasme de ce receveur peut à nouveau induire GVBD, une fois injecté dans un nouvel ovocyte immature. L'ensemble de ces éléments conduisit Masui et Markert à deux conclusions : (i) l'existence d'un facteur cytoplasmique, produit en réponse à la stimulation par la progestérone, responsable de l'induction de la maturation qu'ils nommèrent MPF pour *Maturation Promoting Factor* (Masui and Markert, 1971a) ; (ii) la capacité du MPF à s'auto-amplifier à partir d'un précurseur inactif du cytoplasme. En effet, lors des expériences de transfert cytoplasmique en série, le cytoplasme injecté dans le dernier ovocyte receveur ne contient plus les molécules actives prélevées dans le cytoplasme du premier donneur, en raison des dilutions provoquées par les injections successives. Le MPF présent dans un cytoplasme injecté transforme donc un pré-MPF inactif du cytoplasme de l'ovocyte receveur en MPF actif.

Dans les années qui suivirent, de nombreuses études montrèrent que le MPF n'est restreint ni aux divisions méiotiques, ni à l'espèce *Rana pipiens*. Toutes les cellules en division possèdent

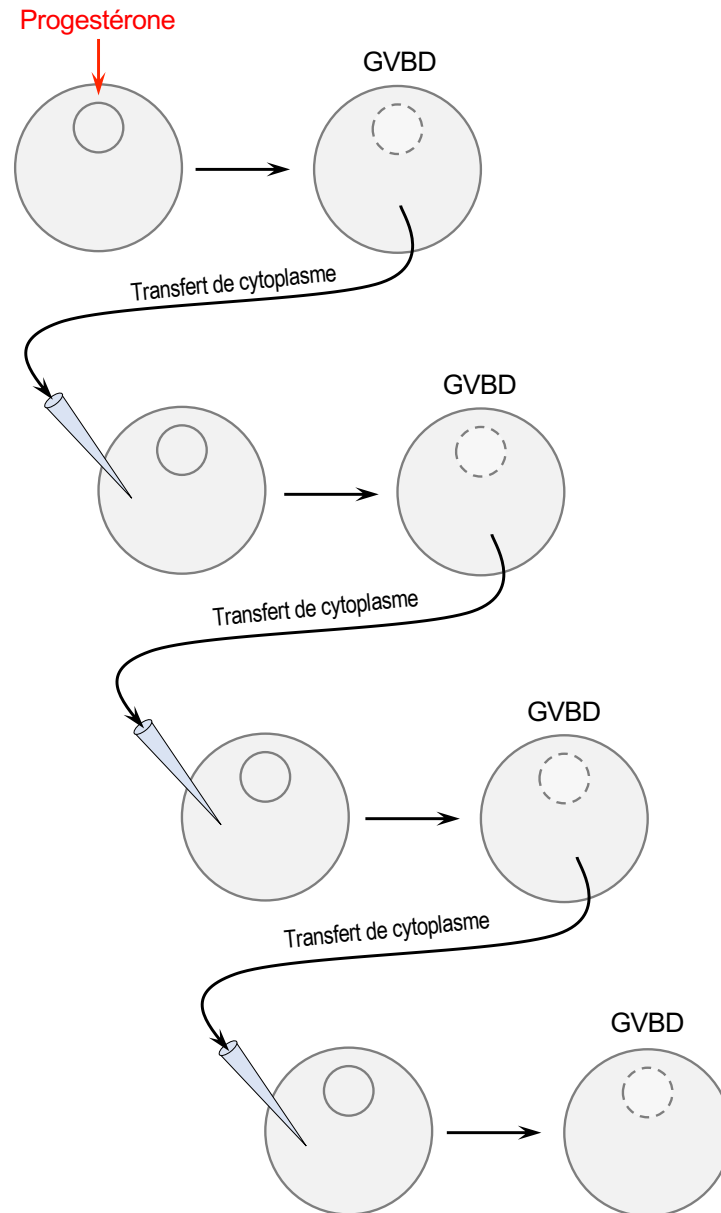


Figure 14 : Les expériences de Y. Masui mettant en évidence le MPF et sa capacité d'auto-amplification.

Des ovocytes de *Rana pipiens* sont stimulés par la progestérone afin d'induire leur maturation. Au stade GVBD, du cytoplasme de ces ovocytes, dits donneurs, est prélevé puis transféré dans des ovocytes receveurs immatures (en prophase I). Ce transfert de cytoplasme induit la maturation des ovocytes receveurs en l'absence de progestérone, mettant en évidence une activité inductrice de la maturation, cytoplasmique et transférable, le MPF. Ces ovocytes receveurs deviennent à leur tour donneurs : leur cytoplasme est prélevé et injecté dans de nouveaux ovocytes immatures. Ces derniers reprennent la méiose, comme précédemment. Ils peuvent à nouveau servir de donneurs. Ce transfert, répété en série à de multiples reprises, produit un résultat identique à chaque transfert : une reprise de la méiose pour les ovocytes receveurs de cytoplasme. En raison de la dilution du cytoplasme injecté à chaque cycle, les molécules actives du premier donneur ne sont plus présentes dans le cytoplasme injecté aux derniers receveurs. Ceci a permis de mettre en évidence la capacité du MPF à activer dans le receveur une forme inactive de lui-même, par un mécanisme d'auto-amplification (Masui et Markert, 1971).

dans leur cytoplasme une activité MPF capable d'induire la division, mitose ou méiose, dans la cellule injectée, somatique ou germinale (Masui, 2001).

L'universalité de ce facteur aboutit à un changement de nom, mais pas d'acronyme : MPF pour *M-phase Promoting Factor*. Le caractère universel de cette activité MPF précipitèrent les travaux visant à déterminer son identité moléculaire.

2. Identité du MPF

Cette chasse au MPF nécessita le travail de nombreuses équipes de recherche aux expertises complémentaires. En effet, non seulement des biochimistes mais aussi des généticiens se mirent à la recherche des constituants moléculaires du MPF. De nombreuses équipes, et parmi elles celle de Leland Hartwell et celle de Paul Nurse, entreprirent d'identifier, chez la levure, les gènes codant pour les protéines impliquées dans la constitution du MPF en tirant avantage de deux modèles majeurs : la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* (modèle de Lee Hartwell), et la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* (modèle de Paul Nurse). Chez *S. cerevisiae*, la taille du bourgeon permet de déterminer la phase du cycle. Plus la cellule progresse dans le cycle, plus la taille du bourgeon augmente : un petit bourgeon correspond à une cellule en phase G1 alors qu'un bourgeon de taille quasi-équivalente à la cellule sera en G2. Hartwell isola près de 400 mutants de cette levure sensibles à la température et étudia les effets de ces mutations sur le cycle cellulaire (Hartwell, Culotti and Reid, 1970; Culotti and Hartwell, 1971; Hartwell, 1971a, 1971b, 1991; Hartwell *et al.*, 1973, 1974). Au-dessus de 23°C, température dite permissive, les protéines mutées chez ces levures ne sont plus fonctionnelles, permettant l'étude de leur rôle dans le cycle. Hartwell et son équipe nommèrent ces mutants *cdc* (pour *cell-division cycle*). Parmi eux, ils trouvèrent le mutant CDC28 qui, à 36°C (température restrictive), est incapable de bourgeonner (Hartwell *et al.*, 1974) Chez *S. pombe*, modèle de Paul Nurse, la division se fait par fission et comme pour *S. cerevisiae*, il est possible de définir à quel stade du cycle se trouve la cellule : plus le prolongement de la cellule est important, plus la division est avancée dans le cycle. Paul Nurse utilisa cette propriété pour cribler de nombreux mutants appelés, eux aussi, CDC (Nurse and Thuriaux, 1980; Nasmyth and Nurse, 1981). Il découvrit un mutant crucial pour la division, qu'il nomma *cdc2*, et qui correspondait au gène *cdc28* de *S. cerevisiae* découvert par Lee Hartweel (Beach, Durkacz and Nurse, 1982) . Durant cette même période, des travaux de biochimie des protéines furent lancés par de nombreuses équipes, en parallèle des travaux de génétique de la levure, dans

l'objectif de purifier le MPF. Timothy Hunt, qui travaillait sur l'ovocyte d'oursin, mit en évidence, grâce à des pulses de méthionine- S^{35} , une protéine d'une quarantaine de kDa qui s'accumulait en amont de la division cellulaire avant d'être dégradée juste avant la cytodierèse (Evans *et al.*, 1983). Il nomma cette protéine Cycline, en référence à son accumulation cyclique. Tim Hunt fit rapidement le lien avec le MPF dont l'activité varie de manière similaire à l'accumulation de la Cycline (Wasserman and Smith, 1978). L'observation des cycles d'activité du MPF concomitants aux vagues de phosphorylations protéiques pendant le cycle cellulaire fut un autre élément majeur conduisant à l'hypothèse selon laquelle une activité kinase est associée au MPF. Ceci sera vérifié ensuite, notamment par Marcel Doré, André Picard et Jim Maller (Maller, Wu and Gerhart, 1977, p. 18; Dorée, Peaucellier and Picard, 1983; Picard *et al.*, 1985; Lohka, Kyes and Maller, 1987). Quelques années après (1988), le MPF fut purifié simultanément par deux équipes avec deux approches différentes. La première équipe, celle de Jim Maller, réussit à purifier le MPF grâce à un test d'activité simple, ne passant pas par des injections dans les ovocytes : l'induction de la rupture de noyaux *in vitro*, dans des extraits acellulaires issus d'ovocytes de Xénope. Par chromatographie analytique (FPLC), l'équipe de Maller montra que l'activité MPF était portée par un complexe de deux protéines de 34 kDa et 45 kDa (Gautier *et al.*, 1988; Lohka, Hayes and Maller, 1988). La seconde équipe, celle de John Newport en collaboration avec Paul Nurse, purifia le MPF grâce à son affinité pour une petite protéine identifiée chez la levure, p13^{suc1}. Ces deux équipes réussirent à purifier une protéine de 34 kDa, correspondant à Cdc2 (Dunphy *et al.*, 1988), associée à une protéine de 42 kDa, identifiée un peu après et correspondant à la Cycline. L'identité du MPF était résolue : un complexe hétéro-dimérique composé d'une molécule de Cdc2, protéine à activité kinase (Simanis and Nurse, 1986; Draetta *et al.*, 1988) et d'une molécule de Cycline, sa sous-unité régulatrice (Draetta and Beach, 1989; Labbé *et al.*, 1989; Meijer *et al.*, 1989).

3. Universalité du MPF chez les eucaryotes

Nous avons signalé que l'activité MPF présentait un caractère universel, contrôlant aussi bien la méiose que la mitose (Wasserman and Smith, 1978) (Gerhart *et al.*, 1985) chez la quasi-totalité des espèces eucaryotes, des unicellulaires comme la levure jusqu'aux plantes et aux vertébrés (Xénope, souris, humain) (Kishimoto, 2015). Il a ensuite été montré que cette universalité est également valable au niveau de son identité moléculaire. Suite aux deux premières purifications du MPF, différentes équipes de biochimistes réussirent à purifier le

MPF à partir de différentes sources (ovocytes d'étoile de mer, cellules humaines, etc.). Toutes convergèrent vers le même résultat, un complexe Cdc2-Cycline. Les généticiens utilisèrent des expériences de complémentation et des tests d'activité du MPF réalisés en système hétérologue (Kishimoto, 2015) : le mutant *cdc2* chez *S. pombe* est complémenté par le gène codant pour CDC2 humain (Lee and Nurse, 1987), ou par celui codant pour CDC2 de la luzerne (*Medicago sativa*) (Hirt *et al.*, 1991). De façon similaire, l'injection de Cyclines de maïs, d'oursin et humaine induisent la maturation méiotique chez l'ovocyte de Xénope (Rime, Haccard and Ozon, 1992; Renaudin *et al.*, 1994; Faivre *et al.*, 2001). Les expériences évoquées ici, ont permis de souligner la conservation extrêmement forte du MPF au sein de l'arbre du vivant.

C. Comment est régulé le MPF ?

1. Oscillation de l'activation du MPF

En 1978, les études de Wasserman et Smith mirent en évidence l'aspect cyclique de l'activité du MPF dans les embryons d'amphibien (Wasserman and Smith, 1978). Ils observèrent que lors des divisions mitotiques embryonnaires, l'activité du MPF augmente en fin de G2 avec un pic d'activité à la transition G2/M, et chute juste avant un nouveau cycle : l'activité du MPF est donc cyclique dans le contexte des divisions embryonnaires et ce, jusqu'au stade jeune blastula. De plus, l'ajout de colchicine (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) stoppe la division et la cellule arrêtée garde une activité élevée et stable du MPF. Ces résultats indiquent que le MPF est sensible à la bonne progression de la mitose et que son activité est régulée jusqu'à l'achèvement de la division. Cette relation entre division de la cellule et activité du MPF souligne, dès cette époque, l'existence d'une régulation de l'activité du MPF : il doit être activé en début de division, mais aussi inactivé en fin de division. Si un défaut quelconque empêche la progression de la division, il est maintenu sous son état actif. Cela fait écho au phénomène d'auto-amplification décrit par Wasserman et Masui en 1975 (Wasserman and Masui, 1975), montrant que le MPF lui-même est capable de catalyser la transformation d'un précurseur inactif, le pré-MPF, en MPF actif, même en l'absence de synthèse protéique. En 1983, Dorée *et al.* arrivent à la même conclusion, avec une observation supplémentaire : ils relient les oscillations de l'activité du MPF aux vagues de phosphorylation enregistrées dans l'ovocyte de l'étoile de mer (Dorée, Peaucellier and Picard, 1983). Tout ceci suggère que la régulation du

MPF implique des évènements de phosphorylations, mais aussi une régulation du niveau de la Cycline, et enfin des boucles de rétro-actions positives.

2. Deux niveaux de régulation du MPF

a) Régulation par synthèse et dégradation des Cyclines

En 1983, Tim Hunt et son équipe nommèrent pour la première fois les Cyclines en les identifiant comme des protéines dont la synthèse est constante mais dont la dégradation est périodique (Evans *et al.*, 1983). Ceci les amena à émettre l'hypothèse que les Cyclines font partie du MPF. Ce n'est que quelques années après, en 1985, que la dégradation des Cyclines fut prise en compte comme élément de régulation du MPF (Picard *et al.*, 1985). L'utilisation d'inhibiteurs de protéases tels que la leupeptine ou le SBTI (*SoyBean Trypsin Inhibitor*) montra qu'en l'absence d'activité protéase, plus aucune chute d'activité du MPF n'est observée entre les deux divisions méiotiques. La chute d'activité du MPF avant la seconde division méiotique était donc due à la dégradation des Cyclines, sous-unités régulatrices de la kinase Cdc2, par des protéases (Picard *et al.*, 1985). Un travail impressionnant mené par Murray et Kirschner en 1989 (Murray and Kirschner, 1989; Murray, Solomon and Kirschner, 1989) montre définitivement, sur la base d'extraits acellulaires récapitulant *in vitro* les évènements de la division cellulaire et d'injections dans des ovocytes de Xénope, que l'entrée en division dépend d'une synthèse de Cyclines conduisant à l'accumulation de la protéine et que la sortie de la division est due à sa dégradation brutale par protéolyse. En particulier, la délétion d'un motif de sa séquence, appelé D-box (*Destruction box*), empêche la dégradation de la Cycline et interdit la sortie de la division de la cellule.

La machinerie protéolytique responsable de cette dégradation est un régulateur direct du MPF. Son identité fut découverte par l'équipe de Marc Kirschner, située à Berkeley à l'époque. A la fin des années 1980, Kirschner et son équipe étaient à la recherche du mécanisme protéolytique responsable de la dégradation des Cyclines. Ils découvrirent que cette dégradation dépend d'une ubiquitine ligase (Glotzer, Murray and Kirschner, 1991), enzyme impliquée dans l'ubiquitination des protéines qui déclenche leur dégradation par le protéasome 26S, découvert quelques années auparavant (Ciechanover, Hod and Hershko, 1978; Rechsteiner, 1987; Ciechanover and Schwartz, 1989). Cette même ubiquitine ligase fut identifiée la même année, 1995, par plusieurs équipes : celle d'Avram Hershko et Joan Ruderman qui la nommèrent Cyclosome et l'équipe de Marc Kirschner qui la nomma APC pour

Anaphase Promoting complex (King *et al.*, 1995; Sudakin *et al.*, 1995; Simpson-Lavy *et al.*, 2010). Le complexe actuellement nommé APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) est donc l'E3 ubiquitine ligase qui déclenche la dégradation des Cyclines en début d'anaphase conduisant ainsi à l'inactivation du MPF nécessaire à la sortie de phase-M. Comme je l'ai évoqué précédemment, l'APC/C est activé suite à la détection d'un appariement correct des microtubules aux kinétochores. Le SAC est inactivé, entraînant la dissolution du MCC, ce qui libère Cdc20 qui s'associe à l'APC/C. L'APC/C-Cdc20 dégrade alors la Sécurine, libérant la Séparase. Celle-ci clive les cohésines, ce qui rompt les liens unissant les chromatides-sœurs (ou les chromosomes homologues en méiose I) et autorise ainsi le début de l'anaphase. L'APC/C-Cdc20 dégrade d'autres protéines, dont la Cycline évidemment, ce qui permet ultérieurement la sortie de phase-M. Tout ceci fournit les bases moléculaires rendant compte des observations de Wasserman et Smith en 1978 quant au maintien de l'activité du MPF à la suite du traitement par la colchicine (Wasserman and Smith, 1978).

b) Régulation par phosphorylation et déphosphorylation du MPF

Une activation du MPF dépendant uniquement de la synthèse des Cyclines n'expliquait pas son activation rapide au moment de l'entrée en phase-M. De plus, les Cyclines s'accumulent en amont de la division, pendant toute la phase G2, alors que le MPF n'est pas encore actif : la quantité de Cyclines ne semblait donc pas limitante (Felix *et al.*, 1989; Minshull, Blow and Hunt, 1989) et par conséquent, un second niveau de régulation du MPF était suspecté. Celui-ci fut mis en évidence notamment par les travaux de Paul Nurse et de son équipe. Tout débuta avec la découverte, chez *S. pombe*, d'un mutant nommé *wee1* se caractérisant par une division prématurée de la cellule avant que celle-ci n'ait atteint sa taille maximale (« *wee* » signifiant petit en argot écossais) (Nurse, 1975; Nurse and Thuriaux, 1977; Thuriaux, Nurse and Carter, 1978). En parallèle, un autre mutant appelé *cdc25* fut identifié chez *S. pombe* par Peter Fantes, avec un phénotype inverse de celui des mutants *wee1* : les levures mutantes *cdc25* présentaient un retard dans l'entrée en division couplé à un allongement anormal de la cellule (Fantes, 1979; Russell and Nurse, no date). De plus, la surexpression de la protéine Cdc25 induisait de manière dose-dépendante l'entrée en phase-M chez *S. pombe* (Russell and Nurse, no date). Dès cette époque, il fut envisagé une relation épistatique entre *Wee1* et *Cdc25* pour le contrôle de l'entrée en division.

À cette même époque, la phosphorylation de Cdc2 était largement étudiée aussi bien chez la levure que chez le Xénope. Plusieurs sites de phosphorylations avaient été identifiés, notamment Tyr15 et Thr161 chez la levure (Fleig and Gould, 1991) et Thr14, Tyr15 et Thr161 chez les vertébrés (Ducommun *et al.*, 1991; Norbury, Blow and Nurse, 1991; Fesquet *et al.*, 1993). En parallèle, il fut découvert que c'est la déphosphorylation du MPF qui était importante pour son activation (Jesus, Ducommun and Beach, 1990; Pondaven, Meijer and Beach, 1990). Ces observations conduisirent à la classification de ces phosphorylations en deux catégories : les phosphorylations inhibitrices et les phosphorylations activatrices de Cdc2. La localisation des sites Tyr14 et Thr15 dans Cdc2, proches du site de liaison à l'ATP, explique que leur phosphorylation inhibe l'activité kinase de la protéine. Au contraire, la phosphorylation de la Thr161, conservée de la levure aux vertébrés, favorise son activité kinase. De plus, cette phosphorylation semblerait requise pour la liaison de Cdc2 à la Cycline B (Ducommun *et al.*, 1991).

Cette découverte marqua le début d'une recherche intense pour identifier les kinases et phosphatases régulant ces phosphorylations essentielles pour la fonction de Cdc2. Très vite, il fut montré que la kinase régulant négativement Cdc2 par la phosphorylation de la Tyr15 était Wee1 (Lundgren *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1991; Parker and Piwnica-Worms, 1992) et la phosphatase responsable de sa déphosphorylation Cdc25 (Gould *et al.*, 1990; Gautier *et al.*, 1991; Strausfeld *et al.*, 1991; Izumi, Walker and Maller, 1992; Jesus and Beach, 1992; Lee *et al.*, 1992). Ainsi, ces analyses des phosphorylations de Cdc2 apportèrent les éléments de réponse quant aux fonctions moléculaires de Wee1 et Cdc25, identifiés dix ans plus tôt par des approches génétiques. Par la suite, une kinase équivalente à Wee1 fut identifiée par des approches biochimiques d'abord chez le Xénope, puis chez de nombreuses espèces métazoaires. Il s'agit de la kinase Myt1, capable de phosphoryler également Cdc2 sur les résidus Tyr15 et Thr14 (Mueller *et al.*, 1995). Elle ne présente aucune homologie avec Wee1. Elle présente la caractéristique d'être associée aux membranes du Golgi et du réticulum endoplasmique (Nakajima *et al.*, 2008; Villeneuve *et al.*, 2013), et pourrait phosphoryler préférentiellement la Thr14 alors que Wee1 aurait une affinité plus forte pour la Tyr15 (Booher, Holman and Fattaey, 1997; Liu *et al.*, 1997). Ce dernier point ne fait cependant pas l'unanimité et il faut rappeler que la phosphorylation de la Tyr15 seule suffit à inhiber Cdc2. La signification biologique de ces deux kinases qui apparaissent redondantes (certains types cellulaires expriment les deux, d'autres n'en expriment qu'une) n'est pas connue.

En ce qui concerne la phosphorylation activatrice de Cdc2, la kinase fut purifiée par deux équipes qui l'identifièrent simultanément chez l'ovocyte d'étoile de mer et à partir d'extraits acellulaires d'ovocytes de Xénope comme étant la kinase MO15 (Fesquet *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1993). MO15 fut ainsi la première CAK (*Cdk Activating Kinase*) à être découverte (Solomon, Harper and Shuttleworth, 1993). Il sera montré par la suite que MO15 est elle-même une Cdk (*Cyclin-Dependent protein Kinase*, voir ci-après) qui sera renommée Cdk7 (Fisher and Morgan, 1994). MO15 fonctionne avec deux sous-unités régulatrices, la Cycline H (Fisher and Morgan, 1994) et une protéine de type ring finger, MAT1 (Devault *et al.*, 1995). Néanmoins, une kinase distincte et cette fois monomérique, Civ1, est en charge de la phosphorylation activatrice de Cdc28 chez la levure *S. cerevisiae* (Thuret *et al.*, 1996). Dans l'ovocyte de Xénope, il a été aussi montré qu'une fraction de la population de molécules Cdc2 non-liées à la Cycline est phosphorylée sur Thr161, un fait surprenant compte-tenu de l'idée selon laquelle cette phosphorylation ne pourrait se mettre en place que lors de l'association de Cdc2 avec la Cycline (De Smedt *et al.*, 2002). L'ovocyte serait donc équipé d'une fraction de molécules de Cdc2 directement activable par liaison à la Cycline, à condition d'échapper à la kinase Myt1. La phosphorylation de la Thr161 du Cdc2 libre pourrait être catalysée par une kinase monomérique, et sa déphosphorylation est due à la phosphatase PP2C (De Smedt *et al.*, 2002).

c) Un nouveau panorama : de Cdc2-Cdc28 à Cdk1, de la Cycline aux Cyclines

Les levures avaient fourni Cdc2 et Cdc28, qui s'associent à une seule Cycline chez ces microorganismes. Les études chez différents modèles de métazoaires révélèrent l'existence de plusieurs kinases apparentées à Cdc2-Cdc28, associées à une Cycline et impliquées dans le contrôle du cycle cellulaires : les Cdk (pour *Cyclin Dependent protein Kinases*). Il fut parallèlement découvert l'existence de plusieurs Cyclines, chacune s'associant plus ou moins préférentiellement à un type de Cdk. Cdc2 fut renommé Cdk1 (*Cyclin Dependent protein Kinase 1*). La pléiade de ces différents acteurs amena à ré-examiner les mécanismes régulateurs de l'activité du MPF qui, chez les métazoaires, n'obéissent pas à des règles aussi simples que chez la levure (où pourtant ils sont déjà extrêmement sophistiqués !). La quantité de Cdk1 dans la cellule est stable. Au contraire, les Cyclines mitotiques s'accumulent dès la phase-S, bien en amont de la phase-M. Cdk1 s'associe à deux types de Cyclines : d'abord avec la Cycline A, traduite de la phase-S jusqu'en pro-métaphase, puis avec la Cycline B, traduite de la fin de phase-S jusqu'en anaphase (Minshull *et al.*, 1990; Solomon *et al.*, 1990; Lindqvist, Rodríguez-

Bravo and Medema, 2009). Lors de cette association, la phosphorylation de Cdk1 sur la thréonine Thr161 se met en place et est nécessaire à la stabilité du complexe. L'association Cycline-Cdk1 se fait via l'interaction de deux motifs respectifs : la Cycline box avec le motif PSTAIRE de Cdk1 (Jeffrey *et al.*, 1995). Cette interaction réarrange structurellement Cdk1, en modifiant son site catalytique et expose le résidu Thr161 qui est alors plus accessible à la phosphorylation (Jeffrey *et al.*, 1995). Lors de la formation du complexe, Cdk1 devient substrat de Wee1 et/ou Myt1 qui le phosphoryle sur Thr14 et Tyr15, rendant le MPF inactif. En parallèle de ces événements de phosphorylation, l'accumulation de Cycline B se poursuit et permettrait un échappement de certains complexes Cdk1-Cycline B vis-à-vis de Wee1-Myt1. Ces nouveaux complexes actifs vont alors d'une part inhiber Wee1-Myt1 et d'autre part activer Cdc25, ce qui entraîne l'activation du stock de complexes inactifs et l'entrée en phase-M. C'est la base moléculaire rendant compte du phénomène d'auto-amplification décrit par Masui, Markert et Wasserman dans les années 1970 (Masui and Markert, 1971b; Wasserman and Masui, 1975). C'est donc une double régulation à laquelle est sujet le MPF : par la quantité de Cycline et par la phosphorylation de Cdk1. Cette seconde régulation confère au MPF une capacité à s'activer brutalement à la manière d'un interrupteur (*switch like*) ne permettant aucun retour en arrière. Une fois activé, le MPF entraîne inévitablement l'accomplissement de la phase-M.

Comme nous venons de le voir, l'activité du MPF est finement régulée. Lorsque cette régulation est altérée, la division se produit soit de manière incontrôlée, soit de manière très limitée. Ces phénotypes sont similaires à ceux de certaines pathologies comme la prolifération incontrôlée observée en cas de cancer ou au contraire des divisions réduites, ou stoppées pouvant être la cause d'une infertilité quand cela affecte les gonies, ou de graves anomalies développementales. La découverte des régulateurs du MPF fit faire un bond de géant à la compréhension de ces (dé)régulations de l'entrée et de la sortie de phase-M. C'est pourquoi étudier cette régulation est essentielle pour mieux comprendre le fonctionnement normal et pathologique de la division cellulaire.

D. Modèle de régulation du MPF : la division méiotique de l'ovocyte de Xénope

C'est l'étude de l'entrée en division méiotique de l'ovocyte d'amphibien qui a permis la découverte de l'activité MPF dans les années 70, puis a grandement contribué à l'identification

de ses composants moléculaires dans les années 80, et enfin à celle de ses régulateurs à partir des années 90. Ces décennies de découvertes ont propulsé l'ovocyte de Xénope comme l'un des modèles puissants d'étude du MPF, et plus largement de la régulation de la transition G2-M du cycle cellulaire. Le paragraphe qui suit est consacré à la présentation de ce modèle physiologique.

1. L'arrêt en prophase de méiose I

Au cours du développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales migrent vers l'ovaire en cours de formation et deviennent alors des ovogonies. Ces ovogonies se multiplient au sein de l'ovaire par mitose puis, après certains nombres de cycles, certaines d'entre-elles entrent en méiose et sont dorénavant appelées « ovocytes ». À noter qu'il semble que, contrairement à la situation des Mammifères, l'ovaire adulte de Xénope contient un stock d'ovogonies en renouvellement, dont une partie s'engage périodiquement dans la méiose. Ces ovocytes vont alors accomplir les premières étapes de la prophase I, qui ont été décrites précédemment (Voronina and Wessel, 2003). Lorsque les ovocytes atteignent la fin du stade diplotène de prophase I, la progression méiotique s'arrête. Cet arrêt, qui a lieu plus précisément au stade diplotène (Levine, 2015) et qui est appelé communément arrêt en prophase I, est commun à toutes les espèces animales et peut durer de quelques semaines à plusieurs années suivant l'espèce : 3 ans chez *Xenopus laevis* et jusqu'à 50 ans chez l'humain. Lors de cet arrêt méiotique, les ovocytes entament une phase de croissance considérable en accumulant dans leur cytoplasme les réserves nutritives et informatives nécessaires au futur développement embryonnaire : ARN messager, protéines ainsi que des réserves énergétiques sous forme de vitellus dont l'accumulation porte le nom de vitellogénèse.

a) La croissance ovocytaire chez le Xénope

Chez le Xénope, la femelle possède deux ovaires volumineux qui contiennent chacun plusieurs milliers d'ovocytes et occupent la majeure partie de l'abdomen. Les ovocytes trouvés au sein de ces derniers sont de tailles et de composition variable, correspondant aux différentes étapes de croissance des ovocytes (Dumont, 1972). Les ovocytes en phase de croissance ont été classés en différents stades successifs définis par des critères morphologiques et biochimiques décrits par Dumont (1972), allant du stade I au stade VI (**Fig. 15**). La croissance débute au stade diplotène, après que les ovocytes aient déjà accompli la compaction de leur

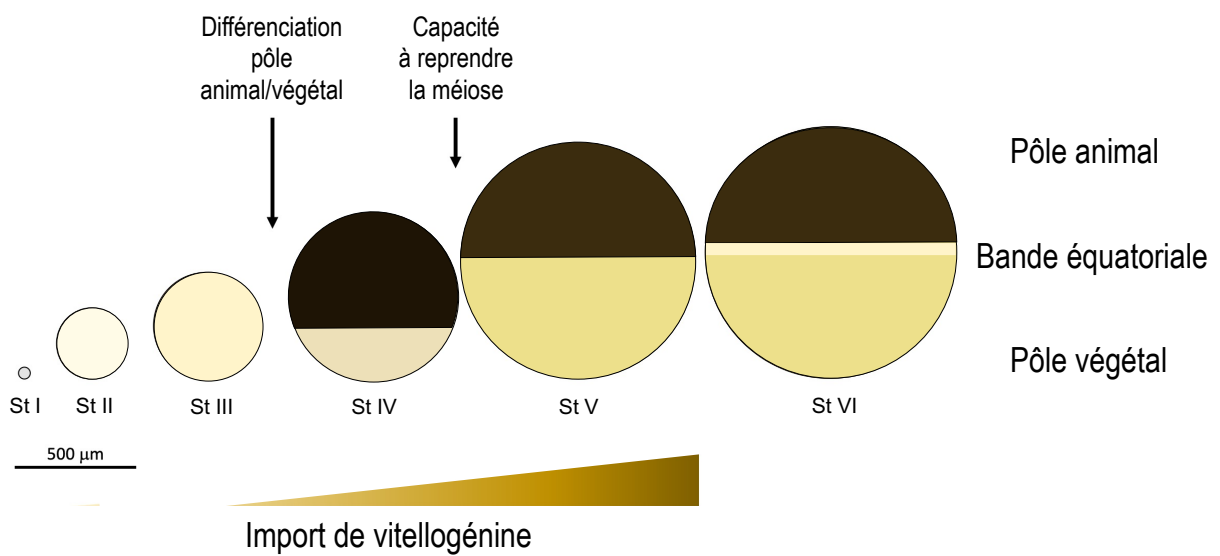


Figure 15: Croissance de l'ovocyte de Xénope lors de l'arrêt en prophase.

Représentation des différents stades (I à VI ; Dumont, 1972) de l'ovocyte de Xénope bloqué en prophase I. La pigmentation de l'ovocyte se dépose à partir du stade III. La capacité à reprendre la méiose en réponse à la progestérone n'apparaît qu'à partir du stade V. La période de vitellogenèse (accumulation du vitellus) est continue de stade III au stade VI. La bande équatoriale non pigmentée de l'ovocyte n'apparaît qu'au stade VI.

matériel génétique, l'appariement des chromosomes homologues et la formation des complexes synaptonémaux, correspondant aux phases leptotène, zygotène et pachytène. Néanmoins, une certaine croissance cellulaire a déjà lieu pendant ces phases puisque les ovogonies ont un diamètre variant entre 10 et 20 μm alors que celui des ovocytes arrivant en diplotène est de 50 μm . Ces ovocytes de stade I sont transparents. Les stades I à III sont le siège d'une intense activité transcriptionnelle qui se produit essentiellement au niveau de boucles de chromatine décondensée qui ont valu le nom de « chromosomes en écouvillon » aux chromosomes de l'ovocyte. Cette activité transcriptionnelle décline au stade IV et cesse aux stades V et VI. Elle produit toutes classes d'ARN (messagers, ribosomiques, transfert) et des protéines. À noter également la production d'organites qui se fait simultanément, comme par exemple la production de lamelles annelées, constituées de membranes externes de l'enveloppe nucléaire qui sont empilées dans le cytoplasme, celle de milliers de ribosomes ou celle de centaines de nucléoles issus en partie d'un système de réplication original. En parallèle, à partir du stade III, la protéine vitellogénine, fabriquée dans le foie et importée depuis la circulation, s'accumule en grande quantité dans le cytoplasme ovocytaire, constituant le vitellus. Dès le stade II, les ovocytes s'opacifient. D'abord entièrement blanc-jaune aux stades II-III, ils se pigmentent en noir par la mélanine stockée au sein de mélanosomes sous la membrane plasmique. Les ovocytes de stade IV acquièrent une polarisation sur la base de la répartition de la mélanine : ils présentent un pôle animal pigmenté et un pôle végétatif clair. Mais leur noyau (appelé vésicule germinative) est encore central. La polarisation selon les deux pôles animal et végétal se poursuit dans les stades V-VI : le noyau est déporté vers le pôle animal, alors que les plus grosses des plaquettes de vitellus sont accumulées côté végétal. La croissance des ovocytes décline à partir du stade V. Les ovocytes de stades VI présentent une taille d'environ 1,2 mm avec une bande non pigmentée au niveau équatorial (**Fig. 15**). Ils sont considérés comme étant au stade dictyotène, une période où la croissance est définitivement arrêtée et où la reprise de la méiose peut être déclenchée par un stimulus hormonal, la progestérone dans le cas du Xénope.

b) Mécanismes moléculaires de l'arrêt en prophase de l'ovocyte chez le Xénope

Bien que l'arrêt en prophase soit considéré comme universel, les mécanismes qui le sous-tendent varient de manière surprenante entre les espèces. Chez tous les vertébrés, cet arrêt se caractérise par un niveau élevé d'AMPC (AMP cyclique) dans l'ovocyte permettant à la

kinase dépendante de l'AMPc, appelée PKA, d'être active. A l'inverse, chez beaucoup d'invertébrés, c'est l'absence d'activité de PKA qui est responsable de l'arrêt en prophase (Jesus, Munro and Houlston, 2020). Chez d'autres invertébrés, comme certaines espèces d'annélides de mollusques et d'arthropodes, cet arrêt serait indépendant de la kinase PKA (Deguchi, Takeda and Stricker, 2011; Stetina and Orr-Weaver, 2011). La diversité des modalités assurant l'arrêt en prophase pourrait être le signe d'une convergence évolutive, qui soulignerait la forte pression de sélection s'exerçant à ce point précis du développement de l'ovocyte. En d'autres termes, ceci met en exergue le rôle crucial de l'arrêt en prophase pour assurer la préparation du gamète femelle haploïde au soutien du développement embryonnaire à venir.

(1) Découverte du rôle de PKA dans l'arrêt en prophase

La kinase PKA fut découverte en 1968 par Edwin Krebs (Walsh, Perkins and Krebs, 1968), récipiendaire du Prix Nobel pour ses découvertes sur la phosphorylation des protéines. PKA est l'une des kinases les plus étudiées à ce jour. PKA est composé d'un dimère de deux sous-unités catalytiques, PKA_C, qui en l'absence d'AMPc est lié à un dimère de deux sous-unités régulatrices, PKA_R. Ce complexe entre sous-unités catalytiques et régulatrices est inactif. L'AMPc lie la sous-unité régulatrice de PKA et entraîne la dissociation de PKA_R (Brostrom *et al.*, 1970, 1971). Les sous-unités catalytiques libérées sont alors actives (**Fig. 16**). À cette même époque, l'existence du MPF était mise en évidence par Masui et Markert (Masui and Markert, 1971a). Jim Maller, qui effectuait un post-doctorat chez Edwin Krebs, avait noté qu'un certain nombre de publications faisait état d'une relation entre activité PKA et division cellulaire. Il chercha alors à savoir si PKA jouait un rôle ou non dans l'arrêt en prophase. En 1977, Maller et Krebs montrent que l'injection de PKA_C bloque la reprise de la méiose. Au contraire, l'injection de PKA_R induit la sortie de l'arrêt en prophase (Maller and Krebs, 1977). Cet arrêt est physiologiquement levé grâce à un stimulus hormonal de nature très variable suivant l'espèce et qui, chez le Xénope, correspond à un stéroïde, la progestérone, sur lequel je reviendrai par la suite. La stimulation hormonale a pour effet chez le Xénope, comme chez tous les vertébrés, d'induire une chute du taux d'AMPc dans l'ovocyte. La chute du taux d'AMPc conduit à l'inactivation de PKA, induisant irrémédiablement l'activation du MPF et la reprise de la méiose. Maller montrait que, de façon cohérente avec la chute d'AMPc, une chute d'activité PKA était nécessaire (l'augmentation d'activité PKA par l'injection de PKA_C bloque la reprise de la méiose) et suffisante (l'inhibition d'activité PKA par l'injection de PKA_R provoque à elle-seule la reprise

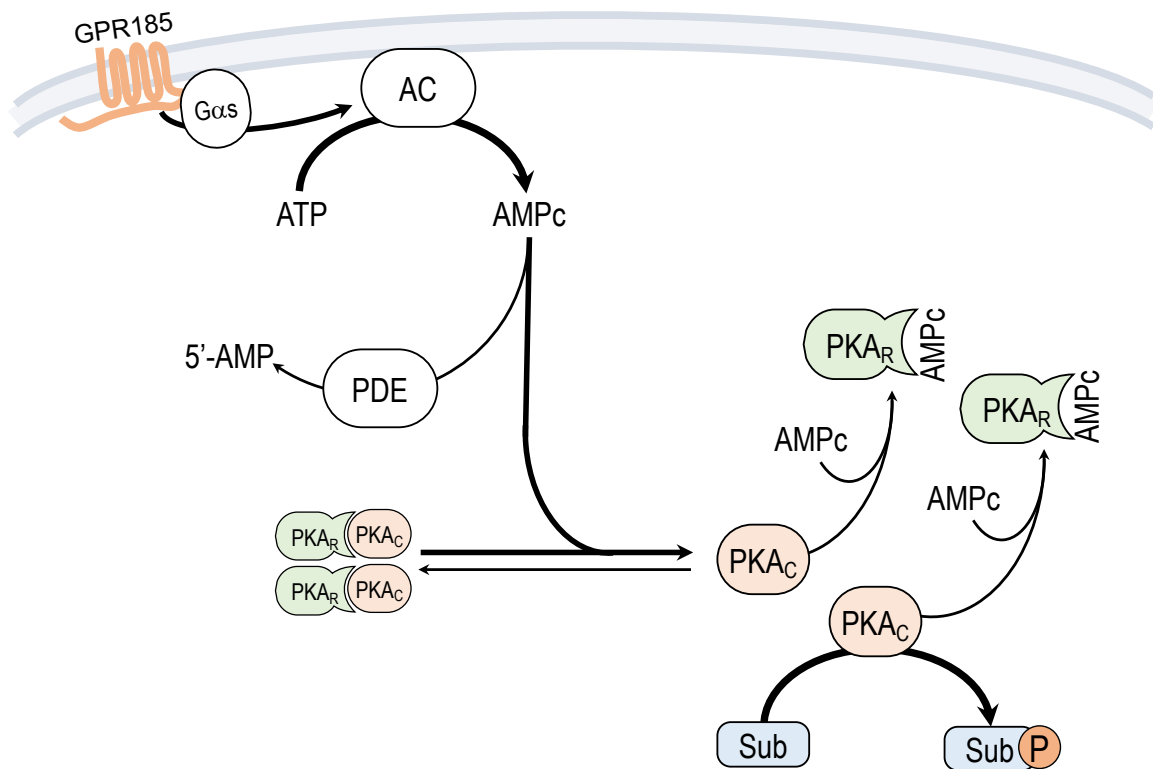


Figure 16 : Activation de PKA par la production constitutive d'AMPc dans l'ovocyte de Xénope durant l'arrêt en prophase I.

Dans les ovocytes en prophase, le GPR185 active de manière constitutive les adénylates cyclases (AC) qui produisent l'AMPc à partir de l'ATP. Les adénylates cyclases s'opposent aux phosphodiéstérases qui convertissent l'AMPc en 5'-AMP. L'AMPc produit permet l'activation de la sous-unité catalytique de PKA (PKA_C) en induisant sa dissociation de sa sous-unité régulatrice (PKA_R). PKA_C phosphoryle alors ses substrats (Sub) responsables de l'arrêt en prophase.

de la méiose) pour la levée du blocage en prophase (**Fig. 17**). Différentes études viendront étayer cette conclusion, par la manipulation soit des niveaux d'AMPc (Schorderet-Slatkine *et al.*, 1978; Maller, Butcher and Krebs, 1979; Mulner *et al.*, 1979, 1985; Mulner, Cartaud and Ozon, 1980; Schorderet-Slatkine, Schorderet and Baulieu, 1982; Mulner, Bellé and Ozon, 1983; Picard *et al.*, 1987), soit de l'activité PKA (Maller and Krebs, 1977; Huchon *et al.*, 1981).

(2) Les substrats de PKA

La kinase PKA étant au cœur du mécanisme qui permet de maintenir l'arrêt en prophase chez le Xénope et l'ensemble des vertébrés étudiés jusqu'à présent, la chasse aux substrats de PKA responsables de l'arrêt en prophase débuta il y a près de 40 ans, et différentes protéines furent identifiées (pour revue voir Meneau *et al.*, 2020). Cependant, le fait d'être substrat de PKA n'est pas l'unique critère auquel doit répondre un candidat pour être considéré comme responsable du blocage des ovocytes en prophase. En effet, la protéine candidate doit être déphosphorylée en réponse au stimulus hormonal, au moment de l'inactivation de PKA (10 à 30 minutes après la progestérone chez le Xénope), et donc bien en amont de l'activation du MPF (qui survient 3 à 5 heures après l'addition de progestérone). De plus, elle doit être capable, lorsque sa phosphorylation est maintenue, d'inhiber la reprise de la méiose. Parmi les protéines identifiées comme substrats de PKA dans l'ovocyte de Xénope, plusieurs pouvaient être considérés comme des candidats potentiels. C'est le cas de MpP32 (*Maturation phosphoProtein 32 kDa*), protéine cible de PKA dont la déphosphorylation se produit après la stimulation hormonale (Boyer *et al.*, 1986) mais dont l'identité moléculaire est inconnue. Il en est de même pour Cdc25, la phosphatase cruciale pour l'activation du MPF. La phosphorylation de Cdc25 par PKA sur la sérine 287 conduit au recrutement d'une protéine de la famille des 14-3-3, qui interagissent avec de nombreuses protéines possédant un motif spécifique de reconnaissance des 14-3-3, à condition qu'il soit sous forme phosphorylée (Obsilova and Obsil, 2022). La liaison de 14-3-3 à Cdc25 se fait via un motif de Cdc25 qui correspond à une séquence consensus de phosphorylation par PKA et qui est de fait phosphorylé par PKA dans l'ovocyte en prophase (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002). La liaison de 14-3-3 à Cdc25 est connue dans des lignées cellulaires pour maintenir la phosphatase dans le cytoplasme ce qui l'empêche de déphosphoryler Cdk1 au niveau du noyau. Néanmoins, nous avons déjà vu que l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope ne requérait pas la présence du noyau (Masui and Markert, 1971a; Schorderet-Slatkine and Drury, 1973). Cette translocation, si elle a lieu dans l'ovocyte,

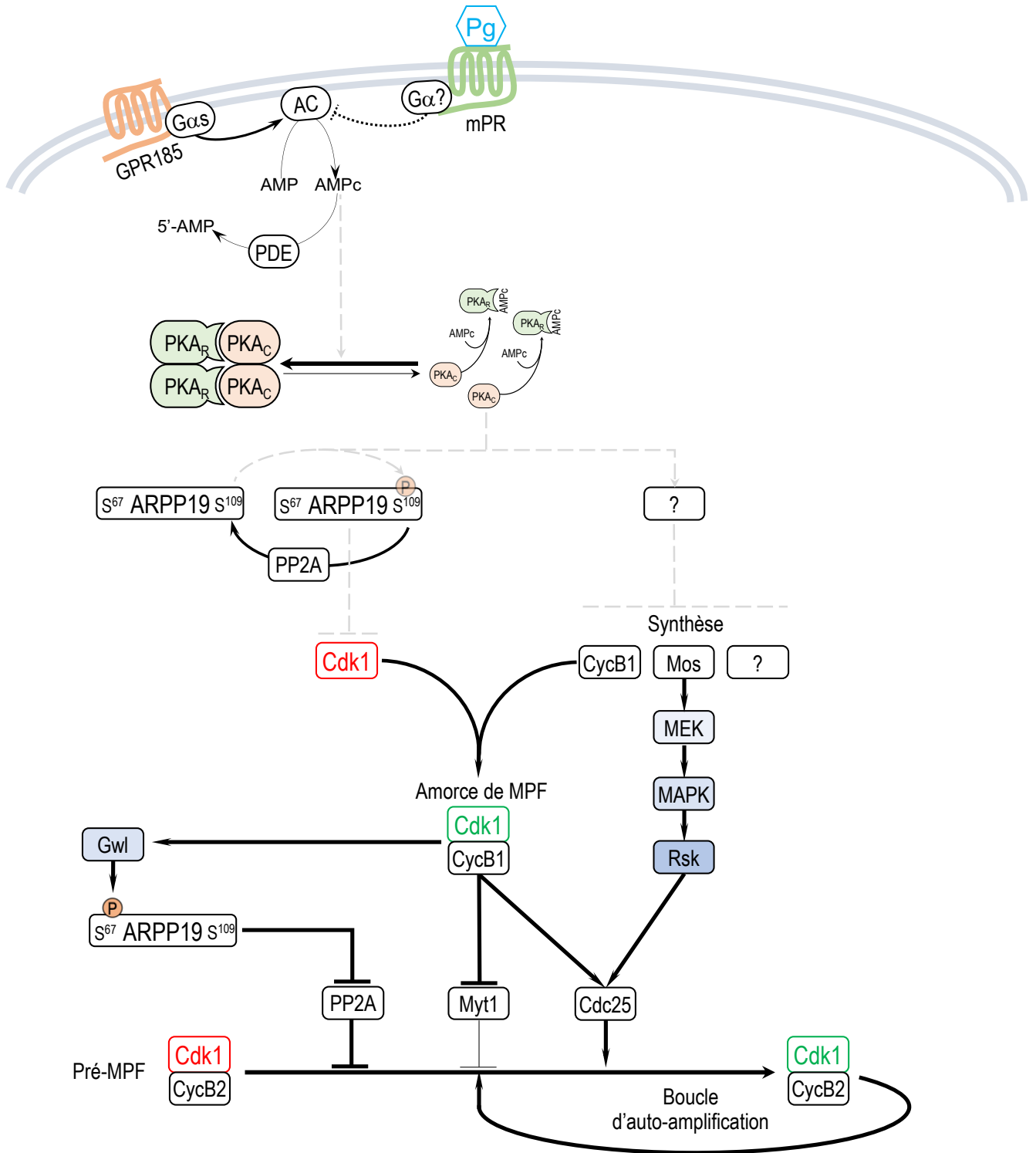


Figure 17 : De la stimulation de l'ovocyte de Xénope par la progestérone à l'activation du MPF.

Représentation de l'enchaînement des événements déclenchés par la progestérone et qui conduisent à l'activation du pré-MPF et au lancement de la boucle d'auto-amplification.

n'explique donc pas les propriétés inhibitrices de Cdc25 sous forme phosphorylée par PKA vis-à-vis du MPF. En outre, la déphosphorylation de MpP32 et Cdc25 se produit tardivement durant la maturation : non pas au moment de la chute d'activité de PKA, qui survient dans les 30 min suivant l'addition de progestérone, mais plusieurs heures après, au moment de l'activation du MPF. Dans le cas de Cdc25, cette déphosphorylation est même empêchée quand l'activation du MPF est inhibée par la roscovitine, suggérant qu'elle est sous le contrôle du MPF (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002). Si elle devait participer à l'activation du MPF, ce serait donc plutôt au sein de la boucle d'auto-amplification et non pas dans l'initiation de l'activation. Ni MpP32 ni Cdc25 ne constituent donc de bons candidats. Deux autres protéines répondent à l'ensemble de ces critères : RINGO/Speedy (dont le rôle sera discuté par la suite (Gutierrez *et al.*, 2006)) et MpP20 (*Maturation phosphoProtein 20 Kda* (Boyer *et al.*, 1986)) qui sera plus tard identifié comme étant la petite protéine de 19 kDa, ARPP19, sur laquelle nous reviendrons en détails ultérieurement.

Comme nous allons le voir, une phase de traduction protéique est lancée par la progestérone et indispensable à l'activation du MPF (Wasserman and Masui, 1975). Elle est sous le contrôle de PKA : l'injection de PKI, qui induit la maturation, est bloquée par des inhibiteurs de la synthèse protéique (Huchon *et al.*, 1981). L'une des voies expliquant comment PKA bloque la reprise de la méiose est donc celle d'une inhibition de la synthèse de protéines cruciales pour l'activation du MPF. L'un des substrats attendus de PKA serait donc un régulateur de la traduction, bien que le lien entre substrats de PKA et contrôle de la synthèse protéique puisse être indirect. Une autre possibilité est que PKA régule la dégradation des protéines plutôt que leur synthèse, une voie pouvant aussi conduire à l'accumulation de protéines. Cependant, aucun des substrats de PKA connus ne révèle une implication dans la traduction. Les substrats de PKA qui constitueraient le pont entre PKA et traduction restent à découvrir.

(3) Contrôle traductionnel de l'arrêt en prophase

Au contraire de la mitose, la reprise de la méiose ne nécessite pas de transcription du génome. Dès 1971 et la découverte du MPF, Masui démontra que le transfert du cytoplasme d'un ovocyte énucléé (Masui and Markert, 1971a; Schorderet-Slatkine and Drury, 1973), préalablement stimulé par la progestérone, est toujours capable d'induire la maturation d'un ovocyte arrêté en prophase : ceci a permis de démontrer que le noyau n'étant pas nécessaire à l'activation du MPF, la transcription ne l'est pas davantage. Ceci fut confirmé par les

expérience de Wasserman en 1974, qui montra que la reprise de la méiose a même lieu en présence d'inhibiteurs de la transcription tels que le bromure d'éthidium ou l'alpha-amanitine, un inhibiteur de la RNA polymérase (Wasserman and Masui, 1974). Ceci est à mettre en relation avec le statut transcriptionnel, en l'occurrence silencieux, de l'ovocyte en fin de croissance. Comme nous l'avons vu, dès le début du stade diplotène, les ovocytes en tout début de croissance subissent une vague de transcription importante. De nombreuses études ont mis en évidence l'accumulation de nombreux ARN messagers, ribosomiaux et de transfert, dès les stades I et II chez le Xénope (Hill and Macgregor, 1980). Cette transcription est permise par une décompaction partielle des chromosomes. Les boucles décondensées formées par les chromatides, le long de l'axe des chromosomes, vont être le lieu d'une intense activité transcriptionnelle qui décline au stade IV et cesse à partir du stade V. Les ovocytes arrêtent alors toute transcription. Comme nous l'avons évoqué, les messagers stockés, dits maternels, endossent une mission cruciale car ils seront la seule source de nouvelles protéines au sein de l'ovocyte, puis de l'œuf et de l'embryon jusqu'à la reprise de la transcription (« *mid-blastula transition* », survenant au 13^{ème} cycle de division chez le Xénope). Une autre conséquence de l'arrêt de la transcription concerne la maturation méiotique, qui précède la fécondation : la traduction des messagers présents dans l'ovocyte, devient le seul et unique moyen pour produire les protéines nécessaires à la maturation qui ne seraient pas déjà présentes. La traduction est donc, au contraire de la transcription, essentielle à la reprise de la méiose chez de nombreuses espèces, en particulier les vertébrés, à l'exception notable des petits rongeurs. Ceci a été expérimentalement confirmé chez le Xénope : l'utilisation d'émétine ou de cycloheximide (inhibiteurs de la traduction) bloque l'activation du MPF et la reprise de la méiose chez l'ovocyte de Xénope (Wasserman and Masui, 1975; Maller and Krebs, 1980; Picard *et al.*, 1985).

Il fut alors proposé que PKA soit responsable de l'inhibition de la traduction de certaines protéines-clés nécessaires à la reprise de la méiose de l'ovocyte (Maller and Krebs, 1980). La stimulation hormonale induit la synthèse de nombreuses protéines dont quelques-unes ont été montrées comme nécessaires à l'activation du MPF (ceci sera abordé par la suite). Comme nous l'avons vu, si l'AMPc est maintenu à un taux élevé dans l'ovocyte par l'utilisation d'inhibiteurs des phosphodiésterases (enzymes convertissant l'AMPc en 5'-AMP), ou si l'activité de PKA est maintenue élevée par surexpression de PKA_C, la stimulation hormonale ne permet plus d'induire la méiose (Maller and Krebs, 1977; Bravo *et al.*, 1978). Au contraire, l'inhibition de

PKA par son inhibiteur PKI ou par PKA_R induit la reprise de la méiose des ovocytes, même en l'absence de stimulation hormonale (Maller and Krebs, 1977; Huchon *et al.*, 1981). De manière importante, cette induction de la maturation par PKI ou par PKA_R est abolie lorsque les ovocytes ont été pré-traités avec un inhibiteur de la synthèse protéique, comme la cycloheximide (Huchon *et al.*, 1981). Ces résultats indiquent que la forte activité de PKA dans les ovocytes en prophase I serait à l'origine de l'inhibition de la synthèse de protéines cruciales pour l'activation du MPF.

(a) Les Cyclines B

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la transition G2-M du cycle cellulaire, la Cycline B est synthétisée en amont de l'activation du MPF, puis sa dégradation est la cause de l'inactivation du MPF et de la sortie de phase-M. Chez le Xénope, il existe 5 gènes codant pour des Cyclines B : Cyclines B1 à B5 (Hochegger *et al.*, 2001). Une très forte homologie est observée entre les séquences des Cyclines B1 et B4 d'une part, et B2 et B5 d'autre part. Il s'agit probablement d'une duplication de gènes, survenue avant la pseudo-tétraploïdisation de *Xenopus laevis* puisque ces 4 Cyclines sont aussi présentes chez *Xenopus tropicalis* (qui n'a pas subi de duplication génomique) (Hochegger *et al.*, 2001). Outre la proximité de leurs séquences, les Cyclines de ces deux groupes présentent des profils d'expression similaires les rendant quasi-indissociables. En particulier, elles ne sont exprimées qu'à partir des ARNm maternels pendant l'embryogenèse. Les Cyclines B4 et B5 ne sont plus retrouvées chez la larve ou l'adulte (Hochegger *et al.*, 2001). C'est pourquoi, pour la suite de ce texte, je considérerai B1-B4 et B2-B5 comme une seule et même protéine : B1 et B2. Les données sur la Cycline B3 sont relativement parcellaires. La séquence de cette Cycline est beaucoup plus divergente de celles des autres Cyclines B, et est en fait plus proche d'une Cycline A. Hochegger *et al.* (2001) qui l'ont clonée en premier, ont été incapables de la détecter, ni dans l'ovocyte, ni dans l'embryon, malgré l'utilisation d'un anticorps sensible et spécifique, et ont conclu que son implication dans la reprise de la méiose était improbable. Mais une autre équipe a récemment détecté son expression et un rôle important dans l'arrêt en métaphase II de l'ovocyte de Xénope (Bouftas *et al.*, 2022) : elle serait exprimée dans l'ovocyte en prophase, formerait des complexes actifs avec Cdk1 et maintiendrait un niveau faible de la protéine Emi2, responsable de l'arrêt en métaphase II. Suite à la dégradation de la Cycline B3 après l'anaphase I, le niveau de Emi2 s'élèverait de façon à arrêter l'ovocyte en métaphase II (Bouftas *et al.*, 2022). Elle serait

également requise pour l'anaphase I dans l'ovocyte de souris (Karasu *et al.*, 2019). Mais aucune étude ne souligne de rôle de la Cycline B3 dans la reprise de la méiose. Dans l'ovocyte de Xénope, la Cycline B2 est présente, associée à Cdk1 sous forme de pré-MPF (**Fig. 17**). Sur le plan de son turn-over, une faible production de Cycline B2 est observable durant l'arrêt en prophase (Rime *et al.*, 1994). Cette Cycline B2 s'associe au fur et mesure de sa production au Cdk1 libre présent dans l'ovocyte. Une partie du Cdk1 libre est déjà phosphorylée sur la Thr161 par Cdk7 (environ 20%)(De Smedt *et al.*, 2002). L'activation de ce dimère Cdk1-Cycline B2 néoformé est directement réprimée par la phosphorylation de Cdk1 sur la Tyr14 et la Thr15 (Rime *et al.*, 1991). Cette double phosphorylation n'est pas assurée dans l'ovocyte par la kinase Wee1, comme nous l'avons vu précédemment. En effet, Wee1 n'est exprimée dans l'ovocyte de Xénope qu'en fin de méiose I puis en méiose II, c'est-à-dire bien après l'activation du MPF (Murakami and Vande Woude, 1998; Nakajo *et al.*, 2000). Une autre kinase prend en charge les phosphorylations inhibitrices de Cdk1 dans l'ovocyte, la kinase Myt1, qui est associée à des compartiments membranaires de l'ovocyte (Mueller *et al.*, 1995). Cette kinase phosphoryle la Thr14 et la Tyr15 de Cdk1 et s'oppose donc à Cdc25, comme nous l'avons déjà vu. Contrairement à la Cycline B2, l'expression de la Cycline B1 est réprimée durant l'arrêt en prophase et la protéine est indétectable ou exprimée à un faible niveau dans l'ovocyte en fin de croissance. Sa synthèse ne reprendra que lors de la sortie de l'arrêt en prophase (**Fig. 17**). Ainsi durant cet arrêt, Cdk1 est retrouvé sous plusieurs formes inactives : (1) libre et non phosphorylé sur la Thr161, (2) libre et phosphorylé sur la Thr161 (De Smedt *et al.*, 2002) et (3) associé à la Cycline B2 et phosphorylé par Myt1 (Hochegger *et al.*, 2001). Cette dernière forme est aussi appelée pré-MPF qui jouera un rôle important par la suite durant la reprise de la méiose en tant que stock de MPF mobilisable rapidement (Dupré and Jessus, 2017). Ajoutons aussi que sous sa forme liée à la Cycline B2, on détecte Cdk1 dans différentes fractions après séparation par chromatographie par gel filtration, une fraction correspondant au poids moléculaire attendu du dimère, et une fraction incluse dans des complexes de très haut poids moléculaire (De Smedt *et al.*, 2002). D'autres partenaires protéiques restant à identifier, doivent donc réguler le complexe Cdk1-Cycline B2.

(b) La kinase Mos

L'expression d'une seconde protéine est importante pour l'activation du MPF, la kinase Mos (Sagata *et al.*, 1988). Cette kinase fut initialement identifiée comme étant la protéine virale

responsable de la transformation cellulaire induite par le virus du sarcome murin de Moloney, responsable de sarcomes chez la souris (Freeman *et al.*, 1989). Son expression dans les cellules est suffisante pour induire une dérégulation de l'activité du cycle cellulaire et leur transformation en cellules néoplasiques qui prolifèrent de manière incontrôlée (Sagata, 1997). Il fut par la suite mis en évidence l'existence d'une forme cellulaire de Mos (c-Mos par opposition à v-Mos provenant du virus), retrouvée chez de très nombreuses espèces (Freeman *et al.*, 1989). L'expression de cette protéine capable d'induire une division incontrôlée, autrement dit d'un proto-oncogène, posa question. Cependant, il fut très vite montré que son expression est extrêmement restreinte, principalement dans les ovocytes ainsi que dans les spermatozoïdes chez certains invertébrés (Propst *et al.*, 1987; Amiel *et al.*, 2009; Dupré, Haccard and Jessus, 2010). Ce patron d'expression limité et spécifique suggérait que Mos était impliqué dans « la vie » de l'ovocyte, c'est-à-dire la méiose femelle (Propst *et al.*, 1987). L'expression de Mos est aussi contrainte temporellement dans l'ovocyte. Chez le Xénope comme chez d'autres espèces (mammifères, *Clytia hemispherica*), Mos est exprimé dans l'ovocyte seulement en réponse à la stimulation hormonale et ce, jusqu'à la fécondation de l'ovocyte (**Fig. 17**). Il est curieux d'observer la sélection chez les animaux d'un gène qui ne s'exprimera que dans un type cellulaire spécifique, et seulement pour à peine quelques heures ! Cette expression très contrôlée de Mos se superpose de manière surprenante à l'activité du MPF dans l'ovocyte, laissant penser à un lien entre les deux (Sagata, 1997). L'injection de la protéine Mos ou de son messenger, induit la méiose en l'absence de stimulation hormonale (Haccard and Jessus, 2006b). Au contraire, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de Mos conduit à une incapacité des ovocytes à reprendre la méiose à la suite de la stimulation hormonale (Sagata *et al.*, 1988; Haccard and Jessus, 2006b). Ce résultat s'est trouvé en opposition avec le fait que l'injection de morpholinos antisens dirigés contre Mos, ou l'utilisation d'inhibiteurs de l'effecteur de Mos, la MAP kinase, ralentit mais ne bloque pas l'activation du MPF (Fisher *et al.*, 1999; Dupré *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats a néanmoins permis de fonder des hypothèses sur un rôle de Mos dans l'activation du MPF. Ce rôle sera discuté dans la suite de ce texte.

2. Reprise de la méiose de l'ovocyte de Xénope

Comme nous l'avons déjà abordé, le MPF est sous forme de pré-MPF inactif dans l'ovocyte arrêté en prophase. Son activation est le résultat d'une voie de signalisation lancée

par un stimulus hormonal. Ce dernier conduit dans un premier temps, moins d'une demi-heure, à une chute du taux d'AMPc et par conséquent de l'activité de PKA. Dans un second temps, la synthèse de nouvelles protéines participe à l'activation du pré-MPF qui a lieu 3 à 5 heures après la stimulation hormonale. Cette stimulation hormonale est la toute première étape de la reprise de la méiose.

a) Mécanismes moléculaires de la stimulation

Contrairement à la situation des mammifères, les ovocytes des amphibiens sont entourés d'une seule couche de cellules folliculaires, elle-même surmontée d'une thèque. Les cellules folliculaires entourant l'ovocyte sont en contact direct avec ce dernier par des jonctions de type Gap. Ces cellules folliculaires jouent un rôle essentiel dans la reprise de la méiose : en réponse à la LH (*luteizing hormone*), l'hormone de l'ovulation, ces cellules libèrent une hormone stéroïde qui agit directement au niveau de l'ovocyte. Il s'agit donc d'une stimulation paracrine (porte-à-porte cellulaire) et non hormonale, puisque l'hormone n'est pas véhiculée jusqu'à sa cellule-cible par voie sanguine. Dans le cas du Xénope, la maturation peut être induite *in vitro* par des stéroïdes variés ou des molécules dérivées du cholestérol (Haccard and Jessus, 2006a). Le premier stéroïde reporté fut la progestérone dont l'ajout dans le milieu conduit les ovocytes à reprendre la méiose (Schorderet-Slatkine and Drury, 1973). Un ensemble de stéroïdes fut testé dont la testostérone ou la digitoxigénine issue des plantes. De multiples stéroïdes sont capables d'induire la reprise de la méiose *in vitro* (à l'exception notable des estrogènes) (Haccard and Jessus, 2006a). De façon plus surprenante, l'insuline (hormone non-stéroïdienne) et l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) induisent aussi la reprise de la méiose (El-Etr, Schorderet-Slatkine and Baulieu, 1979; Janicot, Flores-Riveros and Lane, 1991). La nature variée des hormones pouvant activer la reprise de la méiose constituait un frein important dans la compréhension du mécanisme d'activation par l'hormone et dans la connaissance de la molécule physiologique véritablement responsable de la reprise de la méiose. En 2012, la situation se clarifia un peu avec la première analyse par spectrométrie de masse des stéroïdes retrouvés dans les cellules folliculaires et dans l'ovocyte (Haccard *et al.*, 2012). Cette étude montra que la production de progestérone augmente spectaculairement dans les cellules folliculaires à la suite de leur stimulation par la LH. Cette forte production conduit à une augmentation locale de la concentration de progestérone de l'ordre du micromolaire, correspondant aux concentrations requises pour l'induction de la méiose *in vitro* (Haccard *et al.*, 2012). De façon surprenante, la testostérone est également présente à des concentrations

micromolaires dans les follicules, mais son niveau n'est pas régulé par la LH. Il existe donc un mécanisme inhibiteur de nature inconnue qui empêche la testostérone d'induire la maturation dans l'ovaire. Cette étude suggère fortement, comme cela avait été proposé dans les années 1970, que ce soit bien la progestérone qui soit l'hormone responsable de la reprise de la méiose en condition physiologique. Il est à noter que l'ovaire de Xénope est riche en IGF-1 et que son récepteur est exprimé dans l'ovocyte (Chesnel *et al.*, 1997; Baert *et al.*, 2003). On ne peut donc pas exclure le fait que l'IGF-1 participe physiologiquement à l'induction de la maturation méiotique.

La question suivante était naturellement de comprendre par quel récepteur la progestérone agissait pour induire la maturation. La question du récepteur était compliquée par le fait qu'*in vitro*, beaucoup de molécules dérivées du cholestérol induisent la maturation méiotique, posant la question de la spécificité du ou des récepteurs impliqués. La stimulation par la progestérone induit une chute de 20 à 50% du taux d'AMPc (Mulner *et al.*, 1979; Sadler and Maller, 1981, 1983; Mulner, Bellé and Ozon, 1983). Ce sont les enzymes adénylates cyclases qui permettent la production d'AMPc en convertissant l'ATP en AMPc (**Fig. 16**). L'AMPc est un second messager dont la production est le plus souvent conditionnée par l'activation d'une protéine $G\alpha$ elle-même activée par la stimulation d'un GPCR (Récepteur transmembranaire couplé à une protéine G). Dans ce cas de figure canonique, la production d'AMPc ne se produit qu'à la suite de la stimulation du GPCR par son ligand. A l'inverse, dans l'ovocyte, l'AMPc est produit de manière constante jusqu'à la stimulation par la progestérone. Si une protéine G est impliquée, il pourrait s'agir de l'inhibition des $G\alpha(s)$ ou de la stimulation de $G\alpha(i)$ (Gallo *et al.*, 1995). L'implication d'une $G\alpha(i)$ est néanmoins peu plausible car la toxine de *Bordetella pertussis*, un inhibiteur spécifique des $G\alpha(i)$, devrait bloquer la reprise de la méiose mais n'a aucun effet sur les ovocytes de Xénope (Olate *et al.*, 1984; Mulner *et al.*, 1985; Sadler and Maller, 1985). Un GPCR particulier est exprimé à la surface des ovocytes, le GPR185 (**Fig. 16**). Ce GPCR orphelin (on ne lui connaît pas de ligand), constitutivement actif, pourrait être responsable du taux élevé d'AMPc via une stimulation permanente de $G\alpha(s)$ dans l'ovocyte en prophase (Deng *et al.*, 2008; Ríos-Cardona *et al.*, 2008; Nader *et al.*, 2014). Sa surexpression inhibe l'effet de la progestérone. Au contraire, son inhibition induit une reprise de la méiose plus rapide que la normale, suggérant qu'il co-existe d'autres mécanismes en parallèle pour maintenir l'ovocyte en prophase. Le GPR185 représente un candidat attractif qui serait impliqué dans l'activation des adénylates cyclases via une $G\alpha(s)$ dans l'ovocyte en prophase

(Fig. 16). Aucun élément ne permet de savoir si la progestérone peut inhiber GPR185. La progestérone pourrait d'ailleurs agir sur un autre récepteur distinct de GPR185, contournant ainsi l'action inhibitrice de ce dernier.

Quel peut être le récepteur répondant directement à la liaison à la progestérone ? Il en existe deux grands types cellulaires : (1) les récepteurs localisés dans le cytoplasme, qui une fois liés à la progestérone vont être transloqués au noyau pour induire la transcription de certains gènes (nPR pour *Nuclear Progesterone Receptor*) et (2) les récepteurs membranaires (mPR pour *Membrane Progesterone Receptor*), découverts plus récemment, qui une fois liés à la progestérone, entraînent la production de seconds messagers (Zhu *et al.*, 2003). Dans le premier cas, la progestérone conduit à la transcription de gènes (effet génomique), alors que dans le second, elle a pour effet d'activer une ou plusieurs voies de signalisation (effet non-génomique) (Kolatorova *et al.*, 2022). Nous savons que la progestérone agit dans l'ovocyte de façon non-génomique, mais on ne peut exclure le cas très particulier où un nPR puisse activer de façon atypique un mécanisme non-transcriptionnel. Effectivement, le premier récepteur de la progestérone à avoir été proposé pour l'ovocyte correspondait au nPR canonique de la progestérone, récepteur cytoplasmique dans l'ovocyte et pour cela nommé iPR (*internal progesterone receptor*). Dès sa découverte, iPR fut considéré comme non canonique puisqu'il était uniquement cytoplasmique et n'impliquait aucun effet génomique (Bayaa *et al.*, 2000; Tian, 2000; Maller, 2001). De plus, en considérant la taille importante de l'ovocyte et les quelques minutes qui séparent l'application de la progestérone de la chute du taux cytoplasmique d'AMPc dans l'ovocyte, il est très peu probable que ce récepteur passe par le noyau pour agir. En outre, étant très spécifique de la progestérone, il ne peut expliquer comment de nombreux autres stéroïdes, y compris des antagonistes de la progestérone comme le RU486 (Sadler, Bower and Maller, 1985), provoquent le même effet que cette hormone. Depuis, aucun autre travail n'est venu étayer l'hypothèse d'une implication du nPR dans la reprise de la méiose. Il faut également signaler tout un pan de littérature émanant du laboratoire de Stephen Hammes, suggérant que ce soit la testostérone qui induise la maturation méiotique, via son récepteur nucléaire, nTR, par un mécanisme original ne faisant pas appel à la transcription et à une translocation nucléaire (Lutz *et al.*, 2001, 2003; Haas *et al.*, 2005; Evaul *et al.*, 2007). Comme pour le nPR, les résultats ne permettent pas d'intégrer de façon satisfaisante ces hypothèses avec les données connues de reprise de la méiose, d'autant plus qu'il est très peu probable que la testostérone soit l'hormone physiologiquement

responsable de la reprise de la méiose. Mais il faut peut-être envisager des effets additifs dus à des cocktails de stéroïdes agissant chacun par leur propre récepteur et convergeant tous vers l'AMPC et PKA.

À cette même époque, les années 2000, il fut mis en évidence l'existence de récepteurs membranaires à la progestérone (mPR), appartenant à une nouvelle famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaire distincts des GPCR, les PAQR (*Progestin and AdipoQ Receptor*) (Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007). La possibilité que l'un de ces récepteurs soit impliqué dans l'effet de la progestérone semblait plus probable (**Fig. 17**). En effet, il fut mis en évidence que le PAQR8, aussi appelé mPR β , était présent à la surface des ovocytes et que son inhibition via des anticorps conduisait à une incapacité de la progestérone à induire la maturation (Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007). Cependant, les doses de progestérone requises pour l'activer sont supérieures à celles nécessaires à l'activation de l'iPR. Il serait donc possible que ces deux récepteurs fonctionnent de concert pour induire la maturation de l'ovocyte de Xénope (Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007). Ces résultats permettent d'établir un modèle, très hypothétique, d'induction de la maturation en condition physiologique par la progestérone. Les deux types de récepteurs seraient activés par la progestérone libérée par les cellules folliculaires, conduisant à l'inactivation du GPR185 (**Fig. 17**). Les G α (s) ne seraient plus activées, conduisant à une chute d'activité des adénylates cyclases. Par conséquent, le taux d'AMPC chuterait en quelques minutes, conduisant à l'inactivation de PKA (Wang, 2004) et à la reprise de la méiose (Jesus, Munro and Houliston, 2020). Il n'est pas exclu que le nPR et le mPR puissent lancer des voies originales, en parallèle à la chute d'activité de PKA, contribuant à l'activation du MPF.

b) Acquisition de la compétence à reprendre la méiose au cours de la croissance des ovocytes

La capacité à reprendre la méiose en réponse à la stimulation hormonale dépend de la taille des ovocytes : seuls les ovocytes de stade V et VI sont capables de reprendre la méiose lorsqu'ils sont exposés à la progestérone (**Fig. 15**). L'acquisition de cette capacité en fonction de la taille cellulaire a probablement été sélectionnée pour éviter que des ovocytes en cours de croissance, et n'ayant donc pas accumulé assez de réserves pour soutenir les premières divisions embryonnaires, n'entrent en méiose. Cette incompétence repose sur plusieurs verrous des étapes de la voie de signalisation conduisant à l'activation du MPF. Tout d'abord,

des niveaux élevés d'AMPC sont déjà mesurables dans des ovocytes de stade IV et de taille inférieure (Jordana, Allende and Allende, 1982). Plus important, la stimulation par la progestérone d'ovocytes de stade IV conduit, comme pour ceux de stade VI, à une chute du taux d'AMPC (Jordana, Allende and Allende, 1982). Cependant, cette chute d'AMPC, comme l'injection de PKI, l'inhibiteur spécifique de PKA, n'induit pas la reprise de la méiose (Sadler and Maller, 1983). Ceci indique que le récepteur à la progestérone est bien exprimé dans les petits ovocytes incompetents, et actif. Mais les cibles de PKA sont déficientes, soit non-exprimées, soit elles-mêmes incapables d'agir avec leurs effecteurs. Seuls l'injection de MPF par transfert cytoplasmique est capable de provoquer la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD) dans les ovocytes de stade IV (Sadler and Maller, 1983). Cependant, cette injection de MPF ne semble pas permettre l'activation du pré-MPF déjà présent dans les ovocytes de stade IV. En effet, le pré-MPF reste phosphorylé sur la Tyr15 (Rime *et al.*, 1991), indiquant que la maturation ne se produit que grâce au MPF exogène sans que ce dernier ait pu lancer l'auto-amplification du pré-MPF endogène (Rime *et al.*, 1991). De même, l'injection de Cycline B dans les ovocytes de stade IV est incapable de provoquer GVBD mais se lie à du Cdk1 libre endogène, conduisant à la formation de nouveaux complexes qui sont immédiatement inactivés par phosphorylation de la Tyr15 de Cdk1 par Myt1 (Rime, Jessus and Ozon, 1995). L'injection de Cdc25 est, elle aussi, inefficace. Cette incompetence peut être due à une suractivité de la kinase Myt1 dans les petits ovocytes et à l'absence d'éléments constitutifs de la boucle d'auto-amplification (Taylor and Smith, 1987). Un candidat intéressant est la kinase Plx1, qui n'est pas exprimée dans les ovocytes de stade IV et qui est un élément essentiel de la boucle d'auto-amplification du MPF (Karaïskou *et al.*, 2004a). Cette kinase participe à la phosphorylation de Cdc25, connue pour activer cette phosphatase et ainsi permettre la conversion du pré-MPF en MPF actif. L'injection combinée de Plx1 et de l'acide okadaïque (OA), un inhibiteur de la phosphatase PP2A qui est antagoniste à Cdk1, permet d'obtenir dans les petits ovocytes une déphosphorylation totale de Cdk1 sur Tyr15 (Karaïskou *et al.*, 2004b). Ceci indique qu'une co-régulation de ces deux enzymes permet de restaurer l'auto-amplification qui fait défaut aux ovocytes de petite taille. Néanmoins, même quand le MPF est activé, seul GVBD se produit, mais le fuseau de métaphase I est incapable de s'organiser (Rime, Jessus and Ozon, 1995). Cela signifie qu'en aval du MPF, des acteurs de la réorganisation structurale des divisions méiotiques ne sont pas en place. À noter également le faible taux d'expression de la kinase Aurora-A, un autre acteur de la boucle d'auto-amplification du MPF dans les ovocytes de stade IV (Maton *et al.*, 2003). Dans les

ovocytes de stade IV, l'incapacité à reprendre la méiose serait donc expliquée par l'absence de plusieurs éléments à différents étages de la voie de signalisation lancée par la progestérone, y compris en aval du MPF.

c) Synthèse protéique, seconde étape incontournable de la reprise de la méiose

En réponse à la stimulation par la progestérone, et une fois PKA inactivée (Wang, 2004), une synthèse de nouvelles protéines survient. L'incorporation de puromycine dans les chaînes naissantes des protéines révèle que des dizaines de protéines sont traduites et s'accumulent (résultats du laboratoire non publiés)(Younglai, Godeau and Baulieu, 1981; Charbonneau, Bonnac and Boujard, 1990). Une seconde vague de traduction se produit suite à l'activation du MPF (Wasserman, Richter and Smith, 1982; Jesus *et al.*, 1988). La première vague de protéines nouvellement traduites inclut certaines protéines importantes, voire nécessaires pour l'activation du MPF comme la Cycline B1 et Mos (**Fig. 17**). Rappelons que des inhibiteurs de la synthèse protéique bloquent l'activation du MPF, qu'elle soit stimulée par la progestérone ou par l'inhibition de PKA. Comme nous l'avons vu, la synthèse de la Cycline B1 est réprimée lorsque PKA est active et la protéine s'accumule progressivement en réponse à la progestérone, même lorsque l'activation du MPF est bloquée par un inhibiteur de Cdk1, la protéine Cip1 (Kobayashi *et al.*, 1991; Frank-Vaillant *et al.*, 1999; Hochegger *et al.*, 2001). Cette synthèse de nouvelle Cycline serait à l'origine de nouveaux complexes Cdk1-Cycline B1 actifs capables d'induire la maturation (**Fig. 17**). Cette possibilité semble confirmée par l'injection de Cycline B1 dans l'ovocyte. Que cela soit sous forme d'ARNm ou sous forme protéique, la Cycline B1 induit la maturation de l'ovocyte de Xénope. Cependant, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN messager de la Cycline B1 (et même contre l'ensemble des Cyclines B1, B2, B4 et B5) n'empêche pas la maturation méiotique (Jesus and Haccard, 2006). Ce résultat surprenant indique que la synthèse de Cycline B1 est suffisante mais pas nécessaire pour l'activation de Cdk1, et qu'il existe donc une ou plusieurs autres protéines traduites elles-aussi en réponse à la progestérone. Un candidat potentiel est la protéine Mos, dont nous avons déjà parlé, et qui s'accumule en parallèle de l'activation du MPF (**Fig. 17**). Comme la Cycline B1, l'injection de cette protéine induit la maturation de l'ovocyte (Sagata *et al.*, 1988; Sagata, 1997), indiquant sa suffisance. En revanche, concernant la nécessité de la présence de Mos, des résultats contradictoires ont été publiés. Comme nous l'avons vu, les premières études ont rapporté une incapacité des ovocytes à reprendre la maturation lorsque sa traduction est

bloquée par des oligos antisens (Sagata *et al.*, 1988). Des études plus récentes ont montré au contraire que son absence, induite par l'injection de morpholinos antisens, n'empêchait pas l'activation de Cdk1 de se produire, même si celle-ci est retardée. Comme pour la Cycline B1, la traduction de Mos ne serait pas nécessaire à l'activation du MPF (Dupré *et al.*, 2002; Baert *et al.*, 2003). Ces résultats ont exclu provisoirement Mos et la Cycline B1 de la liste de protéines pouvant être considérées comme les protéines nouvellement traduites requises pour l'activation de Cdk1. D'autres candidats furent alors recherchés : ils doivent être synthétisés en réponse à la progestérone, être capables d'induire la maturation en l'absence de progestérone, même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, et être strictement nécessaires à l'activation de Cdk1. Autrement dit, le candidat doit être une protéine dont l'absence rendrait incapable les ovocytes de reprendre la méiose. En 1999, deux équipes distinctes découvrirent une même protéine, nommée RINGO (*Rapid INducer of G2/M progression in Oocytes*) par les uns et Speedy par les autres en raison de sa capacité, lorsqu'elle est surexprimée, à induire une activation rapide de Cdk1 (Ferby *et al.*, 1999; Lenormand *et al.*, 1999). De manière inattendue, RINGO/Speedy se lie à la kinase Cdk1 et active cette dernière, un peu comme une Cycline, mais selon un mécanisme différent puisque l'activation a lieu même en l'absence de phosphorylation de Cdk1 sur Thr161 (Karaiskou *et al.*, 2001). RINGO/Speedy est capable, comme la Cycline B et Mos, d'induire la maturation lorsqu'il est injecté dans l'ovocyte, bien que l'expérience n'ait pas été réalisée en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique. En outre, son absence par injection d'oligos antisens empêche les ovocytes de reprendre la méiose. En remplissant ces deux critères, RINGO/Speedy semblait être un excellent candidat. Il fut proposé que RINGO/Speedy associé à Cdk1 joue un rôle dans l'inhibition de Myt1, expliquant le mécanisme par lequel il conduirait à l'activation du MPF (Ruiz, Hunt and Nebreda, 2008; Ruiz, Vilar and Nebreda, 2010). Cependant, il fut au final montré que cette protéine était déjà exprimée dans l'ovocyte en prophase (Gutierrez *et al.*, 2006). Aucune de ces trois protéines, Cycline B1, Mos et RINGO/Speedy ne semble à elle-seule correspondre à la protéine dont la synthèse est nécessaire à l'activation du MPF.

Ces résultats peuvent trouver leur explication dans la redondance de voies de signalisation qui, lorsqu'elles sont déployées en parallèle, confère une robustesse aux processus qu'elles régulent. En effet, si plusieurs voies parallèles conduisent à un même processus, ce dernier ne sera pas ou peu affecté par la perte de l'une de ces voies, puisque les autres lui permettront toujours de se produire. Il semble que ce soit le cas de l'activation du

MPF dans l'ovocyte de Xénope. Si l'on bloque uniquement la synthèse de Mos, ou uniquement la synthèse de Cycline B1, le MPF est toujours activé. En revanche, lorsque les deux synthèses sont bloquées simultanément, l'activation du MPF est inhibée. Elle peut être rétablie par l'injection soit de Mos, soit de Cycline B1. Mos et Cycline B1 pourraient donc mettre en œuvre deux voies parallèles conduisant à l'activation du MPF (Haccard and Jessus, 2006b). Chacune est suffisante pour que le système fonctionne, aucune des deux n'est nécessaire tant que l'autre est fonctionnelle, mais l'abolition des deux empêche la maturation méiotique.

d) Activation du MPF, troisième et dernière étape de la reprise de la méiose

Durant l'arrêt en prophase, la kinase Myt1 est active et au cœur du processus de cet arrêt (**Fig. 17**). En effet, elle maintient les phosphorylations inhibitrices des complexes Cycline B2-Cdk1 accumulés au cours de l'arrêt en prophase, contribuant à la formation du stock de pré-MPF. Par ailleurs, elle sécurise l'arrêt en prophase en empêchant dans une certaine mesure tout complexe nouvellement formé d'être actif (Gaffré *et al.*, 2011). L'inhibition de Myt1 est donc un verrou qu'il est nécessaire de lever pour l'activation du MPF et la déphosphorylation de l'important stock de pré-MPF déjà présent dans l'ovocyte.

(1) Inhibition de Myt1 et activation initiale du MPF

Myt1 est, comme nous l'avons vu précédemment, la kinase qui phosphoryle le complexe Cycline B-Cdk1 sur les résidus Thr14 et Tyr15 dans l'ovocyte de Xénope en prophase, la kinase Wee1 n'étant pas exprimée à ce stade. Bien que les formes de Cdk1 liées à la Cycline B2 ou B1 soient phosphorylées sur la Thr161, les deux phosphorylations sur Tyr15 et Thr14 se situant dans son site catalytique, Cdk1 est inactivé. L'inhibition de Myt1 est donc le point de passage obligé pour activer le MPF. Cette inhibition est due à une hyperphosphorylation qui s'amorce dans l'ovocyte de Xénope alors que le pré-MPF est toujours présent, par conséquent en amont du processus d'auto-amplification (Gaffré *et al.*, 2011). Quelle(s) est/sont la ou les kinases responsables de l'initiation de l'inhibition de Myt1 ? Plusieurs kinases ont été envisagées comme la kinase Plx1 (impliquée dans l'auto-amplification) ou encore les kinases Mos/MAPK (Gaffré *et al.*, 2011). Cependant, leur inhibition ou au contraire leur activation, ainsi que l'utilisation de mutants constitutivement actifs de ces kinases ne provoquent pas à elles-seules l'hyperphosphorylation inhibitrice de Myt1. L'implication du substrat de Myt1, Cdk1, a été également testée. Comme vu précédemment, suite à la stimulation des ovocytes par la progestérone, la Cycline B1 est synthétisée et forme avec Cdk1 de nouveaux complexes MPF

(Cycline B1-Cdk1). Il a été proposé que parmi ces nouveaux complexes, certains échappent à la phosphorylation par Myt1, par un mécanisme inconnu, et au contraire phosphorylent Myt1, conduisant au démarrage de son inactivation (**Fig. 17**) (Gaffré *et al.*, 2011). Un travail contemporain du précédent reprend le même scénario, mais avec RINGO/Speedy à la place de la Cycline B1 : le complexe formé par les nouvelles molécules synthétisées de RINGO/Speedy, associées à Cdk1, serait lui aussi capable d'échapper à la phosphorylation par Myt1, à laquelle il est moins sensible que les complexes Cdk1-Cycline B, et au contraire de phosphoryler et de réduire son activité (Ruiz, Hunt and Nebreda, 2008; Ruiz, Vilar and Nebreda, 2010). Par ailleurs, il fut aussi montré que la kinase p90^{Rsk}, activée par la voie Mos, était capable de phosphoryler Myt1 et de potentiellement participer à son inactivation (Ruiz, Vilar and Nebreda, 2010). Mais cette kinase est activée bien en aval de la formation des nouveaux complexes dus à la synthèse de Cycline B1 et RINGO/Speedy, et ne peut participer à l'initiation de l'inhibition de Myt1. Il est important de noter que l'inhibition initiale de Myt1 garantit seulement que les complexes MPF nouvellement formés par synthèse de Cycline B et RINGO/Speedy ne soient pas inhibés, et forment donc des « amorces » de Cdk1 active. En revanche, les complexes précédemment phosphorylés sur la Thr14 et Tyr15 par Myt1 et qui forment le stock de pré-MPF sont insensibles à cette inhibition de Myt1 : pour devenir actifs, ils dépendent d'une déphosphorylation, catalysée par Cdc25. Or cette phosphatase est évidemment inactive dans l'ovocyte en prophase.

(2) Activation de Cdc25 et activation initiale du MPF

(a) Cdc25

Comme nous l'avons vu précédemment, le gène *cdc25* identifié par l'équipe de Paul Nurse (Russell and Nurse, 1986), code chez la levure pour une phosphatase qui déphosphoryle la Tyr15 de Cdk1 phosphorylé par Wee1. Cette phosphatase est conservée chez tous les eucaryotes (Hoffmann, Clarke and Draetta, 1995; Jesus and Ozon, 1995). Chez les mammifères, il en existe trois formes, A, B et C. Chacune semble réguler des événements spécifiques du cycle cellulaire, la phase S pour Cdc25A (Hoffmann, Draetta and Karsenti, 1994; Jinno *et al.*, 1994) et la phase-M pour Cdc25B et C (Kiyokawa and Ray, 2008). Pour Cdc25A et B, ces phases d'activité sont conditionnées par leur patron d'expression, restreint respectivement aux phases S et M du cycle. Au contraire, la forme C de Cdc25 est exprimée pendant tout le cycle et est la seule de ces trois formes à être présente chez tous les vertébrés.

Les trois formes de Cdc25 sont exprimées dans des types cellulaires différents. Suivant leur profil d'expression, ces différentes formes peuvent entraîner des modifications de la longueur des phases du cycle, ayant des répercussions sur les processus cellulaires, comme la prolifération et la différenciation neuronale (Peco *et al.*, 2012). Dans cette partie, je vais uniquement m'intéresser à Cdc25C, qui est la seule forme exprimée dans l'ovocyte de Xénope où elle fut mise en évidence en 1991-1992 (Gautier *et al.*, 1991; Izumi, Walker and Maller, 1992; Jessus and Beach, 1992).

(b) Déphosphorylation de la Ser287 de Cdc25C

Cdc25C est exprimé de manière constante et est stable durant la maturation méiotique, impliquant que son activité n'est pas régulée via son expression mais de manière post-traductionnelle. De fait, au cours de l'arrêt en prophase puis de la reprise de la méiose, Cdc25C est l'objet de multiples phosphorylations. Durant l'arrêt en prophase, au cours duquel la phosphatase est inactive, Cdc25C est phosphorylé sur la sérine 287 par la kinase responsable de cet arrêt, la kinase PKA (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002). Comme nous l'avons déjà évoqué, cette phosphorylation provoque le recrutement de la protéine 14-3-3, ce qui réduit son import vers le noyau dans les lignées cellulaires étudiées (Yang *et al.*, 1999). La déphosphorylation du résidu 287 (ou équivalent chez les autres espèces) dissocie 14-3-3 et permet la translocation nucléaire de Cdc25C. Or, pour l'entrée en mitose, il semble que l'activation initiale du MPF, critique pour lancer la division, doit être réalisée au sein du noyau (Jin, Hardy and Morgan, 1998). La déphosphorylation du résidu 287 de Cdc25C serait donc un incontournable pour lancer la mitose. Dans l'ovocyte en prophase, Cdc25C est cytoplasmique. Cela pourrait être dû à un déséquilibre entre l'import et l'export nucléaire de Cdc25C en faveur de ce dernier, la liaison de Cdc25C à 14-3-3 la retenant au niveau cytoplasmique en réduisant sa capacité à entrer dans le noyau et en augmentant son export vers le cytoplasme (Yang *et al.*, 1999). La stimulation par la progestérone induirait la séparation avec 14-3-3 et Cdc25C pourrait alors se transloquer dans le noyau et induire la reprise de la maturation (Yang *et al.*, 1999). Ceci est cohérent avec des expériences utilisant la leptomycine B, un inhibiteur de l'export nucléaire, qui conduit à l'activation du MPF et à la maturation en corrélation avec la rupture de l'interaction entre 14-3-3 et Cdc25C (Yang *et al.*, 1999; Margolis *et al.*, 2003). En outre, l'injection de Cdc25 dans l'ovocyte en prophase induit la reprise de la méiose sauf si l'activité PKA est maintenue active. En revanche, une forme de Cdc25C non phosphorylable sur la Ser287

induit la maturation de l'ovocyte, même en présence d'une forte activité de PKA (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002). Ces travaux pointent l'importance de la déphosphorylation de Cdc25C sur Ser287 et le relargage de 14-3-3 permettant sa translocation nucléaire pour initier la reprise de la méiose.

Mais l'ensemble de ces conclusions contrastent fortement avec d'autres résultats bien étayés par de nombreuses équipes, montrant que le noyau n'est pas nécessaire à l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope (Masui and Markert, 1971a; Drury and Schorderet-Slatkine, 1975; Fisher *et al.*, 1998). En outre, la déphosphorylation de Cdc25 sur Ser287 est un événement tardif, contemporain du processus d'auto-amplification du MPF, qui ne se produit pas en absence de synthèse protéique, ni quand l'activité MPF est bloquée par la roscovitine (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002). Ceci est incompatible avec un rôle de cette déphosphorylation dans l'initiation de l'activation du MPF via une translocation nucléaire.

Bien que la phosphorylation de cette sérine n'impacte pas l'activité de Cdc25C, sa déphosphorylation contribue certainement à la maturation méiotique. Son mécanisme a été étudié dans des extraits acellulaires dérivés d'ovocytes de Xénope. Cette déphosphorylation, se produit en plusieurs étapes. Elle débiterait par une séparation de Cdc25C et 14-3-3, la Ser287 n'est ainsi plus protégée de la déphosphorylation (Margolis *et al.*, 2003, 2006). En l'absence de 14-3-3, la phosphatase PP1 s'associerait alors à Cdc25C. Néanmoins, cette interaction instable ne permettrait qu'un faible niveau de déphosphorylation de la Ser287. Cette interaction serait renforcée par la phosphorylation de la Ser285 par Cdk1. Une fois Cdc25C phosphorylé sur la Ser285, PP1 déphosphorylerait alors efficacement la Ser287 de Cdc25C (Margolis *et al.*, 2006). À noter donc que (1) la déphosphorylation dépend d'une activité Cdk1 et (2) qu'elle ne se produit plus en l'absence de synthèse protéique (Duckworth, Weaver and Ruderman, 2002; Margolis *et al.*, 2003, 2006). Tout cela pointe un événement qui a lieu en aval de la formation des amorces actives de Cdk1 dues à la synthèse de Cycline B1. La déphosphorylation de la Ser287 ne peut donc être un événement initiateur du système d'activation du MPF, mais plutôt une étape qui s'inscrit dans le processus d'auto-amplification. Son rôle exact reste à déterminer.

(c) Phosphorylation activatrice de Cdc25

En réponse à la progestérone et en parallèle de cette déphosphorylation, Cdc25C est progressivement phosphorylée sur de multiples résidus, comme le révèlent par western blot

les échelles de bandes dont la migration électrophorétique est retardée pendant la période entourant GVBD, jusqu'à ce qu'une seule bande ne se concentre au sommet de l'échelle quand la phosphorylation est totale. Ces multiples phosphorylations activent la phosphatase (Izumi, Walker and Maller, 1992) et sont le fruit de l'activité de plusieurs kinases que plusieurs équipes ont cherché à identifier. Plusieurs sites de phosphorylation par Cdk1 sont retrouvés dans la séquence de Cdc25, notamment trois thréonines (Thr48, 67 et 138) et deux sérines (Ser205 et 285). Lorsque ces sites sont mutés, le retard électrophorétique de Cdc25 n'est plus observé, montrant l'implication de Cdk1 dans ces phosphorylations activatrices de Cdc25. Ceci pointe une activation de la phosphatase au sein de la boucle d'auto-amplification, Cdk1 étant capable de phosphoryler et d'activer son propre activateur, Cdc25, ce qui accélère son activation (**Fig. 18**). Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse protéique globale ou plus spécifiquement celle de la Cycline B1, empêche l'activation de Cdc25 normalement induite par la progestérone (Haccard and Jessus, 2006b). Il semble par conséquent, que l'activation de Cdc25C soit dépendante de la formation des nouveaux complexes Cdk1-Cycline B1. Ces complexes nouvellement formés, actifs parce qu'ils ont échappé aux phosphorylations inhibitrices de Myt1, pourraient activer Cdc25 (Gaffré *et al.*, 2011). Cette activation de Cdc25 couplée à l'inhibition de Myt1 est essentielle pour que le pré-MPF soit déphosphorylé (Gaffré *et al.*, 2011).

(3) Boucle d'auto-amplification

L'auto-amplification du MPF correspond à la capacité des premières molécules actives de MPF d'accélérer l'activation de celles qui sont encore inactives (**Fig. 18**). Plus les molécules actives sont générées, plus elles participent à l'activation de celles qui ne le sont pas encore, entraînant une accélération de plus en plus forte de la réaction d'activation. Comme nous l'avons vu, cette propriété remarquable du MPF fut découverte par Masui et Markert en 1971 lors d'expériences de transferts en cascade de cytoplasme (**Fig. 14**) (Masui and Markert, 1971a). La répétition des transferts montre que, bien que le MPF issu du premier ovocyte donneur ait été progressivement dilué, la maturation des ovocytes receveurs est toujours induite. Ceci révèle la capacité du MPF à jouer un rôle d'amorce en activant le pré-MPF inactif présent dans le receveur (Masui and Markert, 1971a). En contexte physiologique, ce rôle d'amorce serait joué par les complexes Cdk1-Cycline B1 néoformés qui participent de manière déterminante à l'inhibition de Myt1 en premier lieu, puis à l'activation de Cdc25 (**Figs 17 et 18**) (Haccard and Jessus, 2006b; Gaffré *et al.*, 2011). Ces deux événements vont permettre

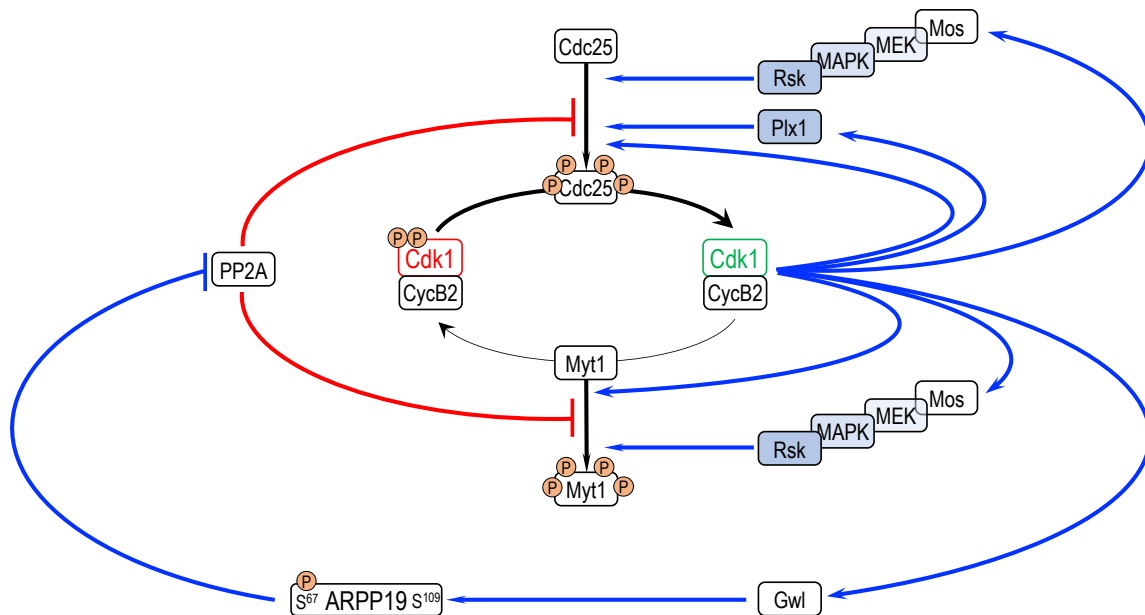


Figure 18 : Boucle d'auto-amplification du MPF.

À la suite de l'activation initiale d'une amorce de MPF actif (Cdk1-Cycline B1), va se mettre en place la boucle d'auto-amplification. Cette boucle correspond à la régulation par le MPF (Cdk1-Cycline B2) lui-même de ses régulateurs positifs et négatifs, entraînant son activation massive et brutale. Le MPF est capable directement et indirectement de phosphoryler son régulateur négatif, la kinase Myt1 en la phosphorylant ou bien en activant la voie Mos/MAPK qui active la kinase p90^{Rsk} qui phosphoryle aussi Myt1. Ces phosphorylations inhibent Myt1 qui n'est alors plus capable de phosphoryler la T14 et la Y15 de Cdk1. La phosphorylation de ces deux résidus de Cdk1 inhibe son activité kinase et doit être éliminée, ce qui est catalysé par la phosphatase Cdc25. Cdc25 nécessite de nombreuses phosphorylations pour être activée. Ces phosphorylations sont apposées par le MPF, mais aussi par la kinase Rsk et Plx1 sous le contrôle du MPF. Néanmoins, ces phosphorylations activatrices de Cdc25 et inactivatrices de Myt1 sont aussi régulées par la phosphatase PP2A-B55, qui s'oppose à l'établissement de cette boucle d'auto-amplification. Pour empêcher la déphosphorylation de Myt1 et Cdc25 ainsi que de ses autres substrats, le MPF lance l'activation de la kinase Gwl. Gwl phosphoryle son substrat, ARPP19, sur le résidu sérine 67, convertissant ARPP19 en un puissant inhibiteur de PP2A-B55.

d'entamer l'activation du stock de pré-MPF inactif formé de Cdk1-Cycline B2. Les molécules de MPF formées à partir de ce stock vont à leur tour activer Cdc25 et inhiber Myt1, accélérant sur un mode toujours plus amplifié la conversion du stock de pré-MPF en MPF. Cette activation massive et irréversible du pré-MPF entraîne la reprise de la méiose. Cdk1 est donc central dans le processus d'auto-amplification, via l'amorce de Cdk1-Cycline B1 puis les complexes activés de Cdk1-Cycline B2. Mais ce n'est pas la seule kinase à alimenter la boucle, qui se trouve amplifiée par l'intervention de plusieurs kinases, telles que Plx1 ou encore Mos (**Fig. 18**).

La kinase Plx1 (*Polo Like Kinase 1*) est impliquée dans cette amplification du MPF. La déplétion de Plx1 dans l'ovocyte empêche la reprise de la méiose (Qian *et al.*, 2001). Par ailleurs, le fait que la protéine ne soit pas exprimée dans les petits ovocytes de stade IV est impliqué dans leur incapacité à murer (Qian *et al.*, 2001; Karaïskou *et al.*, 2004b). Plx1 participe avec Cdk1 à l'activation de Cdc25. Son inhibition (par ajout d'anticorps anti-Plx1 ou d'un mutant dominant inactif) ou au contraire son activation (par ajout de Plx1 constitutivement active) conduisent respectivement à un ralentissement ou à une accélération de l'activation de Cdc25C et de la reprise de la méiose (Qian *et al.*, 1998; Qian, Erikson and Maller, 1999). Ces résultats soulignent très clairement le rôle important joué par Plx1 dans l'activation de Cdc25 et par conséquent du MPF. Ce rôle de Plx1 s'exerce en renfort de l'activation de Cdc25 au sein de la boucle d'auto-amplification (**Fig. 18**). En effet, l'activation de Plx1 dépend de Cdk1 : lorsque l'activation de Cdk1 est inhibée par Cip²¹ durant la reprise de la méiose, alors Plx1 ne s'active pas. Ceci indique la dépendance de Plx1 vis-à-vis de Cdk1 et plus précisément de l'amorce de Cdk1-Cycline B1, puisqu'au moment de l'activation de Plx1, le pré-MPF est toujours inactif (Karaïskou *et al.*, 2004a).

D'autres kinases participent au processus d'auto-amplification, et notamment la kinase Mos et les kinases dont elle permet l'activation (**Fig. 18**). Mos active la voie des MAPK kinases dans l'ovocyte en se positionnant à l'étage de Raf1 : elle phosphoryle et active MEK, qui phosphoryle et active à son tour la MAP kinase ERK1/2. Cette dernière a plusieurs substrats, en particulier la kinase p90^{Rsk} qui joue un rôle important dans la suite de la maturation méiotique (Gross *et al.*, 2000). Il semble que cette voie soit aussi impliquée dans l'activation de Cdc25. L'élimination de Mos par ajout de morpholinos, mais pas l'inhibition de la voie en aval des MAPKs, semble affecter l'activation de Cdc25 (Gaffré *et al.*, 2011). Il avait déjà été montré que Mos pouvait agir indépendamment de la voie aval des MAPKs qu'elle lance dans le cas de l'inhibition de Myt1 (Peter *et al.*, 2002). L'ajout de Mos dans des ovocytes où la protéine

endogène a été déplétée via l'injection de morpholinos, permet de restaurer l'activation de Cdc25. Néanmoins, cette complémentation ne fonctionne pas si l'activation de Cdk1 est inhibée par une injection de Cip²¹ (Gaffré *et al.*, 2011). Ceci indique que l'effet de Mos sur l'activation de Cdc25 est dépendant d'une activité MPF, probablement l'amorce en conditions physiologiques. Cette dépendance de Mos vis-à-vis d'une activité Cdk1 s'explique d'ailleurs très bien. En effet, il a été montré que, bien que Mos soit traduit en réponse à la progestérone, la protéine nécessite une phosphorylation de la Ser3 par Cdk1 pour être stabilisée et s'accumuler (Frank-Vaillant *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2001). Ainsi, Mos, une fois stabilisée par l'amorce de MPF, pourrait comme Plx1 participer à l'amplification du MPF en contribuant à la phosphorylation et l'activation de Cdc25 (**Fig. 18**).

Par ailleurs une autre composante de la boucle d'auto-amplification est à prendre en considération. Nous venons de le voir, cette boucle repose sur de multiples phosphorylations de Myt1, la kinase inhibitrice, et de Cdc25, la phosphatase activatrice, par le MPF lui-même ainsi que par les kinases Mos et Plx1. Cependant, l'ensemble de ces phosphorylations sont la cible d'une phosphatase très spécifique : PP2A-B55. Si elle n'est pas inhibée, les phosphorylations critiques qui forment le cœur de la boucle d'auto-amplification ne peuvent pas se mettre en place (**Fig. 18**). Son inhibition est par conséquent un évènement crucial pour l'activation du MPF et l'entrée en méiose et fera l'objet du prochain chapitre. La boucle d'auto-amplification repose donc sur un basculement de cette opposition entre la phosphatase et les kinases en faveur de ces dernières. Cela se traduit par la conversion subite du pré-MPF en MPF qui orchestrera alors l'ensemble des évènements décrits dans la partie suivante et correspondant à la progression en méiose I puis en méiose II.

3. Transition méiose I – méiose II

La production d'un gamète haploïde est dépendante de la réussite de cette transition, originale à la méiose puisqu'elle permet l'enchaînement de deux divisions qui ne seront pas séparées par un retour en interphase répliative. L'enjeu est donc que la cellule se divise, avec l'émission d'un globule polaire, mais qu'elle évite le retour en interphase et choisisse au contraire la voie d'une nouvelle phase-M. Ce sont des régulations complexes des différents acteurs de la division, régulations originales à la méiose, qui vont permettre cette transition délicate. Il est probable que, outre les régulations biochimiques qui vont être présentées, des régulations basées sur la localisation spécifique de ces acteurs dans des compartiments

cellulaires bien précis, soient également impliquées. Ce niveau de régulation cellulaire est malheureusement difficile à aborder dans l'ovocyte de Xénope.

a) Activité de Cdk1 entre méiose I et méiose II

L'activité du MPF est maximale au moment de la métaphase I. C'est de fait à cette période que son activité est requise pour orchestrer l'ensemble des événements qui constituent la prométaphase et la métaphase. Son activité est maintenue tout au long de cette étape afin de permettre à l'ovocyte de dissocier l'enveloppe nucléaire, de condenser les chromosomes, d'assembler le fuseau de division, de permettre l'attachement des chromosomes homologues aux microtubules de ce dernier et ceci de manière correcte. Lorsque tous les chromosomes homologues sont alignés et qu'au sein de chaque paire, chacun est attaché à un pôle opposé du fuseau, alors le SAC est désactivé comme vu précédemment. L'inactivation du SAC ne permet plus la formation du complexe MCC qui se désassemble et libère Cdc20. Cette protéine peut alors s'associer à l'APC, le rendant capable d'ubiquitinyler ses cibles, la Sécurine et la Cycline B entre autres. Ainsi, en conduisant la métaphase à son terme, le MPF entraîne lui-même sa propre inactivation en activant l'APC. Cette chute de l'activité du MPF est strictement régulée et semble être l'unique résultat de la dégradation par l'APC des Cyclines auxquelles Cdk1 est associé. En effet, aucune re-phosphorylation de Cdk1 sur les résidus Tyr15 et Thr14 n'est détectée lors de la transition métaphase I-anaphase I (Jesus *et al.*, 1991; Furuno, Kawasaki and Sagata, 2003). Deux points très importants sont à noter à propos de la chute d'activité du MPF entre méiose I et méiose II dans l'ovocyte de Xénope : d'une part, elle n'est que transitoire et d'autre part, elle n'est pas totale. Une réduction de la quantité des Cyclines B est observée durant cette période, mais elles ne disparaissent pas complètement (Kobayashi *et al.*, 1991; Hochegger *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2001; Taieb *et al.*, 2001). Des mesures de l'activité catalytique de Cdk1 révèlent que la totalité des complexes MPF ne sont pas inactivés et que 25% de l'activité Cdk1 persiste au moment de l'expulsion du premier globule polaire (Masui and Markert, 1971a; Gerhart, Wu and Kirschner, 1984; Huchon *et al.*, 1993; Kishimoto, 2015). L'activité MPF remonte ensuite rapidement lors de la formation de la métaphase II. Ceci est le résultat de la quasi concomitance entre une dégradation rapide des Cyclines B en métaphase I et leur rapide resynthèse alors que leur dégradation n'est pas achevée. L'inactivation du MPF à ce point précis de la méiose est critique, car si le MPF n'est pas suffisamment inhibé, alors l'ovocyte reste bloqué en métaphase

I. Ainsi, l'inhibition de la dégradation des Cyclines via utilisation de MG132, une molécule inhibitrice du protéasome, ou bien l'injection de Cycline B Δ 90, une forme non dégradable de la Cycline, conduit à l'arrêt des ovocytes en métaphase I (Huchon *et al.*, 1993). Au contraire, si l'activité du MPF est totalement abolie, alors l'ovocyte risque de se retrouver dans une situation similaire à celle d'une sortie de mitose, c'est-à-dire un retour en interphase couplé éventuellement à l'initiation d'une phase S suite à la méiose I. C'est ce qui est observé dans le cas d'ovocytes injectés avec le mutant de Cdk1 inactif et dominant-négatif Cdk1-K33R, qui capte les Cyclines resynthétisées sans être actif (Nebreda, Gannon and Hunt, 1995), ou bien suite au traitement des ovocytes en métaphase I par un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide (Huchon *et al.*, 1993; Furuno *et al.*, 1994). Dans ces deux cas, Cdk1 est totalement inactivé, soit par compétition avec le mutant K33R soit ou par l'absence de Cyclines dont la synthèse a été inhibée. Ceci conduit les ovocytes dans un état pseudo-interphasique, caractérisé par la formation de nombreux micro-noyaux autour des chromosomes dispersés et décondensés, qui entament éventuellement une réplication.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, la synthèse de la kinase Wee1 ne débute dans l'ovocyte de Xénope qu'à la suite de la stimulation par la progestérone, précisément en fin de méiose I (Nakajo *et al.*, 2000). Il semblerait que l'absence de Wee1 ait pour but d'éviter une phase S intermédiaire entre les deux divisions méiotiques. Son expression de manière trop précoce durant la métaphase I conduit à la reformation de noyaux ainsi qu'à la réplication de leur ADN (Murakami and Vande Woude, 1998; Nakajo *et al.*, 2000). Il est probable que l'expression ectopique de Wee1 en métaphase I contribue à l'inactivation de Cdk1 en le phosphorylant sur Tyr15. En abaissant drastiquement l'activité de Cdk1, une expression précoce de Wee1 autorise la formation de noyaux répliquants. On peut se demander pourquoi Myt1 qui est présent en continu, n'est pas réactivé à cette période, avec le risque de produire les mêmes effets que l'expression ectopique de Wee1. Cela pourrait être dû à l'activité de la kinase p90^{Rsk} dont nous avons déjà vu qu'elle était capable de phosphoryler directement et d'inhiber Myt1 (Ruiz, Vilar and Nebreda, 2010). Cette kinase, comme toute la voie MAPK lancée par Mos, est stable pendant la transition méiose I-méiose II. On peut également se demander pourquoi Wee1, dont la synthèse est lancée lors de l'entrée en métaphase II, n'inactive pas les complexes Cdk1-Cycline B en cours de reformation. Le bilan de toutes ces expériences est qu'il est crucial de réguler finement la balance de l'activité de Cdk1 à ce point

précis entre les divisions méiotiques, en abaissant son niveau d'activité pour permettre l'anaphase I, mais en maintenant une activité de base pour éviter un retour en interphase.

b) Comment éviter la réplication entre méiose I et méiose II

Ces résultats indiquent aussi que l'ovocyte possède la capacité à répliquer son matériel génétique en fin de métaphase I, raison pour laquelle maintenir un minimum d'activité de Cdk1 pour inhiber ce potentiel réplicatif est essentielle. L'ovocyte en prophase contient un arsenal réplicatif complet à l'exception d'une seule protéine, Cdc6, cruciale pour la machinerie réplicationnelle (Lemaître, Bocquet and Méchali, 2002; Whitmire, Khan and Coué, 2002). Cdc6 est requis au niveau des origines de réplication pour que ces dernières soient fonctionnelles pour lancer la réplication (Lei and Tye, 2001). L'acquisition de la capacité de réplication des ovocytes lors de la métaphase I provient du fait que suite à l'activation de Cdk1, la protéine Cdc6 s'accumule. Or, il est impératif que la réplication soit inhibée. Ceci est réalisé grâce à un contrôle antagoniste du turn-over de Cdc6 exercé d'une part par Cdk1 et d'autre part par la voie Mos/MAPK. Cdc6 est capable de s'associer aux Cyclines B, ce qui le protège de la dégradation par le complexe ubiquitine-ligase SCF^{cdc4} (Daldello *et al.*, 2015). Cette dégradation de Cdc6 par le complexe SCF^{cdc4} est aussi sous le contrôle de la voie Mos/MAPK qui, de façon antagoniste à Cdk1, favorise la dégradation de Cdc6. En l'absence de Mos, par exemple après injection de morpholinos antisens, Cdc6 s'accumule conduisant à la formation de noyaux en réplication après la méiose I. Ainsi, Mos et Cdk1 exercent un effet antagoniste conduisant à une régulation précise du niveau de la protéine Cdc6 entre méiose I et méiose II, maintenu en-dessous du seuil qui provoque la réplication (Daldello *et al.*, 2015).

c) La voie Mos/MAPK et la Cycline B3, des acteurs cruciaux de la transition méiose I-méiose II

L'élimination expérimentale de Mos lors de la métaphase I provoque l'entrée des ovocytes en interphase, avec la formation de noyaux, sièges d'une réplication (Dupré *et al.*, 2002), comme c'est le cas lorsque l'activité Cdk1 est totalement inhibée. Ceci indique que Mos exerce un rôle crucial dans la transition métaphase I – anaphase I. Ce rôle de Mos est dépendant de la voie des MAPK kinases (MEK (MAPKK) et ERK (MAPK)) lancée par Mos, puisque l'inhibition de MEK par l'inhibiteur U0126 conduit au même phénotype. Si Mos est éliminé par des morpholinos antisens, non pas en métaphase I mais dès la prophase I, nous avons vu que

cela n'empêchait pas l'activation du MPF en réponse à la progestérone (Dupré *et al.*, 2002). En revanche, suite à la métaphase I, l'activité de Cdk1 chute en totalité, ce qui induit la formation de noyaux qui entament des cycles successifs de réplication accompagnés de contractions de l'ovocyte, mimant des cycles embryonnaires. Ainsi, Mos, au travers de la voie des MAPK, permet d'éviter une inactivation totale de Cdk1 suite à la métaphase I et d'assurer sa réactivation pour une entrée en méiose II, en l'absence de phase S intermédiaire.

Ceci s'explique par le rôle que joue Mos dans la stabilisation de la protéine Erp1/Emi2, un inhibiteur de l'APC (**Fig. 19**) (Inoue *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007; Nishiyama, Ohsumi and Kishimoto, 2007). Erp1/Emi2 contient dans son extrémité C-terminale une D-Box (*Destruction Box*) qui est également présente chez les Cyclines. Ce motif rend ces protéines substrats de l'APC. Néanmoins, Erp1/Emi2 contient dans sa séquence C-terminale des motifs supplémentaires, ZBR et RL (Shoji *et al.*, 2014) qui permettent d'inhiber l'APC lorsque ce dernier est fixé à Erp1/Emi2. L'expression de Erp1/Emi2 est lancée par la progestérone et son accumulation est strictement régulée. En effet, durant la méiose I, Erp1/Emi2 subit de nombreuses phosphorylations catalysées par Cdk1 qui lui permettent de recruter, entre autres, Plx1. Plx1 phosphoryle alors la Thr195 de Erp1/Emi2, ainsi que deux phosphodégrons situés dans la partie N-terminale de Erp1/Emi2. Ces phosphodégrons, sont des séquences qui, lorsqu'elles sont phosphorylées, sont reconnues par l'E3 ubiquitine ligase SCF^{cdc4} (Inoue *et al.*, 2007; Bouftas *et al.*, 2022). Ceci conduit à la dégradation de Erp1/Emi2, empêchant de ce fait l'inhibition de l'APC. Cette dégradation de Erp1/Emi2 par l'intermédiaire de sa phosphorylation par Cdk1 permet à l'APC de dégrader les Cyclines et d'inactiver Cdk1 ce qui assure la sortie de la métaphase I et le passage en anaphase I. Les phosphorylations de Erp1/Emi2 ne sont pas assurées par les complexes Cdk1-Cycline B1/B2 mais par le complexe Cdk1-Cycline B3 qui présente une spécificité de substrats différente de celle des complexes incluant les Cyclines B1-B2, et notamment une affinité pour Erp1/Emi2 (Bouftas *et al.*, 2022). En opposition à ces phosphorylations déstabilisant Erp1/Emi2, se trouve Mos et plus précisément la kinase p90^{Rsk}, activée par la voie Mos. p90^{Rsk} phosphoryle les résidus 335 et 336 de Erp1/Emi2 (Inoue *et al.*, 2007). Ces phosphorylations permettent le recrutement d'une phosphatase, PP2A-B56, sur Erp1/Emi2. PP2A-B56 déphosphoryle les résidus d'Erp1/Emi2 qui avaient été phosphorylés par Cdk1-Cycline B3 et Plx1. En conséquence, la protéine Erp1/Emi2 est stabilisée et inhibe l'APC (Wu *et al.*, 2007). Cela permet l'arrêt des dégradations des Cyclines avant que l'activité de Cdk1 n'ait atteint un niveau zéro, et prévient le retour en interphase et la réplication. Ces effets

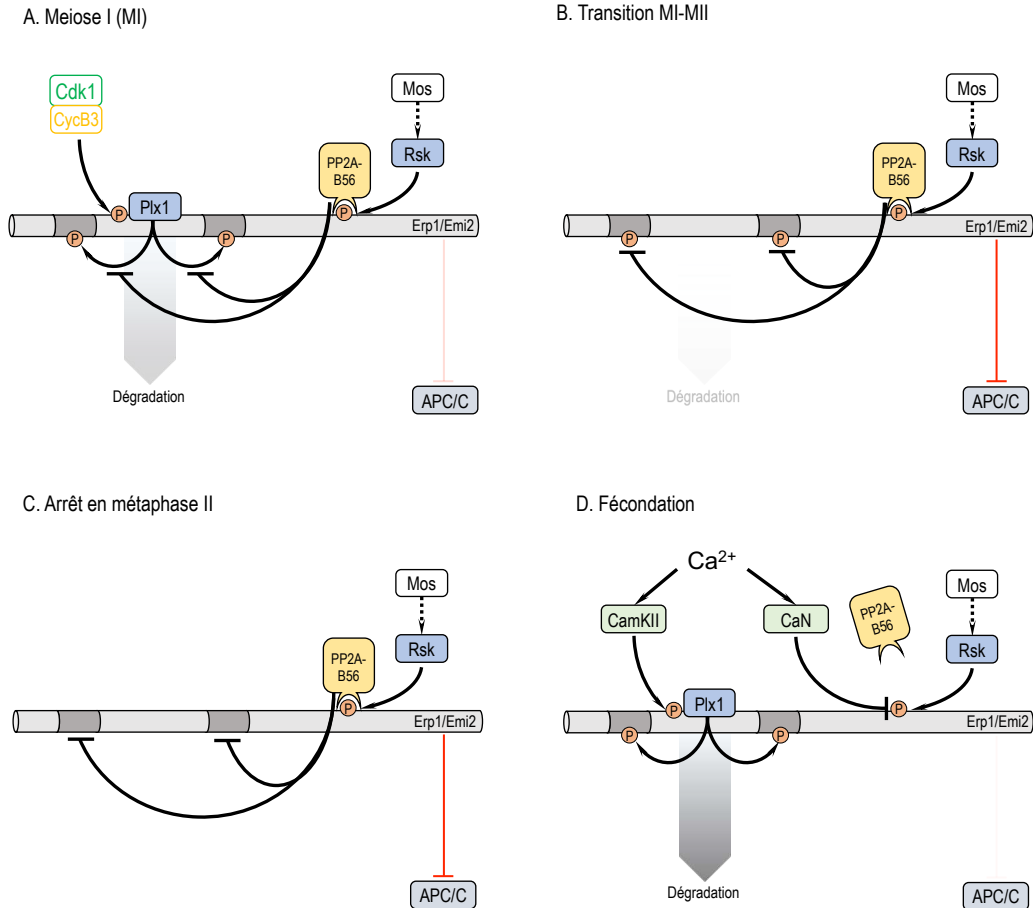


Figure 19 : Régulation de la transition MI-MII par Erp1/Emi2.

Erp1/Emi2 est un inhibiteur de l'APC/C responsable de la dégradation entre autres des Cyclines B et de l'inactivation du MPF. Erp1/Emi2 est un élément crucial du mécanisme contrôlant l'activité du MPF à la transition entre méiose I (MI) et méiose II (MII) puis lors de l'arrêt des ovocytes en métaphase II. **(A)** Durant la méiose I, la stabilité de Erp1/Emi2 est réduite. Le complexe Cdk1-Cycline B3 phosphoryle Erp1/Emi2, permettant le recrutement au niveau de cette dernière de Plx1. Plx1 se fixe à Erp1/Emi2 et phosphoryle ses phosphodégrons (parties gris foncé d'Erp1/Emi2). Ces phosphorylations permettent la dégradation de Erp1/Emi2 par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase SCF^{cdc4}. Il est à noter que durant toute la méiose, Erp1/Emi2 est aussi phosphorylé par p90^{Rsk} (Rsk sur le schéma). Ces phosphorylations permettent le recrutement de PP2A-B56 qui s'oppose aux phosphorylations des phosphodégrons par Plx1. Néanmoins, cette voie n'est pas suffisante pour stabiliser Erp1/Emi2 qui sera majoritairement dégradée durant la méiose I. Sa dégradation permet à l'APC/C de dégrader les Cyclines B et ainsi de conduire à la sortie de métaphase I et promouvoir la transition MI-MII. **(B)** Durant cette transition, la Cycline B3 est dégradée, empêchant dorénavant le recrutement de Plx1 dont les phosphorylations sont éliminées par PP2A-B56, stabilisant progressivement Erp1/Emi2. Cette stabilisation d'Erp1/Emi2 permet alors l'inhibition de l'APC/C, ce qui évite une inactivation totale du MPF qui serait à l'origine d'une entrée en phase S délétère pour la méiose. **(C)** La stabilisation d'Erp1/Emi2 est maximale lors de la méiose II, ce qui empêche les ovocytes de sortir de la métaphase II, qui constitue le second arrêt des ovocytes. L'arrêt en métaphase II sera levé par la fécondation. **(D)** La fécondation produit une libération de Ca²⁺ dans l'ovocyte permettant l'activation de deux enzymes dépendantes de cet ion : la kinase CamKII et la phosphatase calcineurine (CaN). CamKII va, comme Cdk1-Cycline B3, recruter Plx1 qui va déstabiliser Erp1/Emi2. De plus, contrairement à la situation observée en méiose I, le recrutement de PP2A-B56 par Rsk est limité par la calcineurine. L'action conjuguée de ces deux enzymes va alors réduire drastiquement la stabilité de Erp1/Emi2, qui sera alors dégradée, levant ainsi l'arrêt en métaphase II.

antagonistes entre Mos/MAPK d'une part et Cdk1-Cycline B3 d'autre part, sur un inhibiteur de l'APC, la petite protéine Erp1/Emi2, expliquent l'équilibre subtil du niveau des Cyclines B qui régit la réussite de la transition méiose I – méiose II. À noter que la dégradation des Cyclines B n'explique pas tout, et que sans leur resynthèse, l'entrée en méiose II est compromise.

4. Arrêt en métaphase II et fécondation

Chez tous les vertébrés, les ovocytes voient leur progression méiotique stoppée une seconde fois en métaphase II, avec une activité MPF élevée et stable, expliquant cet arrêt en pleine phase-M. Cet arrêt sera cette fois levé par la fécondation qui conduira à la formation d'un zygote. La compréhension des mécanismes sous-tendant ce second arrêt fit une avancée considérable lors de la découverte dans l'ovocyte de Xénope d'un facteur dit cytotatique ou CSF (*CytoStatic Factor*), facteur identifié en même temps que le MPF par Masui et Markert par l'expérience suivante : l'injection de cytoplasme d'un ovocyte arrêté en métaphase II au sein de l'un des blastomères d'un embryon au stade deux cellules conduit à l'arrêt des divisions au sein de ce blastomère (Masui and Markert, 1971a). Le blastomère injecté est arrêté en phase-M, avec un fuseau métaphase stable. En revanche, le blastomère qui n'a pas été injecté poursuit ses divisions. Ces résultats indiquent la présence dans les ovocytes arrêtés en métaphase II d'un facteur cytoplasmique responsable de cet arrêt (Masui and Markert, 1971a). Sachant que c'est le MPF qui organise l'état métaphasique, et que son inactivation provoque le passage en anaphase, l'arrêt en métaphase II serait maintenu par le CSF via une stabilisation de l'activité du MPF.

L'identité moléculaire de ce facteur resta longtemps inconnue, mais un premier élément de réponse fut apporté en 1989 avec la mise en évidence de l'effet cytotatique de la kinase Mos (Sagata *et al.*, 1989). Le cytoplasme d'ovocytes arrêtés en métaphase II perd sa capacité à bloquer la division des blastomères lorsqu'il est déplété de la protéine Mos, indiquant que la seule absence de Mos suffit à faire perdre l'activité cytotatique. Cet effet cytotatique de Mos est dépendant de l'activation de la voie des MAPK (Gross *et al.*, 2000). En effet, l'injection dans l'un des blastomères d'un embryon au stade deux cellules d'une forme constitutivement active de MAPK (thio-phosphorylée par MEK) inhibe la division de ce blastomère de la même manière que Mos (Haccard *et al.*, 1993). Des résultats identiques furent obtenus avec l'injection de formes actives de MEK et de p90^{Rsk} (Haccard *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1999). Ces travaux indiquent que la voie Mos/MAPK, en particulier son dernier maillon, la

kinase p90^{Rsk}, est responsable de l'arrêt en métaphase II (Gross *et al.*, 2000). Il fut par ailleurs observé que l'inhibition de la voie MAPK dans l'ovocyte stoppé en métaphase II par utilisation de l'inhibiteur de MEK, U0126, conduit à une réduction de la quantité de Cycline B dans l'ovocyte (Gross *et al.*, 2000). Ceci ouvrait la piste d'un lien entre le CSF et l'APC/C, logique quand on sait que le CSF doit stabiliser l'activité du MPF, c'est-à-dire empêcher la dégradation des Cyclines. Peu de temps après fut découverte la protéine XErp1, dont nous avons déjà parlé, comme étant un interacteur de Plx1 dans l'ovocyte. XErp1 appartient à la même famille que Emi1, un inhibiteur connu de l'APC/C en mitose, et fut par conséquent renommée Erp1/Emi2 (Schmidt *et al.*, 2005; Bernis *et al.*, 2007). Il fut par la même occasion démontré que comme Emi1, Erp1/Emi2 avait la même capacité d'inhibition de l'APC/C, puis, seulement deux après sa découverte, que Erp1/Emi2 était un substrat de la kinase p90^{Rsk} (Inoue *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007; Nishiyama, Ohsumi and Kishimoto, 2007). L'ensemble de ces résultats permit ainsi d'établir que la voie Mos/MAPK/p90^{Rsk}/Erp1/Emi2 constituait le CSF dont la cible était l'inhibition de l'APC/C. C'est donc la même voie qui participe à la régulation de l'activité du MPF durant la transition méiose I – méiose II. Cependant, au contraire de la méiose I, la Cycline B3 n'est plus présente en méiose II. Par conséquent le CSF ne s'oppose plus au complexe Cdk1-Cycline B3 pour contrôler la stabilisation de Erp1/Emi2. Cette dernière n'est plus phosphorylée que par p90^{Rsk} et est donc stabilisée, empêchant de ce fait toute dégradation des Cyclines B (B1 et B2) en inhibant l'APC/C, et cela jusqu'à la fécondation (**Fig. 19**).

Comment la fécondation lève-t-elle ce verrou ? Lors de la fécondation, une augmentation transitoire de Ca²⁺ dans le cytoplasme de l'ovocyte a lieu en parallèle avec la pénétration du noyau du spermatozoïde (Busa and Nuccitelli, 1985). Cette vague calcique permet l'activation d'une part de la kinase dépendante de la calmoduline II (CaMKII)(Lorca *et al.*, 1993) et d'autre part de la phosphatase appelée calcineurine (Jesus and Haccard, 2007; Mochida and Hunt, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007; Nishiyama, Ohsumi and Kishimoto, 2007). L'activation de ces deux enzymes est critique pour l'inactivation du MPF qui permettre la sortie de la métaphase II et l'achèvement de la seconde division méiotique de l'ovocyte (**Fig. 19**). En effet, la kinase CaMKII phosphoryle la Thr195 de Erp1/Emi2 ce qui a pour effet, comme précédemment écrit, de recruter Plx1 sur Erp1/Emi2. Plx1 phosphoryle alors les deux phosphodégrons de Erp1/Emi2, entraînant sa dégradation par l'E3 ubiquitine ligase SCF^{cdc4} (Liu and Maller, 2005; Rauh *et al.*, 2005; Hansen, Tung and Jackson, 2006). En parallèle, la calcineurine déphosphoryle les résidus de Erp1/Emi2 qui étaient phosphorylés par p90^{Rsk}. Cette

double phosphorylation avait pour effet de recruter la phosphatase PP2A-B56 et de protéger Erp1/Emi2 de la dégradation induite par Plx1 (Heim, Tischer and Mayer, 2018). L'action conjointe de ces deux enzymes a donc pour effet d'entraîner la dégradation de Erp1/Emi2. Plus rien ne s'oppose à la réactivation de l'APC/C excepté la phosphorylation inhibitrice de son adaptateur Cdc20. Mais ce dernier est lui aussi déphosphorylé par la calcineurine (Heim, Tischer and Mayer, 2018). Ainsi en réponse à l'augmentation du taux de Ca^{2+} dans l'ovocyte induite par la fécondation, l'APC est réactivé en quelques minutes, ce qui conduit à une dégradation rapide des Cyclines B, et à l'inactivation du MPF en une dizaine de minutes (**Fig. 19**). Notons que la voie Mos/MAPK s'éteint elle-aussi car Mos est dégradé, mais avec une cinétique beaucoup plus lente (45 minutes) que celle de la disparition du MPF. Ce dernier étant inactivé, la seconde division méiotique peut s'achever avec l'émission du second globule polaire, puis un pronucléus femelle se forme alors que le noyau du spermatozoïde se transforme en pronucléus mâle. La fusion des pronuclei produit une nouvelle cellule diploïde, le zygote.

E. La voie PP2A-B55δ/Greatwall/ARPP19, un nouveau niveau de régulation du MPF

1. La phosphatase PP2A-B55δ un inhibiteur du MPF connu de longue date

Avant même la découverte de l'identité moléculaire du MPF, Cyert *et al* mirent en évidence l'existence du pré-MPF ainsi que de son inhibiteur INH. Lors de tentatives de purification du MPF, ils séparèrent en effet le pré-MPF d'un inhibiteur de son activation, appelé INH : en l'absence d'INH, le pré-MPF est capable de s'activer et ce, sans ajout de MPF actif (Cyert and Kirschner, 1988). L'activation du pré-MPF en l'absence de MPF actif indique que INH joue un rôle inhibiteur de la boucle d'auto-amplification. Peu de temps après cette découverte, l'identité du MPF fut révélée, de même que celle de INH qui n'est autre que la phosphatase PP2A (Lee *et al.*, 1991). L'inhibition du MPF par PP2A est le fruit de son activité phosphatasique. PP2A déphosphoryle de nombreux substrats du MPF et nous avons vu que parmi eux figurent les propres régulateurs de Cdk1, Cdc25 et Myt1/Wee1. PP2A est donc à la fois un inhibiteur de l'activation du MPF et un antagoniste de ce complexe lorsqu'il est actif (Ferrigno, Langan and Cohen, 1993). En effet, l'inhibition de PP2A par l'injection d'acide okadaïque (un inhibiteur des phosphatases PP2A et PP1 possédant une affinité bien plus forte pour la première que pour la

seconde) dans des ovocytes de Xénope est suffisante pour induire la maturation (Goris *et al.*, 1989).

PP2A est une holoenzyme constituée de trois sous-unités, une sous-unité catalytique (C), une sous-unité régulatrice (B) et une dernière sous-unité (A) dite « d'échafaudage » servant à l'assemblage des deux autres. Il existe deux isoformes de C (α et β), et deux isoformes de A (α et β). La sous-unité B détermine le type de substrat et/ou la localisation intracellulaire de la phosphatase (Lemonnier, Dupré and Jessus, 2020; Lacroix, Lorca and Castro, 2022). Il existe de très nombreuses sous-unités B, qui sont réparties en quatre familles (B ou B55/PR55, B' ou B56/PR56, B'' ou PR48/PR72/PR130 et B''' ou PR93/PR110/Striatins). Ceci porte le nombre de combinaisons possibles entre les trois sous-unités à plus de 90 (Janssens, Longin and Goris, 2008). L'identité exacte de l'holoenzyme impliquée dans l'inhibition du MPF mit de nombreuses années à être découverte. Des travaux menés chez *Drosophila melanogaster* et *S. cerevisiae* ont permis de révéler son identité. En effet, chez *Drosophila*, il fut mis en évidence que la mutation de la sous-unité régulatrice B55 (mutant *arr* ou *twins*) provoque une réduction de la déphosphorylation par PP2A des substrats de Cdk1 (Mayer-Jaekel *et al.*, 1993, 1994). Chez la levure bourgeonnante, il fut montré que la sous-unité B55 (Cdc55) était responsable de la régulation de PP2A durant la sortie de la mitose (Minshull *et al.*, 1996; Queralt *et al.*, 2006). Ces résultats laissaient penser que la forme de PP2A comprenant la sous-unité régulatrice B55 était l'holoenzyme responsable de l'inhibition du MPF. Ceci fut confirmé chez le Xénope par l'équipe de Tim Hunt à partir d'extraits d'ovocytes, un travail de biochimie définissant précisément la composition de l'holoenzyme antagoniste du MPF par des expériences de déplétion (Mochida *et al.*, 2009). La phosphatase PP2A-B55 δ (B55 existe elle-même sous-différentes isoformes, α , β , γ et δ) est l'antagoniste majeur du MPF. Cette phosphatase déphosphoryle de nombreux substrats de Cdk1. Parmi eux, certains sont directement impliqués dans la boucle d'auto-amplification comme Cdc25 (Izumi, Walker and Maller, 1992; Karaïskou *et al.*, 1999). D'autres sont impliqués dans les processus de la division méiotique ou mitotique qu'orchestre le MPF, tel que Aurora A, PRC1 et bien d'autres (Maton *et al.*, 2005; Cundell *et al.*, 2016).

2. Inhibition de la phosphatase PP2A-B55 δ

L'inhibition de PP2A-B55 δ est par conséquent un enjeu crucial pour la reprise de la division. Néanmoins, le mécanisme permettant cette inhibition n'a été mis en évidence que

récemment. Une première avancée dans la compréhension de ce processus est venue de la découverte de la kinase Greatwall (Gwl)(Yu *et al.*, 2004). La mutation du gène *gwl* chez *Drosophila* impacte fortement la capacité mitotique des neuroblastes larvaires. Une grande majorité de ces cellules mutées est bloquée à l'entrée de la mitose, en phase G2/prophase. De plus, la fraction de cellules ayant réussi à entrer en phase M malgré la mutation *gwl* voit sa progression mitotique stoppée en métaphase, en raison d'une compaction insuffisante des chromosomes qui ne satisfait pas le SAC. Ces résultats indiquent que la protéine codée par le gène *gwl*, qui est une protéine kinase, joue un rôle dans l'entrée (transition G2/M) et la progression en mitose (Yu *et al.*, 2004). Ceci fut confirmé par des études réalisées dans des extraits cyclants issus d'ovocytes de Xénope. Ces extraits présentent la capacité de cycler, c'est-à-dire qu'*in vitro* ces extraits alternent des évènements cytologiques (compaction des chromosomes, noyaux, fuseaux de division) et biochimiques (activité de Cdk1, dégradation des cyclines, duplication de l'ADN) caractéristiques des phases M et S, reproduisant l'alternance d'activation et d'inactivation du MPF au cours de la mitose. Cette formidable propriété permet d'étudier l'effet de la présence ou de l'absence de protéines, comme par exemple Gwl, sur l'activation ou l'inactivation du MPF. La déplétion de Gwl dans ces extraits provoque l'inactivation du MPF et une sortie prématurée de la phase M concomitante avec la déphosphorylation de nombreux substrats du MPF (Yu *et al.*, 2006). Par ailleurs, la déplétion de Gwl empêche l'entrée en phase M et donc l'activation du MPF dans ces extraits, de façon similaire à ce qui est observé chez la drosophile (Yu *et al.*, 2006). Des phénotypes analogues ont été observés dans des lignées cellulaires, humaines ou murines (Gwl est l'homologue de la kinase Mastl pour *Microtubule-Associated Serine/Threonine-protein kinase-Like*, chez les mammifères)(Voets and Wolthuis, 2010). Gwl semble donc à la fois importante pour l'activation du MPF mais aussi pour son maintien sous forme active durant la phase M (Yu *et al.*, 2006).

A l'aune de ces résultats, et avec l'observation que l'activité kinasique de Gwl dépendait de l'activité du MPF lui-même (Yu *et al.*, 2006), il fut envisagé que la kinase codée par le gène *gwl* pourrait intervenir de façon similaire à Plx1, dans le mécanisme d'auto-amplification du MPF. Une hypothèse envisagée était que Gwl participe à l'inhibition de la kinase Wee1 ou son pendant Myt1. Cependant, lorsque ces deux kinases et Gwl sont déplétés des extraits, il se produit toujours une inactivation du MPF couplée à une déphosphorylation massive de ses substrats (Vigneron *et al.*, 2009). Ceci indique que le rôle de la kinase Gwl ne passe pas par

l'inhibition des kinases inhibitrices du MPF. A l'inverse, Gwl pourrait participer à l'activation de la phosphatase activatrice du MPF, Cdc25. Comme nous l'avons vu, plusieurs kinases participent à cette activation dans l'ovocyte de Xénope, Cdk1 elle-même, mais aussi Plx1 et Mos via la voie des MAPK (Karaiskou *et al.*, 1999). Et en effet, l'absence de Gwl empêche l'activation de Cdc25, indiquant l'implication de cette kinase dans la régulation de l'activité de Cdc25 (Zhao *et al.*, 2008). Mais l'activation de Cdc25 est également empêchée par une inhibition de Cdk1 (Zhao *et al.*, 2008). Il semble que Gwl ne phosphoryle pas directement Cdc25 mais soit importante pour que les kinases qui la phosphorylent (Cdk1, Plx1, Mos/MAPK et autres) puissent correctement activer Cdc25 (Zhao *et al.*, 2008). Ce rôle indirect dans la phosphorylation et l'activation de Cdc25 semble inclus dans une fonction beaucoup plus large de Gwl. En effet, sa déplétion cause systématiquement la déphosphorylation d'un très grand nombre de substrats du MPF (Zhao *et al.*, 2008; Vigneron *et al.*, 2009). Ces substrats étant des cibles de la phosphatase PP2A-B55δ, il fut donc envisagé que Gwl serait une kinase capable de réduire l'activité de la phosphatase antagoniste du MPF. L'un des premiers éléments en faveur de cette hypothèse fut que l'injection d'une forme active de Gwl (mutation K71M) induisait la maturation des ovocytes de Xénope de manière similaire à l'inhibition de PP2A par injection d'acide okadaïque (Yamamoto *et al.*, 2011). Il fut ensuite montré que les effets de la déplétion de Gwl dans les extraits cyclants étaient fortement réduits lorsque PP2A-B55δ était elle-aussi déplétée (Zhao *et al.*, 2008). En outre, l'inhibition de PP2A via l'utilisation de deux de ses inhibiteurs, l'acide okadaïque ou la microcystine, permet de restaurer l'activité du MPF dans des extraits cyclants déplétés en Gwl (Vigneron *et al.*, 2009). Ces résultats renforcèrent l'idée de la nécessité d'inhiber PP2A-B55δ pour entrer en phase M mais surtout permirent de lancer l'hypothèse que cette inhibition était le fruit de l'activité de la kinase Gwl. Plusieurs questions se posèrent alors : Par quel mécanisme la kinase Gwl est-elle activée ? Par quel mécanisme est-elle capable d'inhiber PP2A-B55δ ?

L'activation de Gwl est cruciale pour permettre l'entrée en phase M et le maintien de l'activité du MPF tout au long de cette dernière. Son activité est en accord avec cette fonction : elle est basse pendant les phases G1-S-G2 du cycle cellulaire et forte en phase M (Voets and Wolthuis, 2010; Hara *et al.*, 2012). Plusieurs études ont porté sur la régulation biochimique de cette activité. La kinase Gwl présente la particularité de posséder un site catalytique interrompu par une séquence d'acides aminés répétés, dont on s'attendrait à ce qu'elle interdise l'activité catalytique, ce qui n'est pas le cas. L'une des hypothèses est que la kinase

agisse sous forme d'homo-dimère ou de dimère avec une autre kinase de la famille AGC, ce qui permet de reconstituer un site catalytique fonctionnel (Yu *et al.*, 2004; Vigneron *et al.*, 2011). Son activité requiert plusieurs phosphorylations de manière séquentielle. Dans un premier temps, deux résidus de Gwl sont phosphorylés, les Thr193 et Thr206 (chez le Xénope, Thr194 et 207 chez l'humain), localisés dans le domaine catalytique (Vigneron *et al.*, 2011; Blake-Hodek *et al.*, 2012). Ces deux phosphorylations sont dues à une seule et même kinase, Cdk1. La découverte de ces phosphorylations par le MPF a permis de confirmer le positionnement de Gwl dans la boucle d'auto-amplification du MPF. La phosphorylation de ces résidus ne permet pas d'activer pleinement Gwl mais sont essentielles car elles lui confèrent la capacité de s'autophosphoryler sur la Ser883 située dans le domaine C-terminal (Vigneron *et al.*, 2011; Blake-Hodek *et al.*, 2012). Gwl devient alors pleinement active ce qui conduit à l'inhibition de PP2A-B55δ. Notons que d'autres sites de phosphorylation ont été rapportés et pourraient participer à l'activation de Gwl, mais la kinase responsable de ces phosphorylations n'est pas connue (Della Monica *et al.*, 2015). En sortie de phase M, la Ser883 de Gwl est déphosphorylée par la phosphatase PP1, qui était jusqu'alors inactivée par le MPF (Heim, Konietzny and Mayer, 2015; Ma *et al.*, 2016; Rogers *et al.*, 2016) En parallèle, la réactivation de PP2A-B55δ conduit à la déphosphorylation des deux thréonines phosphorylées par le MPF, inactivant de ce fait Gwl et ce, jusqu'à la réactivation du MPF lors de la phase M suivante (Heim, Konietzny and Mayer, 2015). Signalons aussi que la localisation intracellulaire de Gwl participe à sa régulation. Nucléaire pendant les phases du cycle où il est inactif, sa relocalisation dans le cytoplasme en début de prophase est essentielle à la fonction qu'il joue en mitose (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014).

3. Inhibition de la phosphatase PP2A-B55δ : découverte de ARPP19/ENSA

Le mécanisme qui permet à Gwl d'inhiber PP2A-B55δ fit l'objet d'une intense recherche. Des premiers résultats mirent en évidence une interaction directe entre la phosphatase et la kinase (Vigneron *et al.*, 2009). Ceci lançait l'hypothèse d'une inactivation de PP2A-B55 par une phosphorylation directe catalysée par Gwl. Néanmoins, seulement un an après, cette hypothèse fut invalidée par les travaux de deux équipes qui identifièrent les seuls substrats connus de Gwl à ce jour. Il s'agit des deux protéines ARPP19 (pour *cAMP-Regulated PhosphoProtein of 19 kDa*) et ENSA (pour *ENdoSulfine Alpha*) (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Comme nous l'avons vu précédemment, ARPP19 a aussi été identifiée

comme l'un des seuls substrats connus de PKA impliqué dans l'arrêt en prophase de l'ovocyte de Xénope (Dupré *et al.*, 2014a). Ces deux protéines appartiennent à une même famille protéique, celle des endosulfines. Leurs séquences sont extrêmement proches et il est très difficile de discriminer les deux protéines par des anticorps. Elles sont souvent exprimées toutes deux dans les cellules, à des niveaux parfois différents. Ainsi, ENSA serait présente en plus grande quantité qu'ARPP19 dans les ovocytes de Xénope, ce qui reste néanmoins à confirmer (Mochida *et al.*, 2010; Cundell *et al.*, 2013). Dans les ovocytes de porc, seule ARPP19 est exprimée (Li *et al.*, 2013). Leurs fonctions apparaissent redondantes et les effets de la déplétion ou de la surexpression de l'une ou de l'autre sont similaires. Notons cependant que dans des lignées de cellules MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) et lors du développement embryonnaire de la souris, c'est ARPP19 et non ENSA qui porte le rôle essentiel de contrôle de la division mitotique (Hached *et al.*, 2019). Sauf exception, dans le reste de l'exposé, je ne ferai pas la distinction entre ces deux protéines. Chacune présente un site unique de phosphorylation par Gwl, extrêmement conservé chez l'ensemble des eucaryotes et qui peut servir de signature de cette famille. Ce site, FDSGD/AY contient une sérine, la Ser67 chez le Xénope, qui est le résidu phosphorylé par Gwl (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Cette phosphorylation n'est pratiquement retrouvée qu'en phase M, faisant de ces deux substrats de Greatwall d'excellents candidats impliqués dans l'inhibition de PP2A-B55 lors de la division de la cellule (notons néanmoins que des interactions antagonistes entre PKA et Mastl/Gwl contrôlent ARPP16 (une forme tronquée d'ARPP19 de 16 acides aminés en N-terminal) dans les neurones post-mitotiques (Nikalayevich *et al.*, 2022)(Musante *et al.*, 2017)). De nombreux résultats ont étayé cette hypothèse. Tout d'abord, la déplétion d'ENSA ou d'ARPP19 provoque des effets délétères sur la capacité des extraits acellulaires à cycliser (Mochida *et al.*, 2010). L'absence d'ENSA entraîne une perte totale de l'alternance d'activation et d'inactivation du MPF. A l'inverse, l'ajout au sein d'extraits interphasiques d'ARPP19 ou bien d'ENSA phosphorylé par Gwl induit l'activation du MPF et ce même en l'absence de Cdc25 (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). Ceci indique que comme Gwl ou comme l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque, ARPP19 et ENSA activent le MPF indépendamment de Cdc25, laissant penser qu'ils sont les médiateurs de l'inhibition de PP2A-B55 par Gwl. Et en effet, chacune de ces deux protéines est capable d'inhiber de manière efficace et spécifique l'holoenzyme PP2A-B55. Par ailleurs, la phosphorylation de chacune de ces deux protéines par Gwl conduit à leur liaison à PP2A-B55 (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Cette interaction repose que le


fait que la Ser67 phosphorylée d'ENSA et d'ARPP19 est un substrat de PP2A-B55. La phosphorylation de ce résidu rend ENSA et ARPP19 très affins pour la phosphatase. PP2A est une serine/thréonine phosphatase qui peut par conséquent prendre en charge la déphosphorylation des deux types de résidus. Cependant, l'holoenzyme PP2A-B55 a une affinité supérieure pour les thréonines et déphosphoryle plus difficilement les sérines (Cundell *et al.*, 2016). Ainsi, les formes phosphorylées sur Ser67 d'ARPP19 et ENSA étant extrêmement affines pour PP2A-B55, elles sont prises en charge par cette dernière. Mais une fois liées à la phosphatase, la réaction de déphosphorylation d'une sérine étant nettement plus lente que celle d'une thréonine, PP2A-B55 se retrouve piégé avec ce substrat et ne peut ni fixer ni déphosphoryler ses autres cibles, les substrats du MPF (Williams *et al.*, 2014). Ainsi dans les extraits cyclants, ARPP19 et ENSA sont les instruments directs de l'inhibition de la phosphatase antagoniste du MPF. Plusieurs études ont montré que ce rôle est conservé dans bien d'autres modèles eucaryotes, levure, plantes, invertébrés et vertébrés (Castro and Lorca, 2018). Il est également conservé lors des divisions méiotiques, notamment dans les ovocytes de Xénope où la phosphorylation d'ARPP19 par Gwl est l'un des événements essentiels de la reprise de la méiose (Dupre *et al.*, 2013). L'injection d'une forme d'ARPP19 thiophosphorylée (la thiophosphorylation est relativement résistante aux phosphatases, reproduisant une phosphorylation constitutive) sur la sérine 67 induit la maturation des ovocytes. Au contraire, une forme non-phosphorylable d'ARPP19 (mutation S67A) a un effet dominant négatif et inhibe la reprise de la méiose en présence de progestérone. Comme dans les extraits acellulaires, ARPP19 phosphorylé par Gwl se lie spécifiquement à la phosphatase PP2A-B55 et entraîne son inhibition (Dupre *et al.*, 2013). Ce rôle essentiel d'ARPP19 pour l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope est en opposition avec le rôle qu'il joue dans l'arrêt en prophase lorsqu'il est phosphorylé par PKA.

Lors de ma thèse, je me suis intéressé à ces deux rôles joués successivement par ARPP19 et qui permettent un enchaînement correct des événements biochimiques menant à l'activation du MPF en réponse à la progestérone (**Fig. 1**). J'ai d'une part étudié leur conservation chez deux métazoaires très éloignés phylogénétiquement et ayant sélectionné de façon opposée le verrou AMPc-PKA pour l'arrêt en prophase et la reprise de la méiose de l'ovocyte, la méduse *Clytia hemisphaerica* et l'amphibien *Xenopus laevis*. Dans l'ovocyte de la première, le MPF est activé en réponse à une augmentation de l'activité de PKA, une situation opposée à ce qui se passe dans les ovocytes du second. D'autre part, je me suis intéressé aux

interconnexions qui peuvent coordonner les deux rôles d'ARPP19, rôles sous-tendus par sa phosphorylation par PKA et Gwl et sa déphosphorylation par PP2A-B55δ.

Review

Translational Control of *Xenopus* Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era

Ferdinand Meneau, Aude Dupré, Catherine Jessus and Enrico Maria Daldello * 

Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement—Institut de Biologie Paris Seine, LBD—IBPS, F-75005 Paris, France; ferdinand.meneau@etu.upmc.fr (F.M.); aude-isabelle.dupre@upmc.fr (A.D.); catherine.jessus@upmc.fr (C.J.)

* Correspondence: enricomaria.daldello@gmail.com

Received: 29 April 2020; Accepted: 17 June 2020; Published: 19 June 2020



Abstract: The study of oocytes has made enormous contributions to the understanding of the G₂/M transition. The complementarity of investigations carried out on various model organisms has led to the identification of the M-phase promoting factor (MPF) and to unravel the basis of cell cycle regulation. Thanks to the power of biochemical approaches offered by frog oocytes, this model has allowed to identify the core signaling components involved in the regulation of M-phase. A central emerging layer of regulation of cell division regards protein translation. Oocytes are a unique model to tackle this question as they accumulate large quantities of dormant mRNAs to be used during meiosis resumption and progression, as well as the cell divisions during early embryogenesis. Since these events occur in the absence of transcription, they require cascades of successive unmasking, translation, and discarding of these mRNAs, implying a fine regulation of the timing of specific translation. In the last years, the *Xenopus* genome has been sequenced and annotated, enabling the development of omics techniques in this model and starting its transition into the genomic era. This review has critically described how the different phases of meiosis are orchestrated by changes in gene expression. The physiological states of the oocyte have been described together with the molecular mechanisms that control the critical transitions during meiosis progression, highlighting the connection between translation control and meiosis dynamics.

Keywords: *Xenopus* oocytes; meiotic maturation; translation; mRNA polyadenylation

1. Introduction

Meiosis is a specialized cell division that is essential for sexual reproduction in eukaryotes as it allows germ cells to reduce by half their ploidy. This process relies on the synthesis of mRNAs whose timely translation and/or degradation drives the differentiation of the oocyte into a fertilizable egg. These stockpiled mRNAs and proteins regulate processes beyond meiosis, such as the binding of a single sperm to the oocyte or the fusion of the maternal and paternal genomes after fertilization. Additionally, some of them are inherited by the embryo as maternal mRNA. The proteins derived from these mRNAs are used in the embryo as a source of energy, but also to define the basic embryonic axis formation, while others are critical cell cycle regulators of the first embryonic cell cycle, as well as the transcription machinery necessary for the expression of the embryonic genome.

During oogenesis, female germ stem cells, or oogonia, proliferate by mitosis. After a long premeiotic S-phase, oogonia become oocytes and enter in prophase of the 1st meiotic division (prophase I). This long-lasting arrest (months to years depending on vertebrate species) is conserved in all the animal kingdom (Figure 1). It allows oocytes to accumulate RNAs, proteins, organelles, and nutrients required for meiosis and embryonic development. At the end of this growth phase, and in response to hormonal stimulation, oocytes undergo the last step of oogenesis, meiotic maturation, which consists of two

consecutive divisions in the absence of DNA replication. In the vertebrates, oocytes arrest again at metaphase of the 2nd meiotic division, awaiting fertilization (Figure 1).

As in mitosis, meiotic maturation is regulated by the post-translational modifications of proteins, like phosphorylation and the translation of mRNAs. Reversible phosphorylation results from kinases and phosphatases activities, whose regulation is governed by the universal inducer of cell division, the M-phase promoting factor (MPF). MPF consists of a complex between Cyclin-dependent-kinase 1 (Cdk1) and its regulative subunit—the Cyclin B [1,2]. In prophase, MPF is indirectly kept inactive because of the high concentration of cAMP and the activity of protein kinase A (PKA) in vertebrates [3,4]. The hormonal stimulation induces a drop of cAMP level and PKA inactivation [3,4], which, in turn, signals the oocyte to resume meiosis. Meiosis resumption is thus equivalent to the G₂/M transition of the mitotic cell cycle. In this model system, MPF activation obeys a two-step mechanism [5]. First, a small amount of active MPF is formed. While the biological events leading to the initial activation of MPF are not completely clear, de novo protein translation is required in most vertebrates, with the exception of small rodents [6]. This starting amount of active MPF initiates positive and negative feedbacks, named the MPF auto-amplification, ending with full MPF activation [5]. Fully active Cdk1 then promotes structural events of cell division, starting with the nuclear envelope breakdown (NEBD). Following chromosomes aligning on the metaphase I plate, oocytes transition to anaphase I and extrudes the first polar body. They then assemble quickly a second metaphase spindle and arrests in metaphase II. The second regulatory mechanism of meiotic maturation is the control of gene expression, which mostly relies on translation and mRNA turnover, as transcription is silent, with the exception of some foci identified in mouse [7]. Importantly, changes in gene expression occur and regulate meiosis resumption and progression by targeting mRNAs that have accumulated during early oogenesis. They shape the proteome of the oocyte by modulating mRNA stability (transcriptome), the degree of mRNA translation (translatome), and protein stability. Previous studies have identified two main changes in the gene expression program of the oocyte: the “early” wave of translation occurring downstream of the hormonal stimulation and a “late” wave occurring after NEBD. Among proteins synthesized during meiosis, three classes can be defined: Class I corresponds to a sub-group of the early translated proteins involved in MPF activation, Class II is involved in meiosis progression, and Class III is required for the embryo development (Table 1).

Table 1. Temporal and functional classification of proteins during meiosis. Summary of the known proteins that accumulate during meiosis before (early) or after (late) NEBD. Class I proteins are involved in Cdk1 activation. Class II proteins are important for meiosis progression, and Class III proteins support embryo development.

Protein	Time of Translation	Classification
Speedy/RINGO	?	Class I [8,9]
Mos	Early	Class I [10–15]
Cyclin B1		Class I [5,16]
Xkid	Late	Class II [17]
CPEB4		Class II [18]
Bub1		Class II [19]
Erp1/Emi2		Class II [20]
TPX2		Class II [21]
Cdc6	Late	Class III [22–24]
Wee1		Class III [25]
Cdt1		Class III [26]
Cyclin E1		Class III [27]
Zfp3612		? [28]
Drosha		? [29]
Lamin L1	?	Class III [30]

Xkid: Xenopus kinesin-like DNA binding protein, CPEB4: CPE-binding protein 4, TPX2: targeting protein for Xklp2, and Zfp3612: Zinc Finger Protein 36 C3H1 Type-Like 2.

The oocyte is a powerful experimental system to study how translation initiation and termination are regulated during cell division. Historically, the *Xenopus* oocytes have been an excellent model to biochemically characterize the cellular mechanisms governing meiosis progression. Recently, omics datasets became available. This review has described the current knowledge of the molecular mechanisms responsible for the genome-wide changes in gene expression occurring during vertebrate meiosis, relying on the *Xenopus* model system. The regulation of gene expression allows the achievement of four major sequential steps that orchestrate oogenesis: the oocyte growth phase, the arrest of the fully-grown oocyte, meiosis resumption, from the hormonal stimulation to NEBD, and finally meiosis progression from NEBD to the metaphase II arrest.

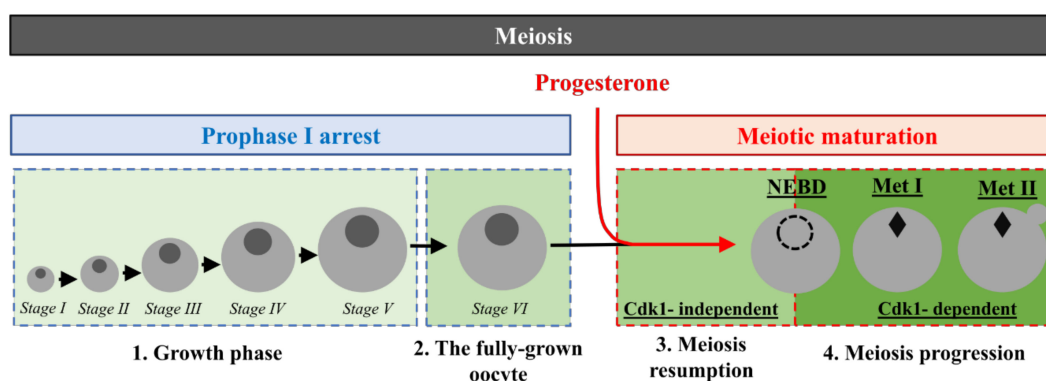


Figure 1. Four phases of *Xenopus* oocyte meiosis. (1) The growth period: Oocytes enter prophase of the first meiotic division and arrest at the diplotene stage (Prophase I). Growing oocytes have been classified into six stages by Dumont [31]. (2) The fully-grown oocyte: when oocyte growth is complete, transcription and vitellogenesis stop, and oocytes become competent to undergo meiotic maturation. (3) Meiosis resumption: Progesterone releases the prophase arrest and oocytes resume meiosis. (4) Meiosis progression: Following nuclear envelope breakdown (NEBD), oocytes assemble the metaphase I (Met I) spindle. After anaphase I, the first polar body is extruded, and a metaphase II (Met II) spindle assembles.

2. The Early Oogenesis, a Growth Period That Sets the Stage for Meiosis Resumption

During the early phases of oogenesis, transcription is highly active. *Xenopus* oocytes undergo extensive growth (from 50 μm to 1.2 mm) and accumulate RNAs (mRNAs, rRNAs, tRNAs), organelles, nutrients, and proteins. Some of them are synthesized by the oocyte, while others are up-taken from the bloodstream [32]. Once pre-mRNAs are transcribed, the cleavage and polyadenylation specific factor (CPSF) recognizes the polyadenylation signal (PAS: AAU₁₋₂AAA) in 3'UTR (3'untranslated region), cleaves the pre-mRNA, and adds a long poly(A) tail [33]. After capping and splicing, mRNAs are exported to the cytoplasm where they are either translated or stockpiled for later translation during either meiotic maturation or the embryo development. The stable but non-translated mRNAs undergo de-adenylation [32,34]. The molecular composition of the complexes inhibiting their translation is still debated (reviewed in [35,36]).

Analysis of the published atlas reveals that extensive changes take place in the transcriptome during *Xenopus* oogenesis [37]. The level of 1557 transcripts increases more than 4-fold in oocytes, while the level of only 17 transcripts moderately decreases during this temporal window (Figure 2A). Gene ontology analysis reveals upregulation of transcription of genes involved in endocytosis (Figure 2B). Among these transcripts is the mRNA coding the vitellogenin receptor (very low-density lipoprotein receptor, VLDLR), whose expression increases around five times. In oocyte, VLDLR plays an essential role in the uptake of vitellogenin that is synthesized by the liver, released in the blood circulation, incorporated into the oocyte by endocytosis, and cleaved in the oocyte into yolk proteins, providing the nutrients for early embryos [38]. The oocyte extensive phase of growth is also accompanied

by increased transcription of mRNAs involved in cell biogenesis and M-phase machinery (Figure 2B). Hence, the functions associated with these increased transcripts are correlated either with the growth of the oocyte or with its future activities—the meiotic and embryonic divisions. Importantly, although the meiotic cycle is arrested at diplotene of prophase I in all stages of oocyte growth, only large stage V and fully-grown stage VI oocytes are responsive to progesterone, which initiates the maturation process when physiological and environmental conditions are favorable [39] (Figure 1). The unresponsiveness of small oocytes prevents premature meiotic maturation, hence avoiding the production of haploid and fertilizable oocytes of insufficient size. In stage IV oocytes, the MPF auto-amplification loop is not functional because polo-like kinase 1 (Plk1) is not expressed at the protein level despite the presence of its mRNA [40]. Indeed, Plk1 protein accumulates between stages V and VI, when oocytes become competent to resume meiosis. These results suggest that translation during early oogenesis is temporally regulated, and the machinery required for meiosis progression is acquired progressively during oogenesis.

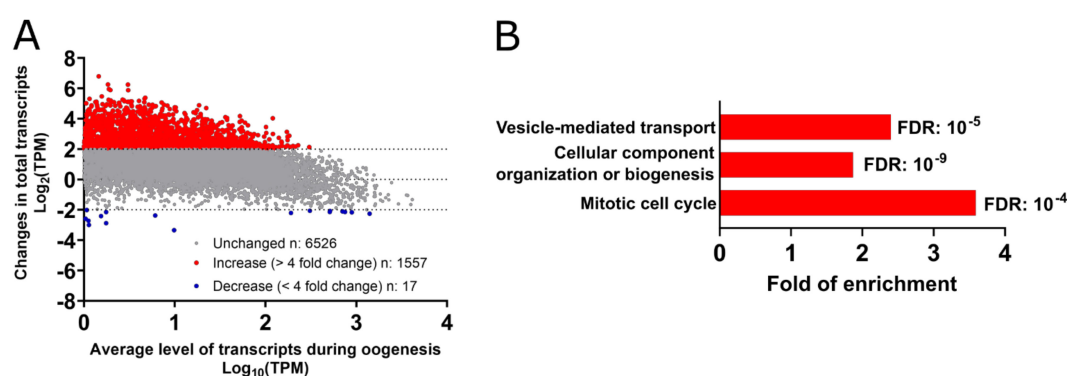


Figure 2. Changes in the total mRNA level during the growth period. (A) Changes in mRNA levels between stages I–II (starting of the growth period) and stages V–VI (end of the growth period) have been plotted. (B) Selection of the gene ontology terms enriched among the 1557 transcripts whose levels increase during the growth period.

Obtaining the transcriptome of growing oocytes will help to globally sort mRNAs that are transcribed and translated immediately from the ones that are transcribed and stored for future usage. Furthermore, this will help to explore the molecular mechanisms behind the oocyte genome silencing, the spatial polarization of oocytes, and the acquisition of the competence to resume meiosis.

3. The Prophase-Arrest of Fully-Grown Oocytes Competent to Resume Meiosis

3.1. The Interplay between PKA and Protein Synthesis

It is well established that the prophase arrest of fully-grown vertebrate oocytes is maintained by high levels of cAMP and activity of the cAMP-dependent kinase (PKA) [41–43]. In *Xenopus* oocytes, the constitutively active G α s-protein coupled receptor 185 (GPR185) results in high adenylate cyclase activity that maintains the high levels of cAMP [44]. Upon hormonal stimulation, the cAMP concentration drops, inducing PKA inactivation in less than one hour [42,45]. However, the ability of progesterone or the PKA-inhibitor (PKI) to induce meiosis resumption is abolished if the translation is inhibited by protein synthesis inhibitors, such as cycloheximide [45,46], suggesting that, during the prophase arrest, PKA prevents the synthesis of crucial proteins required for meiosis resumption.

3.2. The Substrates of PKA Mediating the Prophase Arrest

Little is known regarding the identity of the PKA substrates that lock oocytes in prophase. In *Xenopus* oocytes, the first ones reported corresponding to two proteins called MpP-20 (Maturation phospho-protein

20 kDa) and MpP-32 (32 kDa) [47]. The identity of MpP-20 was uncovered as Arpp19 (cAMP-regulated phosphoprotein), a protein that belongs to the Endosulfine family [48]. In prophase-arrested oocytes, PKA phosphorylates Arpp19 at S109 within a PKA consensus site well-conserved among eukaryotes. Under this phosphorylated state, Arpp19 blocks meiosis resumption [49]. Arpp19 phosphorylation at S109 results from an equilibrium between PKA and a recently identified phosphatase, PP2A-B55 δ [50]. In prophase-arrested fully-grown oocytes, the action of PP2A-B55 δ on Arpp19 is overwhelmed by PKA activity, resulting in Arpp19 phosphorylation at S109. In response to progesterone or PKI injection, PKA activity decreases, allowing PP2A-B55 δ to efficiently dephosphorylate Arpp19 [49–51]. This event is critical for meiosis resumption as the overexpression of a phosphomimic mutant form of Arpp19 (S109D) impairs Cdk1 activation induced by either progesterone or PKI [49]. This initial function of Arpp19 as a PKA substrate is fully distinct from the second one operating at the time of MPF activation when Arpp19 becomes phosphorylated at a distinct site (S67) by the kinase Greatwall [52–54]. The mechanism by which PKA-phosphorylated Arpp19 inhibits Cdk1 activation has not been yet elucidated. An attractive hypothesis is that Arpp19 regulates the synthesis of proteins required for MPF activation, which relies on PKA downregulation. Interestingly, the yeast homolog of Arpp19 has been involved in RNA metabolism [55]. The identity of MpP-32 has not been solved. However, it has been proposed that MpP-32 corresponds to DARPP32 (Dopamine And CAMP-Regulated Neuronal Phosphoprotein 32), another member of the cAMP-regulated phosphoprotein family [47]. When phosphorylated by PKA, DARPP32 is a strong inhibitor of the S/T protein phosphatase-1 (PP1) [56–59]. Since PP1 activity is essential for meiosis resumption [60,61], the inhibition of PP1 by PKA-phosphorylated DARPP32 could contribute to the prophase arrest. Beside DARPP32, other specific inhibitors of PP1 are also regulated by PKA, such as inhibitor-1 that is able to prevent meiosis resumption [45]. Hence, a more in-depth investigation of the interplay between PKA and PP1 could give some hints regarding how oocytes are arrested in prophase. Two direct regulators of Cdk1—the phosphatase Cdc25 and its opposing kinase Wee1B—have been proposed as PKA substrates in oocytes [62–64]. In prophase-arrested oocytes, Cdc25 is phosphorylated at S287 by PKA, hence promoting its sequestration in the cytoplasm through the recruitment of 14-3-3 protein [65]. During meiosis resumption, Cdc25 is dephosphorylated at S287, but this event depends on protein synthesis and is only observed at the time of Cdk1 activation, i.e., several hours after PKA downregulation [63]. Therefore, Cdc25 unlikely corresponds to the missing link between PKA and protein synthesis. In mouse oocytes, Wee1B is phosphorylated by PKA at S15 and contributes to Cdk1 inhibition during the prophase arrest [62,64]. Since the *Xenopus* ortholog of Wee1B is not expressed in prophase oocytes, Wee1B cannot account for the arrest in prophase in this species [66–69].

The identification of the PKA substrates, which inhibit protein synthesis either directly or indirectly, is a pre-requisite to understand the mechanisms responsible for the prophase arrest. Strikingly, these proteins must meet several criteria (Table 2): (i) to be expressed in prophase; (ii) to be dephosphorylated following progesterone stimulation within one-hour, prior protein synthesis; (iii) to block progesterone or PKI-induced maturation when phosphorylated by PKA, similarly to cycloheximide. These proteins must be unable to inhibit the MPF auto-amplification process that is directly induced by either PP2A phosphatase inhibitors, such as okadaic acid, or a cytoplasmic transfer from metaphase II oocytes [1]. The analysis of the published proteome [70] reveals that nine proteins contain a peptide with a strong predicted site for PKA and whose phosphorylation decreases, 90 min after progesterone addition, by at least 50% (Table 3). Interestingly, three of these putative PKA substrates have a known function related to the control of protein synthesis—Rps6, Spats2, and Akt1s1—which are, respectively, a component of the ribosome, an RNA-binding protein involved in male meiosis, and a regulatory subunit of the master regulator of protein synthesis, mTORC1 (mTOR complex 1) [71]. These and other newly identified PKA substrates should be evaluated following the proposed criteria to get new insight into the molecular mechanism by which PKA activity selectively represses the synthesis of proteins required for Cdk1 activation.

Table 2. PKA-substrates in *Xenopus* prophase-arrested oocytes (Prophase I). Summary of the features of the PKA substrates identified so far. OA: Okadaic Acid (pharmacological inhibitor of PP2A-B55 δ , the phosphatase counteracting active MPF). MPF injection refers to the injection of cytoplasm from metaphase II-arrested oocytes [1].

Protein	Expressed in <i>Xenopus</i> Prophase I	Time of Dephosphorylation	Ability to Block Meiotic Maturation When Phosphorylated by PKA	
			Progesterone or PKI	MPF Transfer or OA Injection
<i>Inhibitor 1 (I1)</i>	Unknown	Unknown	YES [60]	NO [60]
<i>Wee1</i>	NO [66]			
<i>Cdc25C</i>	YES [69]	Late [63]		
<i>MpP-32</i>	YES [47]	Late [47]		
<i>Arpp19/MpP-20</i>	YES [47,49]	Early [47,49]	YES [49]	NO [49]

Table 3. Putative PKA substrates in fully-grown *Xenopus* oocytes. Proteins bearing a PKA consensus site (R/K-R/K-X-S/T-X_{hydrophobic}) in which the phosphorylation level of the S/T residue at position 4 of the motif decreases in the response of progesterone (Pg). “Phospho (STY) probabilities” estimate the likelihood of the residue highlighted in red to be phosphorylated. “FC (Pg90/ProI)” is the fold change of the level of phosphorylation detected in oocytes stimulated for 90 min with progesterone as compared to unstimulated prophase-arrested oocytes. In green are highlighted the genes whose function is connected to the control of protein translation.

Gene Names	Proteins	Predicted PKA Site	(STY) Probabilities	Fold Change (Pg90/ProI)	Protein Functions
<i>akt1s1</i>	Proline rich substrate of Akt	DETSKFP S (237)PDLDRIA	0.955	0.353	Subunit of mTORC1, a master regulator of protein synthesis
<i>clspn</i>	Claspin	ADNVK GHS (88)DNEENEE	1	0.131	Cell cycle checkpoints
<i>gly</i>	Glycogen synthase	HRRSK GS (700)IDATNSS	0.271	0.401	Metabolism of glycogen
<i>hadha</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	NDKVK KKS (413)VTSFERD	0.751	0.476	Fatty acids metabolism
<i>rif1</i>	Replication timing regulatory factor 1	SWRSK TKS (1484)IEKDDNV	0.994	0.336	Telomere-associated protein
<i>rps6</i>	Ribosomal protein S6	IAKRRRL SS (236)LRA S (240)TSK	0.455/0.545/0.989	0.344	Cell growth and proliferation through mRNA translation
<i>serpinA2</i>	SerpinA2	FFNK KKL S(133)ELQVHEA	0.986	0.301	Inhibition of serine proteases
<i>spats2</i>	Spermatogenesis associated, serine rich 2	NNKT TRSGS (218)LS SSSQSL	0.461	0.227	RNA binding protein involved in male meiosis
<i>ube2o</i>	Ubiquitin ligase	SGTGR KKS (496)IPLSIRN	1	0.393	Ubiquitin-protein ligase

3.3. Genome-Wide Description of the Prophase Arrest of Fully-Grown Oocytes

In the fully-grown oocyte, the nucleus is localized in the animal half of the cell and contains chromosomes that are partially condensed but transcriptionally silent. Five distinct datasets, including two transcriptomes [37,72], one analysis of mRNA poly(A) tail length [72], one translome [72], and one proteome [70], have been published and can be used to characterize the physiological state of the fully-grown oocytes in a genome-wide manner. Since transcription is strongly downregulated, the transcriptome directly reflects cytoplasmic stockpiled mRNAs that have accumulated during early oogenesis. Because the results from the two published transcriptomes correlate well, they allow determining high and low abundant transcripts in the fully-grown oocyte (Figure 3A). Gene ontology analysis of these transcripts reveals that the lowest expressed mRNAs are enriched in components of the ubiquitin-degradation pathway, while the highest expressed transcripts are connected to translation (ribosomal proteins and translation initiation factors), energy production, as well as mitotic M- and S-phases regulation, mRNA splicing, and gastrulation (Figure 3B). Interestingly, the low level of mRNAs associated with the ubiquitin-degradation pathway suggests that protein stability is enhanced in fully-grown oocytes, as it has also been described for mRNAs [73]. In mouse oocytes, protein stability is an important mechanism to maintain oocytes arrested in prophase [74]. Hence, further studies will be required to better understand the role and regulation of protein turnover during early oogenesis and the prophase arrest in the vertebrate species.

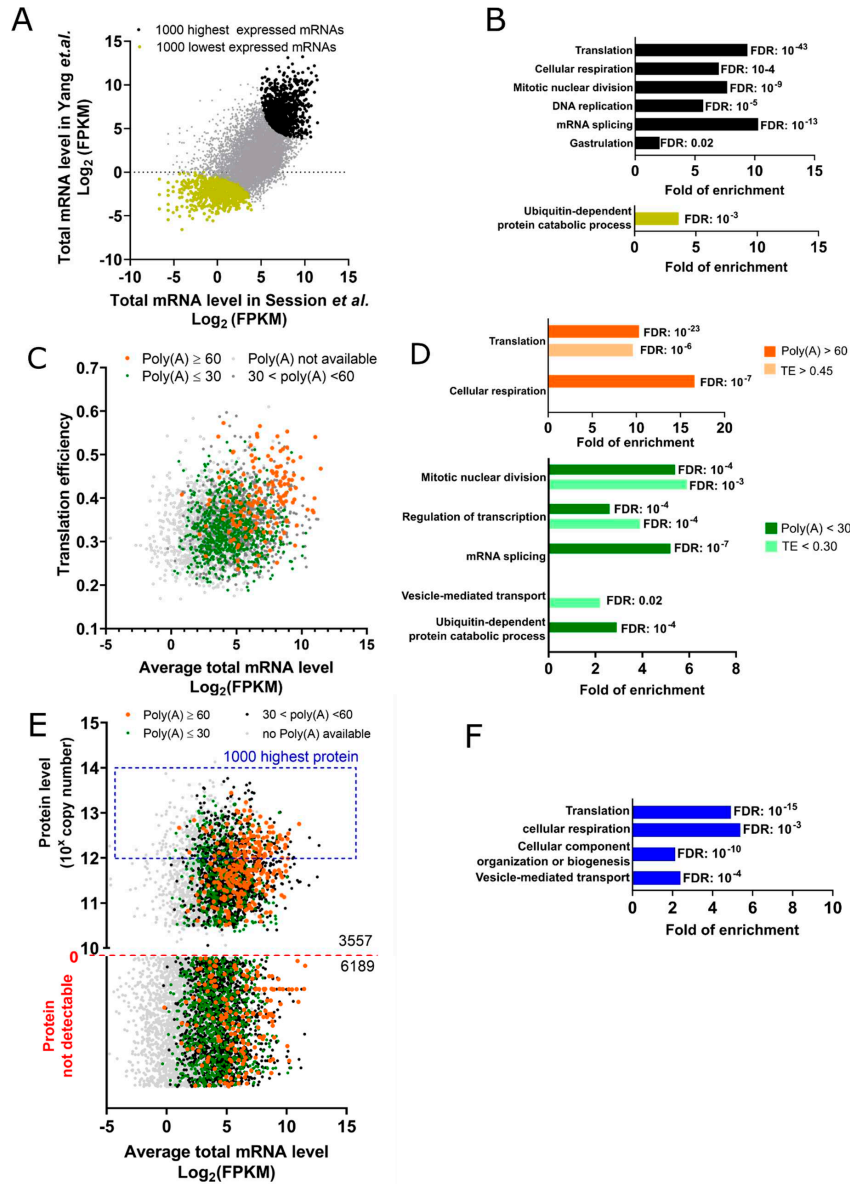


Figure 3. Genome-wide analysis of the fully-grown prophase-arrested oocytes. **(A)** The expression level of each mRNA quantified using two independent published datasets [37,72]. Each transcript is ranked in the two databases according to its level of expression. The average rank is used to highlight the 1000 transcripts with either the lowest (yellow) or the highest level of expression (black). **(B)** Gene ontology terms enriched among 1000 highest (black) or 1000 lowest (yellow) expressed transcripts from panel A. **(C)** The translation efficiency (TE) is defined as the fraction of mRNAs recovered in the polysomes divided by the concentration of total mRNAs of each transcript. TE has been correlated with its total level [37,72]. The extent of the poly(A) tail length has been color-coded: black (30 to 60 nt), green (≤ 30 nt), orange (≥ 60 nt), grey (poly(A) length not available). **(D)** Gene ontology terms enriched among the transcripts with poly(A) tail ≥ 60 nucleotides (dark orange) and TE ≥ 0.45 (light orange) or among poly(A) tail ≤ 30 nucleotides (dark green) and TE ≤ 30 (light green) from panel C. **(E)** The expression level of each protein is compared to the level of its mRNA [37,70,72]. The same color code as panel C is applied for the poly(A) length. **(F)** Gene ontology terms enriched among 1000 highest expressed proteins from panel E.

Cytoplasmic polyadenylation is one of the main mechanisms, controlling translation during both meiosis and the first embryonic cell divisions [75]. The genome-wide correlation between translation and poly(A) tail length is, however, lost during later phases of embryo development, suggesting that additional mechanisms become functional to control translation [75]. Therefore, published datasets of the poly(A) tail length measured before this embryonic switch can be used to identify mRNAs that are actively translated from the ones that are stored for future use [72]. Indeed, mRNAs with a poly(A) tail longer than 60 nt are enriched among transcripts with a higher translation efficiency (TE) (Figure 3C). Gene ontology indicates that the highly polyadenylated transcripts in prophase-arrested oocytes, i.e., most likely actively translated, are implicated in ribosome synthesis and cellular respiration (Figure 3C,D). Conversely, mRNAs involved in mitotic nuclear division, DNA replication, and RNA splicing bear short poly(A) tails (Figure 3D), suggesting that these mRNAs categories are stored for later translation. Indeed, DNA replication and transcription are not taking place during meiotic divisions but only after fertilization, in the embryo. This translational program is well-conserved in mouse prophase-arrested oocytes [76]. However, not all the genes regulating M-phase progression are translationally repressed. mRNAs encoding the kinase Cdk1 and its regulatory subunit—Cyclin B2—are highly expressed in the prophase-arrested oocyte. Their active translation allows the formation of inactive Cdk1-Cyclin B complexes in both *Xenopus* and mouse [77,78].

The published proteome reveals that only 40% of mRNAs expressed in fully-grown oocytes are translated at a level detectable by mass spectrometry [70]. On average, mRNAs encoding proteins that are detectable by mass spectrometry are more abundant as compared to those encoding undetectable proteins ($\text{Median}_{(\text{detected})} = 20 \text{ TPM}$ vs. $\text{Median}_{(\text{not detected})} = 10 \text{ TPM}$, TPM: transcript per million) (Figure 3E). Additionally, 60% of mRNAs with poly(A) tail longer than 60 nt encode proteins that are present in the proteome dataset (Figure 3E). This implies that the proteome of prophase oocytes results from both the abundance and the poly(A) tail length of mRNAs. However, 126 transcripts, which are well-expressed in fully-grown oocytes ($\text{TPM} \geq 20$) and bear a poly(A) tail longer than 60 nt, are not detectable at the protein level. Conversely, 442 transcripts have short poly(A) tails but are detectable by proteomic approaches. These discrepancies between protein level and mRNAs' polyadenylation can be explained by the regulation of protein turnover and/or by still uncovered translational regulatory mechanisms that would be independent of the poly(A) tail length. Additionally, mass spectrometry data must be interpreted with caution since some abundant proteins might not be detectable because, for example, not efficiently digested by Trypsin. More generally, detection by mass spectrometry does not allow a strict correlation of absolute copy numbers, while it still gives very precise numbers of the relative abundances. The 1000 proteins with the highest level of expression are involved in translation, cellular respiration, biogenesis of cellular components, and vesicle-mediated transport (Figure 3F). Hence, the proteome provides the identity of proteins that are highly translated in the fully-grown oocyte but also proteins that have been synthesized earlier during the growth period of oogenesis. Consistently, the vitellogenin uptake from the bloodstream is not anymore active in fully-grown oocytes [31], and the class of mRNA regulating this process bears short poly(A) tail at this final growth stage [72] (Figure 3C,D).

4. The Release of the Prophase Block: The Unexplored Path That Connects PKA Downregulation to MPF Activation

In most vertebrates, protein synthesis is required to activate MPF and to induce M-phase entry. In *Xenopus*, progesterone promotes the inactivation of PKA that activates de novo mRNA translation and ends with MPF activation within 3 to 5 h. How PKA downregulation leads to mRNA translation remains largely unknown.

4.1. De Novo Protein Translation: A Necessary Step for Meiosis Resumption

Class I proteins are present either at an extremely low level or not expressed in prophase-arrested oocytes. Their synthesis from cytoplasmic stockpiled mRNAs is required for MPF activation (Figure 1). Among Class I, three proteins have been identified so far—Cyclin B [5,16], Mos [10–15], and Ringo/Speedy [8,9]. Mos is a kinase-specific of the germline that is translated upon hormonal stimulation and indirectly activates MAPK (mitogen-activated protein kinase). While the Mos/MAPK pathway contributes to MPF activation in some vertebrates, including the amphibian *Xenopus* [10–15], this pathway is essential in all species for the formation of meiotic spindles, the inhibition of DNA replication between the two divisions, and the secondary meiotic arrest [13–15,79–81]. Ringo/Speedy activates Cdk1 in a non-canonical manner by direct binding to free Cdk1 [8,9]. The injection of either Mos, Cyclin B, or Ringo/Speedy induces meiosis resumption independently of the hormonal stimulation. However, inhibiting the synthesis of any of these proteins delays, but does not prevent, meiosis resumption upon progesterone stimulation [5,15,77]. Hence, the synthesis of any of these components is sufficient but not necessary for meiosis resumption, demonstrating the robustness of the signaling pathway induced by progesterone. Initially, it was proposed that an “early translation” of Mos, which activates MAPK, is required for meiosis resumption and necessary for the Cdk1-dependent “late translation” of Cyclin B1 [82]. However, this temporal classification contradicts other published results. First, while inhibiting protein synthesis blocks meiosis resumption in response to progesterone, preventing Mos translation or MAPK activation only delays Cdk1 activation [6,14,15,83]. This demonstrates that Mos is not the only protein whose translation is required for meiosis resumption. Second, the inhibition of Cyclin B translation with antisense strongly delays meiosis resumption in response to progesterone, hence suggesting that Cyclin B translation contributes to Cdk1 activation and does not take place downstream Cdk1 activation [5]. Additionally, in progesterone-stimulated oocytes in which Cdk1 activity is inhibited with a CDK inhibitor, p21^{Cip1}, Cyclin B1 accumulates but not Mos [16]. Altogether, these results strongly argue for Cyclin B1 being an early translated mRNA. Moreover, even if Mos mRNA belongs to the early-translated mRNAs, the accumulation of Mos protein depends on Cdk1 activation since Mos is stabilized by its Cdk1 phosphorylation at S3 [84]. Notably, when protein synthesis is blocked, Cyclin B injection induces meiosis resumption in the absence of progesterone. Conversely, the injection of Mos at its physiological concentration is unable to activate Cdk1 under these conditions, despite its ability to activate MAPK [5,12]. These results suggest that some unidentified Class I proteins must be translated to activate Cdk1. Importantly, Class I proteins should be translated temporally before and independently of Cdk1 activation, and the suppression of their translation is expected to delay meiosis resumption, i.e., the time of NEBD (Table 4).

Table 4. Class I proteins whose translation is required for MPF activation in *Xenopus* oocytes. Summary of the expected features of the Class I proteins and those of the Class I proteins already identified. CHX: cycloheximide.

	Timing		Protein Accumulation		Effects on NEBD	
	Polyadenylation	Protein Accumulation	Cdk1 Activity	Loss of Function	Gain of Function	Gain of Function + CHX
Class I	Early	Before NEBD	Not required	Delay/Block	Induction	Induction
<i>Cyclin B1</i>	Early [85]	Before NEBD [16]	Not required [16]	Delay [5]	Induction [5]	Induction [5]
<i>Mos</i>	Early [86]	At NEBD [16]	Required [16]	Delay [5,14,15]	Induction [11]	No Induction [5]
<i>Speedy/Ringo</i>	Unknown	Unknown	Unknown	Delay [67]	Induction [8,9]	Induction [8,9]

4.2. The Regulation of Translation by *cis*-Acting Elements and *Trans*-Acting Factors

Another caveat relies on the fact that the molecular regulation of translation during oocyte meiotic maturation is not fully understood. Seminal works on the plasminogen activator tPA have shown that, during meiosis resumption, tPA mRNA undergoes polyadenylation and increases translation, under the control of the information encoded in the 3'-UTR [87]. Importantly, blocking the process of poly(A) tail elongation with cordycepin (3'-deoxyadenosine) suppresses progesterone-induced meiotic maturation [88], suggesting that polyadenylation is necessary for translation of mRNAs that are required to resume meiosis. Many studies based on candidate approaches have focused on how interactions between *cis*-acting elements in the mRNA sequence and *trans*-acting factors, mainly RNA-binding proteins (RBPs), control polyadenylation.

Cis-acting elements in the 3'-UTR include cytoplasmic polyadenylation elements (CPEs) [89,90], polyadenylation responsive elements (PREs) [86], and Pumilio-binding element (PBE) [91]. The presence of CPEs has been proposed to be required and sufficient to drive translation in oocytes [92]. This regulation depends on the position and the number of CPEs [92]. While two CPEs located less than 50 nt apart are able to inhibit translation in prophase-arrested oocytes, translation activation during meiosis resumption likely depends on the presence of one CPE within 100 nt from the PAS [92]. Additionally, PBE contributes to the inhibition of translation of some mRNAs in prophase-arrested oocytes, including Cyclin B1 mRNA [91,92]. Since these results have been obtained by studying short 3'-UTR fragments derived from a few transcripts, an important challenge is to evaluate whether these rules can be extended to the general translation control. Other results suggest that a PRE, and not CPEs, is necessary and sufficient to promote the early translation of Mos in response to progesterone [86]. More recently, an attempt of reconciliation of these findings has proposed that the PRE modulates the use of different CPEs in Mos 3'-UTR by modifying the 3D-structures of the mRNA [93]. However, it is still unclear whether this mechanism is specific to Mos 3'-UTR and whether other *cis*-acting elements are involved in the regulation of the "early" wave of translation.

In the last two decades, many studies have focused on understanding how translation is controlled by *trans*-acting factors, in particular, RBPs. However, the inability to identify univocally the *cis*-acting elements regulating translation has resulted in the impossibility to ascertain whether CPE-binding protein 1 (CPEB1) [94], PRE-binding protein Musashi [95], or any other unknown RBPs that bind unidentified *cis*-acting elements are involved in the control of translation. Additionally, how the activities of the well-studied CPEB1 and Musashi are regulated remains controversial. At first, it was proposed that progesterone activates the kinase Aurora A, which, in turn, phosphorylates CPEB1 at S174 in order to allow Mos mRNA polyadenylation [96]. These results have been challenged as Aurora-A is unlikely activated before Cdk1 activation and seems dispensable for both CPEB1 phosphorylation and NEBD [97–100]. Moreover, in other vertebrates (mouse and porcine), Aurora-A does not control CPEB1 phosphorylation [101,102]. A second hypothesis is that Speedy/Ringo, whose translation is regulated by the Pumilio/Dazl complex, binds to Cdk1 and activates either CPEB1 [103] or Musashi [95,104]. Hence, a clear definition of the RBP network regulating the early wave of translation is still missing.

4.3. A Genome-Wide Overview of the Early Translation Wave: A Challenge for the Future

Noteworthy, genome-wide analysis has failed to identify proteins that are translated in response to progesterone since little changes in poly(A) tail length, polysome fractions, or in the proteome are observed in oocytes analyzed 90 min after the hormonal stimulation [70,72] (Supplementary Materials, Figure S1). Additionally, no increase in the poly(A) tail length and the protein expression level of either Mos, Cyclin B, or Speedy/Ringo, nor CPEB1 phosphorylation at S174 during meiosis resumption, has been recorded in the genome-wide analysis performed until now [70,72]. A possible explanation is that translation is not yet activated at 90 min after progesterone stimulation. As described above, a clear vision of how PKA downregulation regulates protein synthesis to activate Cdk1 activation during meiosis is still missing. The identification of the molecular mechanisms regulating translation

in *cis* and in *trans*, as well as the identity of the synthesized proteins involved in Cdk1 activation, is one of the major open challenges in the field.

5. Progression and Completion of Meiotic Maturation: Shedding Light on the Cytoplasmic Maturation

Late meiotic maturation spans from NEBD to the arrest in metaphase II. In all species, activation of the late wave of translation is required for the MI to MII transition and to accumulate proteins required after fertilization.

5.1. Genome-Wide Description of the Late Steps of Meiotic Maturation

The full activation of Cdk1 induces NEBD and massive activation of protein translation (late wave of translation) that was first described by the incorporation of radiolabeled leucine [105,106]. De novo protein synthesis is required for meiosis progression, as preventing protein synthesis with cycloheximide at the time of NEBD abolishes entry into meiosis II [13,24,77]. Under this condition, oocytes enter a pseudo-interphasic state and replicate their genome [13,24]. While mRNAs are globally stable during meiosis I (Figure 4A), the activation of translation is accompanied by the extension of poly(A) tail of 1111 transcripts. The translation of 414 other transcripts remains high since prophase I (Figure 4B). At NEBD time, the translation wave produces components, regulating M-phase progression and DNA replication (Figure 4B). The analysis of the translation efficiency has provided similar results (Supplementary Materials, Figure S2). Among the M-phase regulators whose translation is upregulated are Aurora-A, Kif11/Eg5, and Wee1. These findings are in good agreement with the known functions and regulations of these proteins. Aurora-A accumulates in a Cdk1-dependent manner at NEBD time [97]. Kif11/Eg5 mRNA becomes highly polyadenylated, and the protein plays a critical role during the MI-MII transition [99]. Wee1 accumulates after NEBD and exerts its functions during the embryonic cell cycles [66]. Among the components of the DNA replication machinery is Cdc6, which is the only missing component of the pre-replication complexes in prophase-arrested oocytes [22,23]. Cdc6 accumulation after NEBD is necessary to support DNA replication during the embryonic cell cycles [22–24]. Importantly, the translation of Cdc6 and Wee1 must be tightly controlled as their precocious expression prevents the proper progression in meiosis [24,66].

While oocytes progress in meiosis II, an extensive wave of mRNA de-adenylation and degradation is also taking place (Figure 4A,B). The de-adenylated and degraded transcripts, commonly identified in Session et al. [37] and Yang et al. [72] datasets, are components of the translation machinery, such as mRNAs encoding the eukaryotic initiation factor (eIF) family and ribosomal proteins [107], as well as proteins involved in cellular respiration (Supplementary Materials, Figure S2). This result is also confirmed at the protein level as proteins involved in translation and vesicle-mediated transport components disappear from the proteome (Figure 4C). The decrease in the translation of ribosomal proteins during late meiosis resumption is also conserved in the mouse model [108]. Conversely, transcripts involved in mitotic nuclear division remain highly polyadenylated. With these new signatures, the fertilizable oocyte terminates the gene expression program that was initiated during early oogenesis.

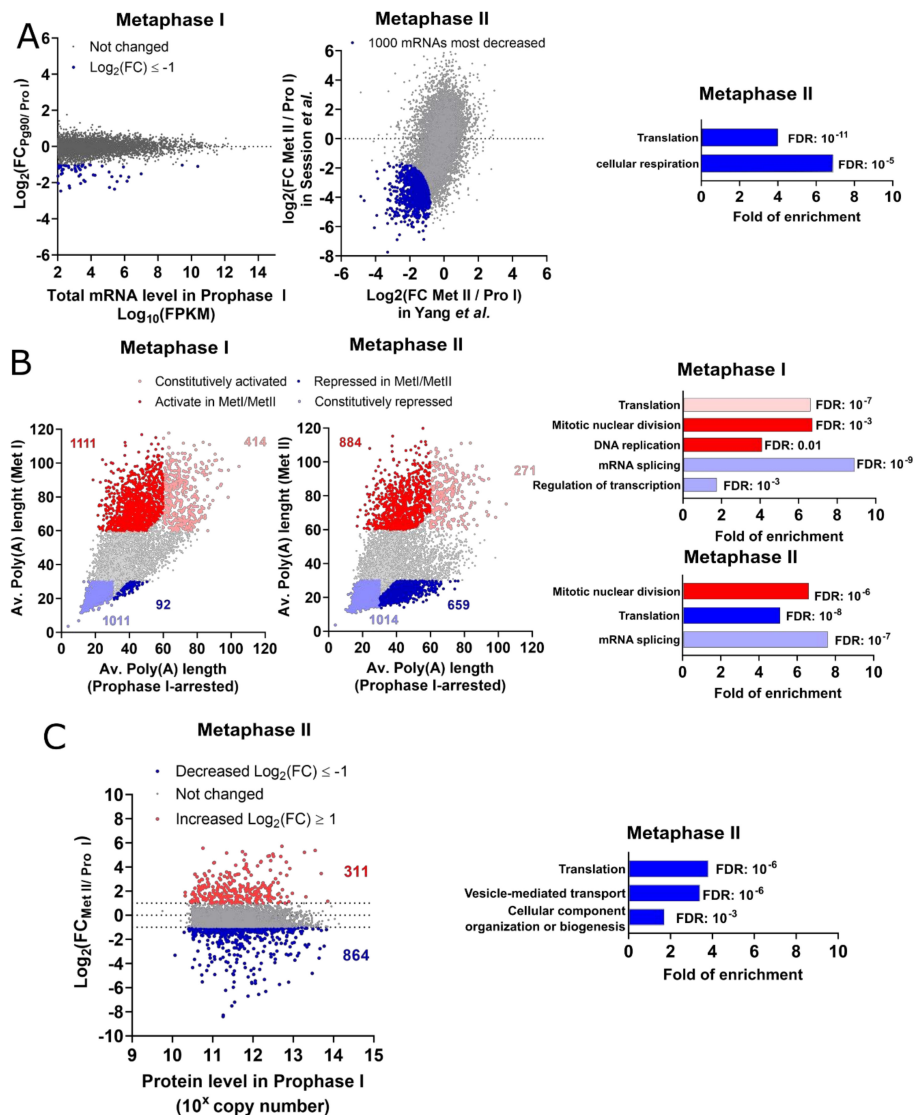


Figure 4. Genome-wide analysis of oocytes during meiotic maturation. (A) Changes in total mRNA levels [37,72]. Left panel: Changes between prophase I and metaphase I oocytes. Blue: mRNAs, whose level decreases more than 2-fold. Middle panel: Changes between prophase I (Pro I) and metaphase II (Met II) oocytes. The average rank is used to highlight the 1000 transcripts whose levels decrease the most during this period of meiotic maturation (blue). Right panel: Selection of the gene ontology terms enriched among the 1000 mRNAs from the middle panel. (B) Changes in the poly(A) tail length of each mRNA during meiotic maturation [72]. A color-code depicts 4 groups of transcripts. Light red: constitutively activated transcripts with poly(A) tail ≥ 60 nt at all periods; dark red: activated mRNAs whose poly(A) tail increases, at least, by 10 nt and is longer than 60 nt in Met I/Met II; light blue: constitutively repressed mRNAs with poly(A) tail ≤ 30 nt at all periods; dark blue: repressed mRNAs whose poly(A) tail decreases more than 10 nt and is shorter than 30 nt in Met I/Met II. Left panel: Changes between prophase I and metaphase I (Met I) oocytes. Middle panel: Changes between prophase I and metaphase II (Met II) oocytes. Right panel: Selection of the gene ontology terms enriched among the 4 groups of transcripts. (C) Left panel: Changes in the protein levels between prophase I and metaphase II oocytes [70]. The proteins whose copy number increases or decreases more than 2-fold are colored in red or blue, respectively. Right panel: Selection of the gene ontology terms enriched among the proteins whose level decreases more than 2-fold, from the right panel.

5.2. The Role of Polyadenylation in the Control of the Late Wave of Translation

Extension of the poly(A) tail is widely believed to be the major mechanism, regulating the activation of translation during meiosis, as it has been demonstrated for Cyclin B1, Cyclin B4, Mos, Cyclin A, Aurora, and others [85,86,109]. A still open question in the field regards the absolute requirement of polyadenylation to activate translation. Genome-wide correlation between datasets published by Yang et al. on polyadenylated mRNAs and translation efficiency shows that de-adenylation is always correlated with the repression of translation [72] (Figure 5A,B). Furthermore, two groups of transcripts, whose translation activation occurs with the same efficiency, can be identified. The first one (142 transcripts) displays a strong increase of the poly(A) tail, while the second one does not show polyadenylation (70 transcripts), suggesting that translation activation of some transcripts occurs independently of polyadenylation (Figure 5A,B), as previously reported using candidate-approaches [110]. In addition, polyadenylation is not only unnecessary for translation activation but is also unlikely to be sufficient, as some transcripts are polyadenylated without activation of their translation (Figure 5A). This correlation analysis is, however, limited by the relatively small number of transcripts, whose polyadenylation status and translation efficiency are both known during meiosis. The validation of transcripts whose activation of translation is correlated or not with polyadenylation will be a mandatory step to understand the molecular mechanisms underlying the activation of translation that occurs independently of poly(A) tail elongation during meiosis.

5.3. The RBP Network Controlling the Late Wave of Translation

It has been proposed that CPEB1 degradation controls the activation of the “late” wave of translation that occurs at NEBD. CPEB1 degradation by the Skp, Cullin, F-box containing (SCF) ubiquitin ligase pathway depends on CPEB1 phosphorylation by Cdk1 in *Xenopus* [82,111,112]. This phosphorylation event is conserved in the mouse as both Cdk1 and MAPK cooperate to phosphorylate CPEB1 [102,113,114]. The injection of a CPEB1 mutant, which can be neither phosphorylated nor degraded (6A-CPEB1), does not impact meiosis resumption but strongly abolishes the MI-MII transition, demonstrating that these CPEB1 modifications are critical for meiosis progression [82]. Likewise, these data suggest that CPEB1 inhibits the translation of some Class II mRNAs that are required for meiosis progression. At NEBD, the repression previously exerted by CPEB1 is relieved upon its degradation, hence resulting in the activation of translation. While it is well established that CPEB1 plays a central role in controlling translation in both *Xenopus* and mouse oocytes, discrepancies still exist regarding the identity and the UTRs features of mRNAs that are translated following CPEB1 degradation. It was proposed that the binding of CPEB1 to a CPE overlapping the PAS could prevent CPSF-dependent polyadenylation until CPEB1 gets degraded at NEBD [92]. However, the poly(A) database from Yang et al. [72] shows that only 21% (129/606) of the transcripts, whose poly(A) tail length increases in metaphase I and whose UTR is deposited at UCSC database, contains a CPE overlapping the PAS in the 3'-UTR (Figure 5C). Therefore, additional mechanisms should explain the temporal activation of polyadenylation of late transcripts. In *Xenopus*, the Cyclin B1 mRNA, an essential transcript required for meiosis resumption, would be translated in a CPEB1 degradation-dependent manner [82,92]. However, Cyclin B1 accumulates in response to progesterone before and independently of Cdk1 activation [16]; its translation is, therefore, likely independent of CPEB1 degradation. Further studies using unbiased approaches will be required to globally identify mRNAs belonging to the late wave of translation. This knowledge will be the first step to functionally determine the sub-group of late translated transcripts that are important for meiosis progression.

Besides CPE and PBE, other *cis*-acting elements have been involved in the control of the late wave of translation. The 3'-UTR of Wee1 mRNA contains a translational control sequence (TCS) that binds to Zar2 (Zygote-arrest 2) in prophase oocytes and represses its translation [25,115]. As for CPEB1, Zar2 is degraded at NEBD time, when Wee1 translation is initiated [25]. Zar2 and CPEB1 act in a similar manner—their degradation is necessary to remove the repression of translation operating in prophase. Using an approach based on 3'-UTR reporters, it has been shown that the removal of the

inhibitory complex (de-repression) increases the rate of translation in prophase I-arrested oocytes [76]. Importantly, the translation of these reporters further increases during meiosis resumption, suggesting that the activation of the translation does not simply rely on the de-repression of mRNAs but requires the recruitment of activating complexes [76]. Interestingly, CPEB4 is a Class II protein that has been proposed to be part of the activating complex required for the late polyadenylation [18]. Accordingly, when CPEB4 translation is inhibited, oocytes cannot enter metaphase II but, instead, enter into pseudo-replicative interphase without extruding the first polar body [18].

Altogether, the code of *cis*-acting elements cooperates with differentially expressed RBPs. These RBPs undergo specific cell cycle-dependent modifications and tightly orchestrate the late wave of translation that includes proteins required for meiosis progression (Class II) and the development of the embryo (Class III).

5.4. De-Adenylation and RNA Degradation during Meiosis II

An extensive wave of mRNA de-adenylation and degradation takes place during the MI-MII transition (Figure 4A,B), as also shown in mouse [116,117]. In the last years, many studies using the mouse model have been conducted to elucidate the composition of the machinery involved in mRNA de-adenylation/degradation, the temporal control of its activation, and its specificity. It has been established that the CCR4-NOT (Carbon Catabolite Repression—Negative On TATA-less) de-adenylation complexes, composed of Btg4-Cnot7/8 and ZFP36L2-Cnot6l [114,118], as well as the de-capping proteins DCP1A and DCP2, play a central role in these mechanisms [119]. Interestingly, Cdk1 not only promotes the translation of the components of the de-adenylation machinery, it further modulates the activity of these proteins by phosphorylation, thus enabling a precise coupling between mRNA de-adenylation/degradation and meiosis progression. The translation of Btg4, Cnot8, Cnot6L, DCP1A, and DCP2 is activated during meiosis, demonstrating that stockpiled mRNA degradation is encoded by the translation program of the oocyte [76,113,118]. Additionally, Cdk1 phosphorylates Y-box binding protein 2 (YBX2) [120,121], as well as DCP1A and DCP2 [119], which, respectively, results in mRNA deprotection and activates the de-capping activity of DCP1A and DCP2. Another layer of RNA regulation involves adenosine methylation that converts adenosine into N^6 -methyladenosine (m^6A). Indeed, it was proposed that YTHDF2 binds m^6A and precisely selects mRNAs to be degraded [122]. In contrast with these protein-based mechanisms, microRNA-mediated RNA degradation is predominant at the time of zygote genome activation after fertilization [123].

In *Xenopus* oocytes, 80% of the mRNAs whose level decreases more than 2 folds have poly(A) tail shorter than 40 nt (Figure 5D). Hence, the length of poly(A) tail could also play a role in mRNAs degradation, although a large group of mRNAs with short poly(A) are stable (Figure 5D). This apparent discrepancy is explained by the presence of two groups of mRNAs with short poly(A) tails in metaphase II: mRNAs whose translation is already repressed since prophase (Figure 5D, light blue) and mRNAs that undergo de-adenylation during meiosis progression (Figure 5D, dark blue). mRNAs of the first group, which are stable during meiosis, are probably stockpiled to support embryo development, while mRNAs of the second group are degraded. Therefore, the dynamics of de-adenylation is a more important predictor of mRNA degradation than the length of the poly(A) tail itself. In *Xenopus* oocytes, the molecular composition of the de-adenylation complex is still unknown, but it could involve the zinc finger protein 36 C3H-like type 2 (zfp36l2), whose synthesis increases during meiosis [28]. Moreover, both Btg4 and Cnot6l mRNAs are polyadenylated [72], opening the interesting possibility that their function is conserved among vertebrates. Accordingly, around 30% of mRNAs that are degraded in *Xenopus* oocytes at metaphase II have homologous mRNAs in mice that are stabilized either in the Btg4^{-/-} or Cnot6l^{-/-} metaphase II oocytes [114] (Figure 5E). This observation strengthens the idea that both Btg4 and Cnot6l control the degradation of stockpiled mRNAs in both *Xenopus* and mouse. Only a few studies have addressed how mRNAs are selected to be degraded in *Xenopus* oocytes. It was proposed that mRNA de-adenylation occurs as a default mechanism for mRNAs that do not contain

CPE elements [124], as described in mouse [76]. Other works instead suggest that de-adenylation is activated by the presence of (A + U)-rich elements (ARE) in the 3'UTR of mRNAs [28].

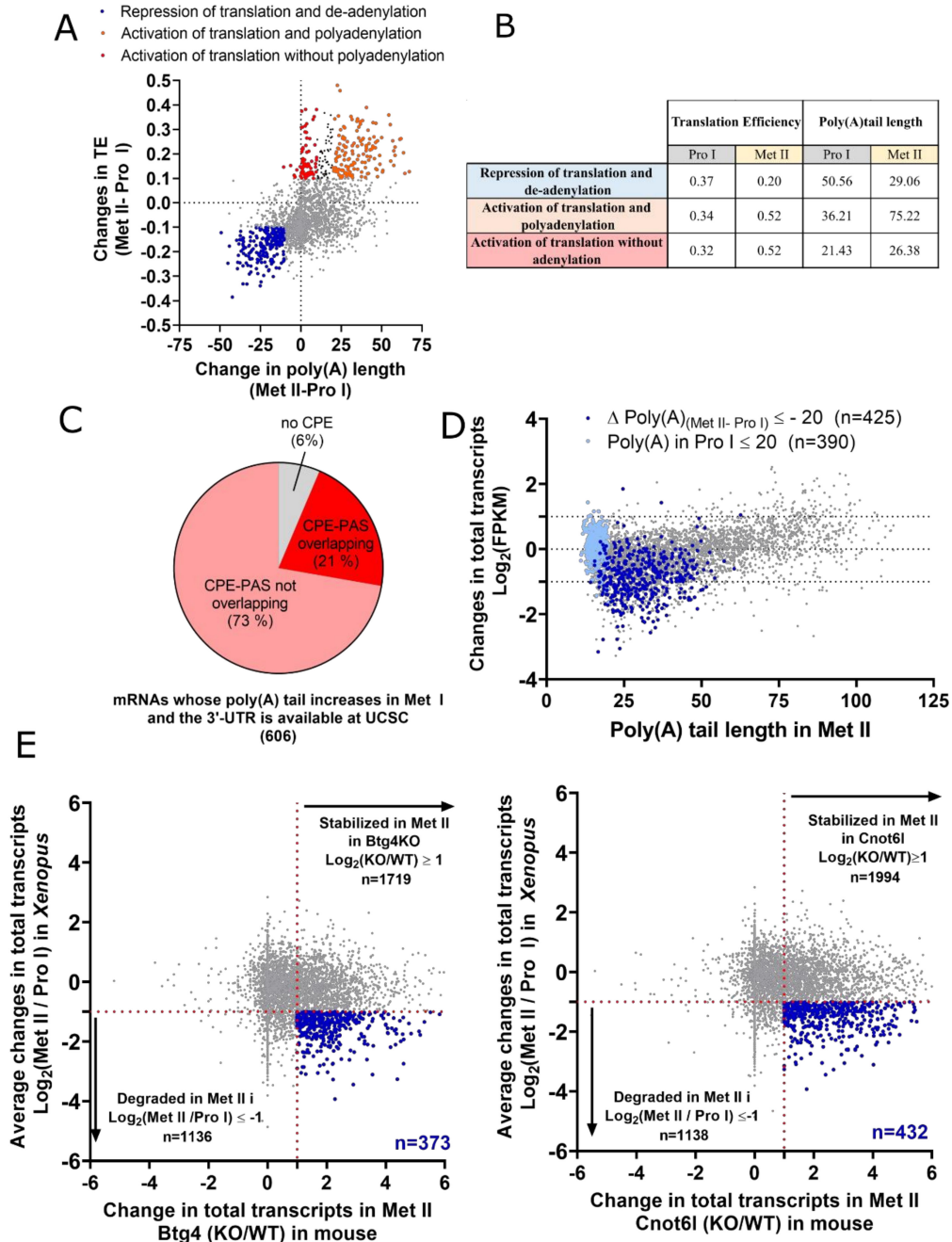


Figure 5. The relationship between poly(A) tail length, translation, and mRNA degradation. (A) Changes in translation efficiency (TE) and in the poly(A) tail length between fully-grown prophase (Pro I) and metaphase II (Met II) oocytes [72]. Transcripts are divided into three groups: transcripts whose poly(A) tail decreases, at least, by 10 nt and TE decreases, at least, by 0.1 (blue—repression of translation and de-adenylation), transcripts whose poly(A) tail increases less than 10 nt and TE increases more than 0.1 (red—activation of translation without polyadenylation), and mRNAs whose

poly(A) tail increases more than 20 nt and TE increases, at least, by 0.1 (orange—activation of translation and polyadenylation). (B) Median values of translation efficiency and poly(A) tail length of the three groups described in panel A. (C) 3'-UTRs of the mRNAs whose poly(A) tail increases, at least, by 10 nt and is longer than 60 nt in metaphase I (Met I) oocytes are retrieved from the UCSC database. Sequences of cytoplasmic polyadenylation elements (CPEs) and CPE overlapping the PAS from Pique et al. [92] are searched within the 3'-UTRs. The pie chart represents the percentage of transcripts containing at least one CPE or one CPE overlapping the PAS or none. (D) Changes in total mRNA levels between fully-grown prophase (Pro I) and metaphase II (Met II) oocytes are compared to the length of the poly(A) tail in Met II oocytes [72]. A color-code depicts two groups. Light blue: mRNAs with a poly(A) tail length ≤ 20 nt in both Pro I and Met II oocytes; dark blue: mRNAs whose poly(A) tail length decreases, at least, by 20 nt between both stages. (E) Changes in the total mRNA levels between fully-grown prophase I (Pro I) and metaphase II (Met II) in *Xenopus* oocytes [72] are compared with mRNAs that are stabilized in *btg4* (left panel) or *cnot6l* (right panel) knockout mouse Met II oocytes [114]. Blue: transcripts degraded in *Xenopus* Met II oocytes and stabilized in *btg4* (left panel) or *cnot6l* (right panel) knock-out mouse Met II oocytes.

6. Conclusions and Perspectives

The understanding of the regulation of the G₂/M transition has greatly benefited from the comparative studies using various model organisms, such as *Xenopus*, mouse, *Drosophila*, and starfish. Nevertheless, many questions are still open regarding the molecular switch that leads to Cdk1 activation (Figure 6). One of the major challenges is to solve the “black box” of meiosis, discovering what are the mechanisms controlling mRNA translation, what is the identity of the translated proteins, what are their functions in orchestrating meiosis. By combining the emerging inputs of omics techniques with the power of biochemistry, the *Xenopus* oocytes system opens a new era of investigations, in which genome-wide analysis is coupled to the detailed molecular investigation.

Each genome-wide dataset describes meiotic maturation from slightly different perspectives, with specific strengths and weaknesses. The transcriptome analysis is extremely sensitive, but it does not distinguish between mRNAs that are used immediately or stockpiled for further use. The poly(A) dataset provides a snapshot of the active translation landscape at a precise moment, but it fails at classifying mRNAs with a very low level of expression. Moreover, it is based on the assumption that poly(A) tail length is the dominant mechanism regulating translation. The proteome records the steady-state between translation regulation and protein turnover, but its sensitivity is lower than the other two approaches, as it fails to sense many regulators of cell division that are under the threshold of detection. Clearly, the integration of all the information derived from transcriptome, poly(A) dataset, translatoome, and proteome is required to fully understand the physiological dynamics of translation during each phase of oogenesis. This will set the ground to investigate the molecular mechanisms driving the transitions the oocyte undergoes in its journey to becoming a fertilizable egg.

Recent works have revealed that the correlation between the levels of mRNAs and their encoded proteins is far from being optimal in many biological systems [125–127]. Therefore, the post-transcriptional mechanisms regulating gene expression identified during meiosis should play fundamental functions in sculpting the proteome in many systems beyond oocytes.

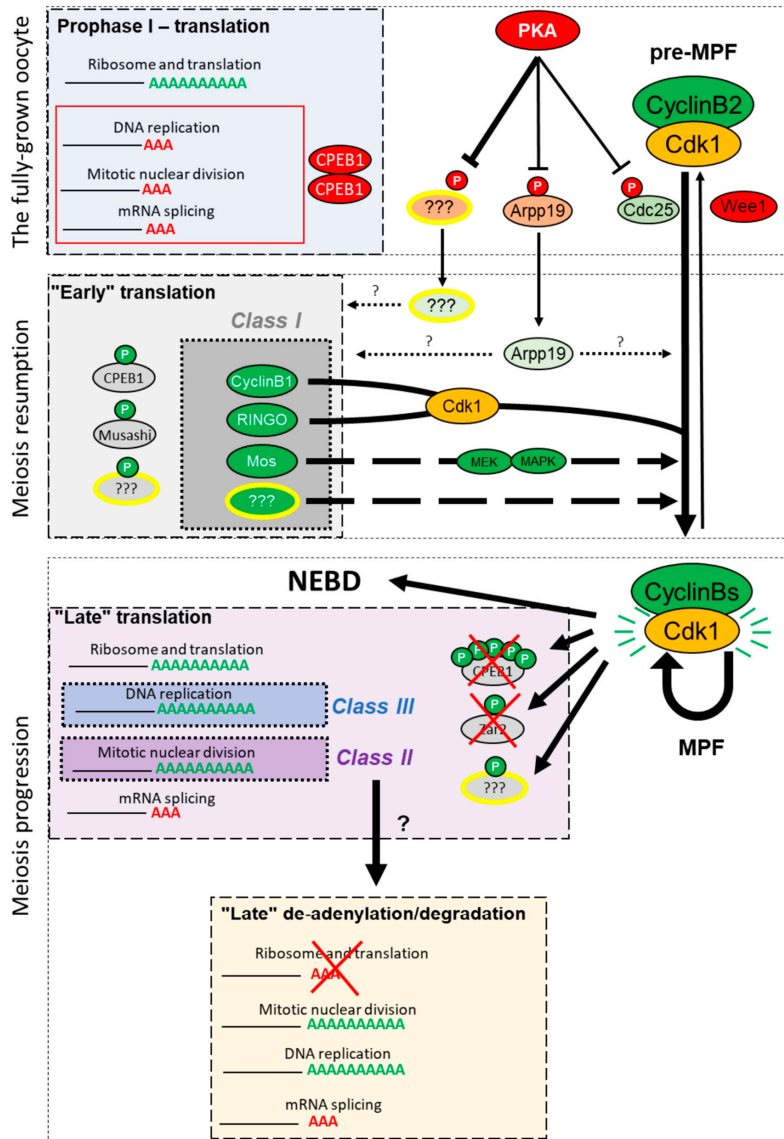


Figure 6. The bidirectional regulation between protein translation and meiosis progression. The fully-grown prophase-arrested oocyte actively translates proteins related to cell metabolism and ribosome biogenesis. mRNAs encoding proteins involved in M-phase progression, DNA replication, and mRNA splicing exhibit short poly(A) tails and are stored for future translation. The prophase arrest is maintained by the high activity of protein kinase A (PKA) and the phosphorylation of its substrates, which indirectly inhibit the activation of the M-phase promoting factor (MPF). In the vertebrates, the prophase arrest is released by a decrease of PKA activity and the dephosphorylation of PKA substrates. De novo protein synthesis occurs before NEBD (“Early” translation), and a sub-group of the de novo synthesized proteins is required to activate Cdk1 (Class I). Two RNA-binding proteins (RBPs) have been involved in the activation of the early translation wave—CPEB and Musashi. Once activated, Cdk1 activates the “late translation” (purple box). This second translation wave involves the phosphorylation and degradation of inhibitory RBPs, including CPEB1 and Zar2. The translated proteins are involved in meiosis progression (Class II), support embryonic cell divisions, such as components of the DNA replication machinery (Class III), and further contribute to regulating RNA translation and degradation by de-adenylation in metaphase II. Among the transcripts that are de-adenylated are ribosome compounds and translation initiation factors.

Methods—Analysis of Published Datasets

Raw data from transcriptome data during oogenesis used in Figure 2 was from Session et al. [37]. The oocyte transcriptome raw datasets for fully-grown prophase-arrested oocytes and metaphase II arrested oocytes used in Figures 3 and 4 were from Session et al. [37] and Yang et al. [72]. TPM stands for a transcript per million, and FPKM for fragment per kilobase per million. The datasets of poly(A) length used in Figure 3B,C and Figure 4B and the translation efficiency used in Figure 3B were obtained from Yang et al. [72]. The protein counts in fully-grown prophase-arrested oocytes and in metaphase II arrested oocytes used in Figures 3C and 4C were obtained from the proteomic dataset published by Peuchen et al. [70]. All the data analysis has been performed in Excel, and graphs have been prepared using Prism 8. The gene-ontology analysis in Figure 2B, Figure 3B,D,F and Figure 4A–C was performed with the online version of Panther using the “GO biological process complete” as an annotation dataset, as the Fisher’s exact as a test type. The fold of enrichment and false discovery rate (FDR) were plotted using Prism 8. The comparison between the mRNAs that are degraded in *Xenopus* metaphase II oocytes and the mRNAs stabilized in *btg4*^{-/-} or *cnot6l*^{-/-} mouse metaphase II oocytes was performed in Excel. The raw dataset was obtained from Sha et al. [114].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/6/1502/s1>, Figure S1: Genome-wide analysis of fully-grown oocytes stimulated or not by progesterone for 90 minutes, Figure S2: Changes in translation efficiency during meiosis resumption and progression.

Author Contributions: F.M. and E.M.D. wrote the manuscript; A.D. and C.J. provided input, edits, and suggested revisions when preparing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: F.M. is the recipient of a 3-year Ph.D. fellowship by CNRS (French National Centre for Scientific Research). A.D. and E.M.D. received support from the Agence Nationale de la Recherche (18-CE13-0013-01). The laboratory is supported by Sorbonne Université and CNRS.

Acknowledgments: We apologize to those whose work was omitted from this necessarily selective survey of a vast body of research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Masui, Y.; Markert, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **1971**, *177*, 129–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dorée, M.; Hunt, T. From Cdc2 to Cdk1: When did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell. Sci.* **2002**, *115*, 2461–2464. [[PubMed](#)]
- Maller, J.L.; Butcher, F.R.; Krebs, E.G. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 579–582. [[PubMed](#)]
- Ozon, R.; Bellé, R.; Huchon, D.; Mulner, O. Roles of Cyclic AMP and Calcium in Maturation of *Xenopus Laevis* Oocytes. In *Hormonal Steroids*; Pergamon Press Ltd., Elsevier: Oxford, UK, 1979; pp. 709–713, ISBN 978-0-08-023796-1.
- Haccard, O.; Jessus, C. Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: Either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 321–325. [[CrossRef](#)]
- Wasserman, W.J.; Masui, Y. Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.* **1975**, *91*, 381–388. [[CrossRef](#)]
- Almonacid, M.; Al Jord, A.; El-Hayek, S.; Othmani, A.; Couplier, F.; Lemoine, S.; Miyamoto, K.; Grosse, R.; Klein, C.; Piolot, T.; et al. Active Fluctuations of the Nuclear Envelope Shape the Transcriptional Dynamics in Oocytes. *Dev. Cell* **2019**, *51*, 145–157. [[CrossRef](#)]
- Ferby, I.; Blazquez, M.; Palmer, A.; Eritja, R.; Nebreda, A.R. A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2177–2189. [[CrossRef](#)]
- Lenormand, J.-L. Speedy: A novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1869–1877. [[CrossRef](#)]

10. Sagata, N.; Oskarsson, M.; Copeland, T.; Brumbaugh, J.; Woude, G.F.V. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* **1988**, *335*, 519–525. [[CrossRef](#)]
11. Sagata, N.; Daar, I.; Oskarsson, M.; Showalter, S.; Vande Woude, G. The product of the mos proto-oncogene as a candidate “initiator” for oocyte maturation. *Science* **1989**, *245*, 643–646. [[CrossRef](#)]
12. Yew, N.; Mellini, M.L.; Martinez, C.K.; Woude, G.F.V. Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature* **1992**, *355*, 649–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Furuno, N.; Nishizawa, M.; Okazaki, K.; Tanaka, H.; Iwashita, J.; Nakajo, N.; Ogawa, Y.; Sagata, N. Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **1994**, *13*, 2399–2410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gross, S.D.; Schwab, M.S.; Taieb, F.E.; Lewellyn, A.L.; Qian, Y.W.; Maller, J.L. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 430–438. [[CrossRef](#)]
15. Dupre, A. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4026–4036. [[CrossRef](#)]
16. Frank-Vaillant, M.; Jessus, C.; Ozon, R.; Maller, J.L.; Haccard, O. Two Distinct Mechanisms Control the Accumulation of Cyclin B1 and Mos in *Xenopus* Oocytes in Response to Progesterone. *MBoC* **1999**, *10*, 3279–3288. [[CrossRef](#)]
17. Perez, L.H.; Antonio, C.; Flament, S.; Vernos, I.; Nebreda, A.R. Xkid chromokinesin is required for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 737–742. [[CrossRef](#)]
18. Igea, A.; Méndez, R. Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *EMBO J.* **2010**, *29*, 2182–2193. [[CrossRef](#)]
19. Tunquist, B.J.; Schwab, M.S.; Chen, L.G.; Maller, J.L. The Spindle Checkpoint Kinase Bub1 and Cyclin E/Cdk2 Both Contribute to the Establishment of Meiotic Metaphase Arrest by Cytostatic Factor. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1027–1033. [[CrossRef](#)]
20. Ohe, M.; Inoue, D.; Kanemori, Y.; Sagata, N. Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **2007**, *303*, 157–164. [[CrossRef](#)]
21. Pascreau, G.; Eckerdt, F.; Lewellyn, A.L.; Prigent, C.; Maller, J.L. Phosphorylation of p53 Is Regulated by TPX2-Aurora A in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 5497–5505. [[CrossRef](#)]
22. Lemaître, J.-M.; Bocquet, S.; Méchali, M. Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation. *Nature* **2002**, *419*, 718–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Whitmire, E.; Khan, B.; Coué, M. Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes. *Nature* **2002**, *419*, 722–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Daldello, E.M.; Le, T.; Poulhe, R.; Jessus, C.; Haccard, O.; Dupré, A. Control of Cdc6 accumulation by Cdk1 and MAPK is essential for completion of oocyte meiotic divisions in *Xenopus*. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 2482–2496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Charlesworth, A.; Yamamoto, T.M.; Cook, J.M.; Silva, K.D.; Kotter, C.V.; Carter, G.S.; Holt, J.W.; Lavender, H.F.; MacNicol, A.M.; Ying Wang, Y.; et al. *Xenopus laevis* zygote arrest 2 (zar2) encodes a zinc finger RNA-binding protein that binds to the translational control sequence in the maternal Wee1 mRNA and regulates translation. *Dev. Biol.* **2012**, *369*, 177–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Narasimhachar, Y.; Coué, M. Geminin Stabilizes Cdt1 during Meiosis in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27235–27242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wilczynska, A.; Git, A.; Argasinska, J.; Belloc, E.; Standart, N. CPEB and miR-15/16 Co-Regulate Translation of Cyclin E1 mRNA during *Xenopus* Oocyte Maturation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146792. [[CrossRef](#)]
28. Belloc, E.; Méndez, R. A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature* **2008**, *452*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
29. Muggenheimer, D.; Vesely, C.; Nimpf, S.; Tian, N.; Yongfeng, J.; Jantsch, M.F. Drosha protein levels are translationally regulated during *Xenopus* oocyte maturation. *MBoC* **2014**, *25*, 2094–2104. [[CrossRef](#)]
30. Lourim, D.; Kempf, A.; Krohne, G. Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: Increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J. Cell. Sci.* **1996**, *109*, 1775–1785.
31. Dumont, J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **1972**, *136*, 153–179. [[CrossRef](#)]

32. Huarte, J.; Stutz, A.; O'Connell, M.L.; Gubler, P.; Belin, D.; Darrow, A.L.; Strickland, S.; Vassalli, J.-D. Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell* **1992**, *69*, 1021–1030. [[CrossRef](#)]
33. Tian, B.; Graber, J.H. Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation: Polyadenylation signals. *WIREs RNA* **2012**, *3*, 385–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kim, J.H.; Richter, J.D. Opposing Polymerase-Deadenylase Activities Regulate Cytoplasmic Polyadenylation. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Radford, H.E.; Meijer, H.A.; de Moor, C.H. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *BBA Gene Regul. Mech.* **2008**, *1779*, 217–229. [[CrossRef](#)]
36. Christou-Kent, M.; Dhellemmes, M.; Lambert, E.; Ray, P.F.; Arnoult, C. Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte. *Cells* **2020**, *9*, 662. [[CrossRef](#)]
37. Session, A.M.; Uno, Y.; Kwon, T.; Chapman, J.A.; Toyoda, A.; Takahashi, S.; Fukui, A.; Hikosaka, A.; Suzuki, A.; Kondo, M.; et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* **2016**, *538*, 336–343. [[CrossRef](#)]
38. Opreško, L.K.; Wiley, H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4109–4115.
39. Jessus, C.; Ozon, R. How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol. Cell* **2004**, *96*, 187–192. [[CrossRef](#)]
40. Karaiskou, A. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development* **2004**, *131*, 1543–1552. [[CrossRef](#)]
41. Speaker, M.G.; Butcher, F.R. Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature* **1977**, *267*, 848–850. [[CrossRef](#)]
42. Maller, J.L.; Krebs, E.G. Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1712–1718.
43. Jessus, C.; Munro, C.; Houliston, E. Managing the Oocyte Meiotic Arrest—Lessons from Frogs and Jellyfish. *Cells* **2020**, *9*, 1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ríos-Cardona, D.; Ricardo-González, R.R.; Chawla, A.; Ferrell, J.E. A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.* **2008**, *317*, 380–388. [[CrossRef](#)]
45. Huchon, D.; Ozon, R.; Fischer, E.H.; Demaille, J.G. The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation: A 4-step scheme for meiotic maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1981**, *22*, 211–222. [[CrossRef](#)]
46. Rime, H.; Huchon, D.; Smedt, V.D.; Thibier, C.; Galaktionov, K.; Jessus, C.; Ozon, R. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol. Cell* **1994**, *82*, 11–22. [[CrossRef](#)]
47. Boyer, J.; Asselin, J.; Bellé, R.; Ozon, R. Progesterone and CAMP-Dependent Protein Kinase Regulate in Viva the Level of Phosphorylation of Two Proteins (Ad,20,000 and Ad,32,000) in *Xenopus* Oocytes. *Dev. Biol.* **1986**, *113*, 9. [[CrossRef](#)]
48. Dulubova, I.; Horiuchi, A.; Snyder, G.L.; Girault, J.-A.; Czernik, A.J.; Shao, L.; Ramabhadran, R.; Greengard, P.; Nairn, A.C. ARPP-16/ARPP-19: A highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 229–238. [[CrossRef](#)]
49. Dupré, A.; Daldello, E.M.; Nairn, A.C.; Jessus, C.; Haccard, O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nat. Commun* **2014**, *5*, 3318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lemonnier, T.; Daldello, E.M.; Pouhle, R.; Le, T.; Miot, M.; Jessus, C.; Dupré, A. The M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55δ opposes protein kinase A on Arpp19 to initiate meiotic division. *bioRxiv* **2020**.
51. Lemonnier, T.; Dupré, A.; Jessus, C. The G2-to-M transition from a phosphatase perspective: A new vision of the meiotic division. *Cell Div.* **2020**, *15*, 9. [[CrossRef](#)]
52. Dupre, A.; Buffin, E.; Roustan, C.; Nairn, A.C.; Jessus, C.; Haccard, O. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* **2013**, *126*, 3916–3926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Dupré, A.-I.; Haccard, O.; Jessus, C. The greatwall kinase is dominant over PKA in controlling the antagonistic function of ARPP19 in *Xenopus* oocytes. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 1440–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dupré, A.; Jessus, C. ARPP19 Phosphorylations by PKA and Greatwall: The Yin and the Yang of the Cell Decision to Divide. In *Protein Phosphorylation*; Prigent, C., Ed.; InTech: London, UK, 2017; ISBN 978-953-51-3625-5.
55. Talarek, N.; Cameroni, E.; Jaquenoud, M.; Luo, X.; Bontron, S.; Lippman, S.; Devgan, G.; Snyder, M.; Broach, J.R.; De Virgilio, C. Initiation of the TORC1-Regulated G0 Program Requires Igo1/2, which License Specific mRNAs to Evade Degradation via the 5'-3' mRNA Decay Pathway. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 345–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hemmings, H.C.; Greengard, P.; Tung, H.Y.L.; Cohen, P. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **1984**, *310*, 503–505. [[CrossRef](#)]
57. Hemmings, H.C.; Williams, K.R.; Konigsberg, W.H.; Greengard, P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. I. Amino acid sequence around the phosphorylated threonine. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14486–14490.
58. Karaïskou, A.; Cayla, X.; Haccard, O.; Jessus, C.; Ozon, R.
59. Huang, H.; Horiuchi, A.; Watanabe, T.; Shih, S.-R.; Tsay, H.-J.; Li, H.-C.; Greengard, P.; Nairn, A.C. Characterization of the Inhibition of Protein Phosphatase-1 by DARPP-32 and Inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* **1999**. [[CrossRef](#)]
60. Huchon, D.; Ozon, R.; Demaille, J.G. Protein phosphatase-1 is involved in *Xenopus* oocyte maturation. *Nature* **1981**, *294*, 358–359. [[CrossRef](#)]
61. Margolis, S.S.; Perry, J.A.; Weitzel, D.H.; Freel, C.D.; Yoshida, M.; Haystead, T.A.; Kornbluth, S. A Role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated Positive Feedback Activation of Cdc25. *MBoC* **2006**, *17*, 1779–1789. [[CrossRef](#)]
62. Han, S.J.; Chen, R.; Paronetto, M.P.; Conti, M. Wee1B Is an Oocyte-Specific Kinase Involved in the Control of Meiotic Arrest in the Mouse. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 1670–1676. [[CrossRef](#)]
63. Duckworth, B.C.; Weaver, J.S.; Ruderman, J.V. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16794–16799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Han, S.J.; Conti, M. New Pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B Complex in Oocytes: Wee1B as a Potential PKA Substrate. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 227–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Peng, C.-Y.; Graves, P.R.; Thoma, R.S.; Wu, Z.; Shaw, A.S.; Piwnicka-Worms, H. Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science* **1997**, *277*, 1501–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Nakajo, N.; Yoshitome, S.; Iwashita, J.; Iida, M.; Uto, K.; Ueno, S.; Okamoto, K.; Sagata, N. Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 328–338.
67. Okamoto, K.; Nakajo, N.; Sagata, N. The existence of two distinct Wee1 isoforms in *Xenopus*: Implications for the developmental regulation of the cell cycle. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2472–2484. [[CrossRef](#)]
68. Leise, W.F.; Mueller, P.R. Multiple Cdk1 Inhibitory Kinases Regulate the Cell Cycle during Development. *Dev. Biol.* **2002**, *249*, 156–173. [[CrossRef](#)]
69. Jessus, C.; Beach, D. Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* **1992**, *68*, 323–332. [[CrossRef](#)]
70. Peuchen, E.H.; Cox, O.F.; Sun, L.; Hebert, A.S.; Coon, J.J.; Champion, M.M.; Dovichi, N.J.; Huber, P.W. Phosphorylation Dynamics Dominate the Regulated Proteome during Early *Xenopus* Development. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15647. [[CrossRef](#)]
71. Nascimento, E.B.M.; Snel, M.; Guigas, B.; van der Zon, G.C.M.; Kriek, J.; Maassen, J.A.; Jazet, I.M.; Diamant, M.; Ouwens, D.M. Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 961–967. [[CrossRef](#)]
72. Yang, F.; Wang, W.; Cetinbas, M.; Sadreyev, R.; Blower, M. Genome-wide analysis identifies cis-acting elements regulating mRNA polyadenylation and translation during vertebrate oocyte maturation. *RNA* **2020**, 324–344. [[CrossRef](#)]
73. Brower, P.T.; Gizang, E.; Boreen, S.M.; Schultz, R.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte in vitro. *Dev. Biol.* **1981**, *86*, 373–383. [[CrossRef](#)]

74. Reis, A.; Chang, H.-Y.; Levasseur, M.; Jones, K.T. APC^{cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 539–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Subtelny, A.O.; Eichhorn, S.W.; Chen, G.R.; Sive, H.; Bartel, D.P. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* **2014**, *508*, 66–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Luong, X.G.; Daldello, E.M.; Rajkovic, G.; Yang, C.-R.; Conti, M. Genome-wide analysis reveals a switch in the translational program upon oocyte meiotic resumption. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 3257–3276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Hohegger, H.; Klotzbücher, A.; Kirk, J.; Howell, M.; le Guellec, K.; Fletcher, K.; Duncan, T.; Sohail, M.; Hunt, T. New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development* **2001**, *128*, 3795–3807. [[PubMed](#)]
78. Daldello, E.M.; Luong, X.G.; Yang, C.-R.; Kuhn, J.; Conti, M. Cyclin B2 is required for progression through meiosis in mouse oocytes. *Development* **2019**, *146*, dev172734. [[CrossRef](#)]
79. Verlhac, M.H.; Kubiak, J.Z.; Weber, M.; Géraud, G.; Colledge, W.H.; Evans, M.J.; Maro, B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* **1996**, *122*, 815–822.
80. Araki, K.; Naito, K.; Haraguchi, S.; Suzuki, R.; Yokoyama, M.; Inoue, M.; Aizawa, S.; Toyoda, Y.; Sato, E. Meiotic Abnormalities of c-mos Knockout Mouse Oocytes: Activation after First Meiosis or Entrance into Third Meiotic Metaphase I. *Biol. Reprod.* **1996**, *55*, 1315–1324. [[CrossRef](#)]
81. Tachibana, K.; Tanaka, D.; Isobe, T.; Kishimoto, T. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14301–14306. [[CrossRef](#)]
82. Mendez, R. Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *EMBO J.* **2002**, *21*, 1833–1844. [[CrossRef](#)]
83. Fisher, D.L.; Brassac, T.; Galas, S.; Dorée, M. Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development* **1999**, *126*, 4537–4546. [[PubMed](#)]
84. Castro, A.; Peter, M.; Magnaghi-Jaulin, L.; Vigneron, S.; Galas, S.; Lorca, T.; Labbé, J.-C. Cyclin B/cdc2 Induces c-Mos Stability by Direct Phosphorylation in *Xenopus* Oocytes. *MBoC* **2001**, *12*, 2660–2671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Stebbins-Boaz, B.; Hake, L.E.; Richter, J.D. CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* **1996**, *15*, 2582–2592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Charlesworth, A.; Cox, L.L.; MacNicol, A.M. Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE)- and CPE-binding Protein (CPEB)-independent Mechanisms Regulate Early Class Maternal mRNA Translational Activation in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17650–17659. [[CrossRef](#)]
87. Strickland, S.; Huarte, J.; Belin, D.; Vassalli, A.; Rickles, R.; Vassalli, J. Antisense RNA directed against the 3′ noncoding region prevents dormant mRNA activation in mouse oocytes. *Science* **1988**, *241*, 680–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Kuge, H.; Inoue, A. Maturation of *Xenopus laevis* oocyte by progesterone requires poly(A) tail elongation of mRNA. *Exp. Cell Res.* **1992**, *202*, 52–58. [[CrossRef](#)]
89. McGrew, L.L.; Dworkin-Rastl, E.; Dworkin, M.B.; Richter, J.D. Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 803–815. [[CrossRef](#)]
90. Fox, C.A.; Sheets, M.D.; Wickens, M.P. Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: Distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 2151–2162. [[CrossRef](#)]
91. Nakahata, S.; Kotani, T.; Mita, K.; Kawasaki, T.; Katsu, Y.; Nagahama, Y.; Yamashita, M. Involvement of *Xenopus* Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation. *Mech. Dev.* **2003**, *120*, 865–880. [[CrossRef](#)]
92. Piqué, M.; López, J.M.; Foissac, S.; Guigó, R.; Méndez, R. A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control. *Cell* **2008**, *132*, 434–448. [[CrossRef](#)]
93. Weill, L.; Belloc, E.; Castellazzi, C.L.; Méndez, R. Musashi 1 regulates the timing and extent of meiotic mRNA translational activation by promoting the use of specific CPEs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 672–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Hake, L.E.; Richter, J.D. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **1994**, *79*, 617–627. [[CrossRef](#)]
95. Charlesworth, A.; Wilczynska, A.; Thampi, P.; Cox, L.L.; MacNicol, A.M. Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2792–2801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Mendez, R.; Hake, L.E.; Andresson, T.; Littlepage, L.E.; Ruderman, J.V.; Richter, J.D. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **2000**, *404*, 302–307. [[CrossRef](#)]
97. Frank-Vaillant, M.; Haccard, O.; Thibier, C.; Ozon, R.; Arlot-Bonnemains, Y.; Prigent, C.; Jessus, C. Progesterone regulates the accumulation and the activation of Eg2 kinase in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* **2000**, *113*, 1127–1138.
98. Maton, G.; Thibier, C.; Castro, A.; Lorca, T.; Prigent, C.; Jessus, C. Cdc2-Cyclin B Triggers H3 Kinase Activation of Aurora-A in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21439–21449. [[CrossRef](#)]
99. Castro, A.; Mandart, E.; Lorca, T.; Galas, S. Involvement of Aurora A Kinase during Meiosis I-II Transition in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2236–2241. [[CrossRef](#)]
100. Keady, B.T.; Kuo, P.; Martinez, S.E.; Yuan, L.; Hake, L.E. MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* **2007**, *120*, 1093–1103. [[CrossRef](#)]
101. Komrskova, P.; Susor, A.; Malik, R.; Prochazkova, B.; Liskova, L.; Supolikova, J.; Hladky, S.; Kubelka, M. Aurora Kinase A Is Not Involved in CPEB1 Phosphorylation and cyclin B1 mRNA Polyadenylation during Meiotic Maturation of Porcine Oocytes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101222. [[CrossRef](#)]
102. Han, S.J.; Martins, J.P.S.; Yang, Y.; Kang, M.K.; Daldello, E.M.; Conti, M. The Translation of Cyclin B1 and B2 is Differentially Regulated during Mouse Oocyte Reentry into the Meiotic Cell Cycle. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14077. [[CrossRef](#)]
103. Padmanabhan, K. Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Arumugam, K.; MacNicol, M.C.; Wang, Y.; Cragle, C.E.; Tackett, A.J.; Hardy, L.L.; MacNicol, A.M. Ringo/Cyclin-dependent Kinase and Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathways Regulate the Activity of the Cell Fate Determinant Musashi to Promote Cell Cycle Re-entry in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 10639–10649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Wasserman, W.J.; Richter, J.D.; Smith, L.D. Protein synthesis during maturation promoting factor- and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **1982**, *89*, 152–158. [[CrossRef](#)]
106. Richter, J.D.; Wasserman, W.J.; Smith, L.D. The mechanism for increased protein synthesis during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev. Biol.* **1982**, *89*, 159–167. [[CrossRef](#)]
107. Hyman, L.E.; Wormington, W.M. Translational inactivation of ribosomal protein mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation. *Genes Dev.* **1988**, *2*, 598–605. [[CrossRef](#)]
108. Chen, J.; Melton, C.; Suh, N.; Oh, J.S.; Horner, K.; Xie, F.; Sette, C.; Blelloch, R.; Conti, M. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 755–766. [[CrossRef](#)]
109. Sheets, M.D.; Fox, C.A.; Hunt, T.; Vande Woude, G.; Wickens, M. The 3'-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 926–938. [[CrossRef](#)]
110. Robbie, E.P.; Peterson, M.; Amaya, E.; Musci, T.J. Temporal regulation of the *Xenopus* FGF receptor in development: A translation inhibitory element in the 3' untranslated region. *Development* **1995**, *121*, 1775–1785.
111. Reverte, C.G.; Ahearn, M.D.; Hake, L.E. CPEB Degradation during *Xenopus* Oocyte Maturation Requires a PEST Domain and the 26S Proteasome. *Dev. Biol.* **2001**, *231*, 447–458. [[CrossRef](#)]
112. Setoyama, D.; Yamashita, M.; Sagata, N. Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18001–18006. [[CrossRef](#)]
113. Sha, Q.-Q.; Dai, X.-X.; Dang, Y.; Tang, F.; Liu, J.; Zhang, Y.-L.; Fan, H.-Y. A MAPK cascade couples maternal mRNA translation and degradation to meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Development* **2017**, *144*, 452–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Sha, Q.; Yu, J.; Guo, J.; Dai, X.; Jiang, J.; Zhang, Y.; Yu, C.; Ji, S.; Jiang, Y.; Zhang, S.; et al. CNOT 6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. *EMBO J.* **2018**, *37*. [[CrossRef](#)]
115. Wang, Y.Y.; Charlesworth, A.; Byrd, S.M.; Gregerson, R.; MacNicol, M.C.; MacNicol, A.M. A novel mRNA 3' untranslated region translational control sequence regulates *Xenopus* Wee1 mRNA translation. *Dev. Biol.* **2008**, *317*, 454–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Su, Y.-Q.; Sugiura, K.; Woo, Y.; Wigglesworth, K.; Kamdar, S.; Affourtit, J.; Eppig, J.J. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 104–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wu, D.; Dean, J. EXOSC10 sculpts the transcriptome during the growth-to-maturation transition in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res.* **2020**, gkaa249. [[CrossRef](#)]
118. Yu, C.; Ji, S.-Y.; Sha, Q.-Q.; Dang, Y.; Zhou, J.-J.; Zhang, Y.-L.; Liu, Y.; Wang, Z.-W.; Hu, B.; Sun, Q.-Y.; et al. BTG4 is a meiotic cell cycle-coupled maternal-zygotic-transition licensing factor in oocytes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 387–394. [[CrossRef](#)]
119. Ma, J.; Flemr, M.; Strnad, H.; Svoboda, P.; Schultz, R.M. Maternally Recruited DCP1A and DCP2 Contribute to Messenger RNA Degradation During Oocyte Maturation and Genome Activation in Mouse1. *Biol. Reprod.* **2013**, *88*. [[CrossRef](#)]
120. Medvedev, S.; Yang, J.; Hecht, N.B.; Schultz, R.M. CDC2A (CDK1)-mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* **2008**, *321*, 205–215. [[CrossRef](#)]
121. Medvedev, S.; Pan, H.; Schultz, R.M. Absence of MSY2 in Mouse Oocytes Perturbs Oocyte Growth and Maturation, RNA Stability, and the Transcriptome. *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 575–583. [[CrossRef](#)]
122. Ivanova, I.; Much, C.; Di Giacomo, M.; Azzi, C.; Morgan, M.; Moreira, P.N.; Monahan, J.; Carrieri, C.; Enright, A.J.; O'Carroll, D. The RNA m 6 A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 1059–1067. [[CrossRef](#)]
123. Schier, A.F. The Maternal-Zygotic Transition: Death and Birth of RNAs. *Science* **2007**, *316*, 406–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Varnum, S.M.; Wormington, W.M. Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: A default mechanism for translational control. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 2278–2286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Ingolia, N.T.; Ghaemmaghami, S.; Newman, J.R.S.; Weissman, J.S. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* **2009**, *324*, 218–223. [[CrossRef](#)]
126. Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F.D.; Gygi, S.P.; Bartel, D.P. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **2008**, *455*, 64–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Schwanhäusser, B.; Busse, D.; Li, N.; Dittmar, G.; Schuchhardt, J.; Wolf, J.; Chen, W.; Selbach, M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **2011**, *473*, 337–342. [[CrossRef](#)]



III. Résultats

A. Présentation de l'article N°1 : Translational Control of *Xenopus* Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era

Après seulement cinq mois passés au laboratoire, la partie expérimentale de mon doctorat a été brutalement stoppée par la crise du Covid19 et la mise en place du premier confinement. Cette période fut alors l'occasion de m'intéresser de plus près à mon sujet d'un point de vue historique et bibliographique. D'autant plus qu'il me fut proposé de m'impliquer dans la rédaction d'un article de revue piloté par Enrico-Maria Daldello, qui était alors chercheur postdoctoral dans l'équipe (il est maintenant chercheur CNRS, toujours dans l'équipe), suite à plusieurs années de post-doc à UCSF (Université de Californie à San Francisco). Cette revue avait pour principal objectif de faire le bilan de la régulation exercée par la traduction protéique sur la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope. En effet, la traduction de nouvelles protéines est nécessaire à l'activation du MPF dans l'ovocyte de Xénope. Comme je l'ai abordé dans la partie introductive, la maturation méiotique est bloquée par des inhibiteurs de la synthèse protéique, comme la cycloheximide, la puromycine ou l'émétine (alors que la transcription n'est en revanche pas requise) (Wasserman and Masui, 1975; Maller and Krebs, 1980; Huchon *et al.*, 1981; Picard *et al.*, 1985). Chez le Xénope, deux vagues de traduction ont des rôles importants : la première est nécessaire à l'activation du MPF ; la seconde, qui survient en aval du MPF, permet la synthèse de protéines nécessaires aux divisions méiotiques et embryonnaires. La seconde vague traductionnelle est retrouvée chez les ovocytes de tous les animaux étudiés jusqu'à présent : quelle que soit l'espèce, l'inhibition de la synthèse protéique suite à l'activation du MPF, au moment de GVBD, perturbe ou abolit les divisions méiotiques. En revanche, les traductions protéiques de la première vague, en amont du MPF et nécessaires à l'activation de ce dernier, ne sont pas mises en place chez toutes les espèces. Cette première vague est retrouvée chez tous les vertébrés étudiés à l'exception notable des rongeurs, mais elle ne survient pas chez la majorité des ovocytes d'espèces non-vertébrées étudiées jusqu'à présent. La seconde vague de traduction a été beaucoup plus étudiée que la première, notamment chez la souris. Les questions qui se posent au sujet de la première vague sont de plusieurs ordres : Quelle est l'identité des protéines requises pour l'activation du MPF et lesquelles sont synthétisées *de novo* ? Quel est leur rôle ?

Quels sont les mécanismes moléculaires permettant de lancer la traduction d'ARNm spécifiques ? Comment la kinase PKA contrôle-t-elle ces nouvelles traductions ?

Cet article de revue mêle analyse bibliographique et ré-analyses de jeux de données massives transcriptomiques, protéomiques et phospho-protéomiques précédemment publiés. Cette nouvelle exploitation permet non seulement de dégager des candidats et des pistes d'investigations expérimentales, mais aussi d'évaluer de façon critique les protocoles expérimentaux à l'origine de ces jeux de données et dont les déficiences peuvent remettre en question leur fiabilité. Au-delà du travail bibliographique et des discussions (par Zoom) que la conception et la rédaction de cet article ont générés, j'ai ainsi pu prendre part au processus de rédaction d'un article et découvrir les différentes étapes par lesquelles il passe avant sa publication, de la soumission jusqu'aux révisions et réponses aux referees. Cela m'a par ailleurs permis de m'immerger dans mon sujet de thèse mais aussi de mieux comprendre les outils d'analyse de données -omiques. Cette revue a fait l'objet d'une publication dans la revue *Cells* en 2020.

B. Phosphorylation d'ARPP19 par PKA dans l'ovocyte, émergence chez les vertébrés

1. Introduction

Dans tout le règne animal, la méiose des ovocytes s'interrompt en prophase de première division méiotique, dans les ovaires. Cet arrêt est crucial car il permet à l'ovocyte de s'équiper moléculairement pour sa progression ultérieure en méiose et d'accumuler des réserves énergétiques et informatives nécessaires aux premières étapes du développement du futur embryon. Ce blocage en prophase s'explique par le maintien dans un état inactif du complexe protéique moteur de la division méiotique mais aussi mitotique, appelé le MPF (*M-phase promoting factor*) (Masui and Markert, 1971a). Le MPF est un complexe composé de la kinase Cdk1 et de la Cycline B. Il est présent sous la forme d'un complexe inactif dans l'ovocyte et ceci jusqu'à ce qu'une stimulation hormonale déclenche une voie de signalisation conduisant à son activation (**Fig. 17**). Celle-ci induit la première division méiotique de l'ovocyte, puis la seconde division qui suit la première sans passage par une interphase répllicative. La progression dans les divisions méiotiques s'interrompt à nouveau, à un stade variable selon les espèces (**Fig. 20**) (Colas and Guerrier, 1995): métaphase II chez les vertébrés, phase G1 suivant l'accomplissement des deux divisions méiotiques chez de nombreuses espèces de non-vertébrés (comme *Clytia*, mais aussi les échinodermes), métaphase I chez certains mollusques et chez les ascidies. C'est la fécondation qui lève ce second arrêt et permet l'achèvement des divisions méiotiques et/ou les divisions embryonnaires. Chez quelques espèces, comme le mollusque *Spisula solidissima*, seul l'arrêt en prophase récapitule le tout : la fécondation a lieu dans l'ovocyte en prophase et déclenche les divisions méiotiques de l'ovocyte. Ces événements, depuis la stimulation hormonale de l'ovocyte en prophase I jusqu'au second arrêt de la méiose, sont appelés « maturation méiotique » et sont contemporains de l'ovulation (**Fig. 20**).

Le signal hormonal induisant la reprise de la méiose est appelé MIH (*Maturation Inducing Hormone*) (**Fig. 20**). Ce point de départ peut être de nature chimique très différente suivant les espèces : 1-méthyl-adénine chez les étoiles de mer, sérotonine chez beaucoup de mollusques bivalves, petits peptides amidés chez les hydrozoaires, progestérone chez les amphibiens, 17α - 20β -dihydroxy-progestérone chez les poissons, etc.) (Jesus *et al.* 2020). Chez les mammifères, c'est la rupture des jonctions de type Gap entre cellules folliculaires et

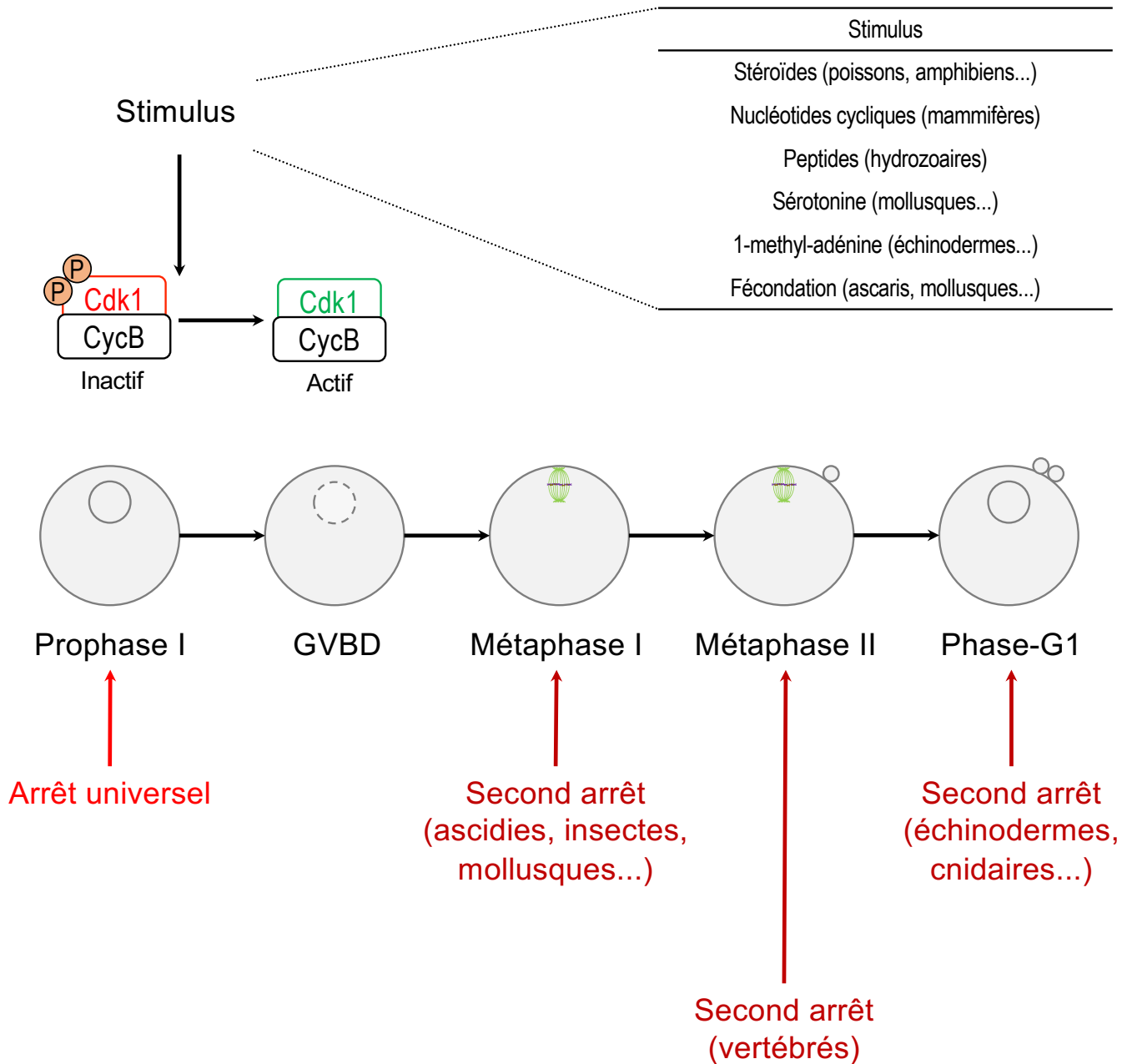


Figure 20 : Arrêts de la méiose de l'ovocyte chez les animaux.

Chez toutes les espèces animales, la méiose des ovocytes s'interrompt en prophase de première division (Prophase I). Un stimulus physiologique, de nature chimique variée selon les espèces, lève cet arrêt, permettant l'activation du MPF, la rupture de l'enveloppe nucléaire (appelée GVBD pour *Germinal Vesicle BreakDown*) et la formation du fuseau méiotique de métaphase I. Les divisions méiotiques subissent un second arrêt à un stade variable selon les espèces : Métaphase I, Métaphase II, ou phase-G1 suite à la seconde division méiotique. Ce second arrêt est levé par la pénétration du noyau du spermatozoïde. Chez certaines espèces, cette fusion avec le sperme se déroule en prophase I et déclenche donc les divisions méiotiques sans arrêt secondaire.

ovocytes qui déclenche la reprise de la méiose et non un stimulus hormonal agissant directement sur l'ovocyte. Les récepteurs cibles de l'ovocyte varient donc énormément d'une espèce à l'autre et n'ont pas toujours été identifiés, comme chez le Xénope où la situation reste à clarifier. De manière non surprenante, au sein de l'ovocyte, le point de départ de la voie de signalisation conduisant à l'activation du MPF sera différent suivant les récepteurs impliqués et donc suivant les espèces (**Fig. 20**). Chez tous les vertébrés, l'arrêt en prophase I est dû à la présence dans l'ovocyte d'un taux élevé d'AMPc. Son effecteur est la kinase PKA qui, en présence d'AMPc, est active et phosphoryle divers substrats, dont l'identité dans les ovocytes reste pour la plupart d'entre eux à déterminer. L'un d'entre eux a été identifié il y a une dizaine d'années dans l'ovocyte de Xénope : il s'agit de la protéine ARPP19. Son rôle dans l'arrêt en prophase est crucial : en effet, sa phosphorylation par PKA est suffisante pour maintenir les ovocytes en prophase I (Dupré *et al.*, 2014a).

Chez de nombreuses espèces non-vertébrés, comme certaines étoiles de mer (*Amphipholis kochii*), certains némertiens, annélides, ascidies (Deguchi, Takeda and Stricker, 2011) ou encore certains hydrozoaires comme la méduse *Clytia hemisphaerica*, l'activation du MPF dépend également du niveau d'AMPc, mais de façon opposée à ce qui se passe chez les vertébrés. Chez ces espèces, c'est une augmentation du taux d'AMPc et donc une activation de PKA qui est nécessaire pour induire la voie de signalisation menant à l'activation du MPF (Deguchi, Takeda and Stricker, 2011). Enfin, la voie de signalisation opérant lors de la reprise de la méiose peut ne pas impliquer l'AMPc du tout chez certaines espèces non-vertébrées.

Je me suis intéressé aux questions posées par ce que nous avons appelé le « paradoxe de l'AMPc » : l'activation du MPF, chez les vertébrés, dépend d'une chute d'AMPc et d'une baisse de l'activité de PKA alors que chez d'autres espèces non-vertébrées, cette activation dépend d'une hausse d'AMPc et de l'activité PKA (**Fig. 21**). Comment des points de départ radicalement opposés (hausse ou chute de l'activité de PKA) peuvent-ils aboutir au même résultat final (activation du MPF) ? Dans un cas (vertébrés), un ou des substrats de PKA interdisent la reprise de la méiose lorsqu'ils sont sous forme phosphorylée. Dans l'autre, c'est le contraire : un ou des substrats de PKA provoquent la reprise de la méiose lorsqu'ils sont sous forme phosphorylée. Ces substrats ne peuvent pas être *a priori* les mêmes. Que se passe-t-il néanmoins si les substrats de PKA de l'un sont exprimés chez l'autre ?

Pour aborder cette question, nous avons décidé d'entreprendre une étude comparative du mécanisme PKA dans les ovocytes de *Xenopus laevis* et *Clytia hemisphaerica*,

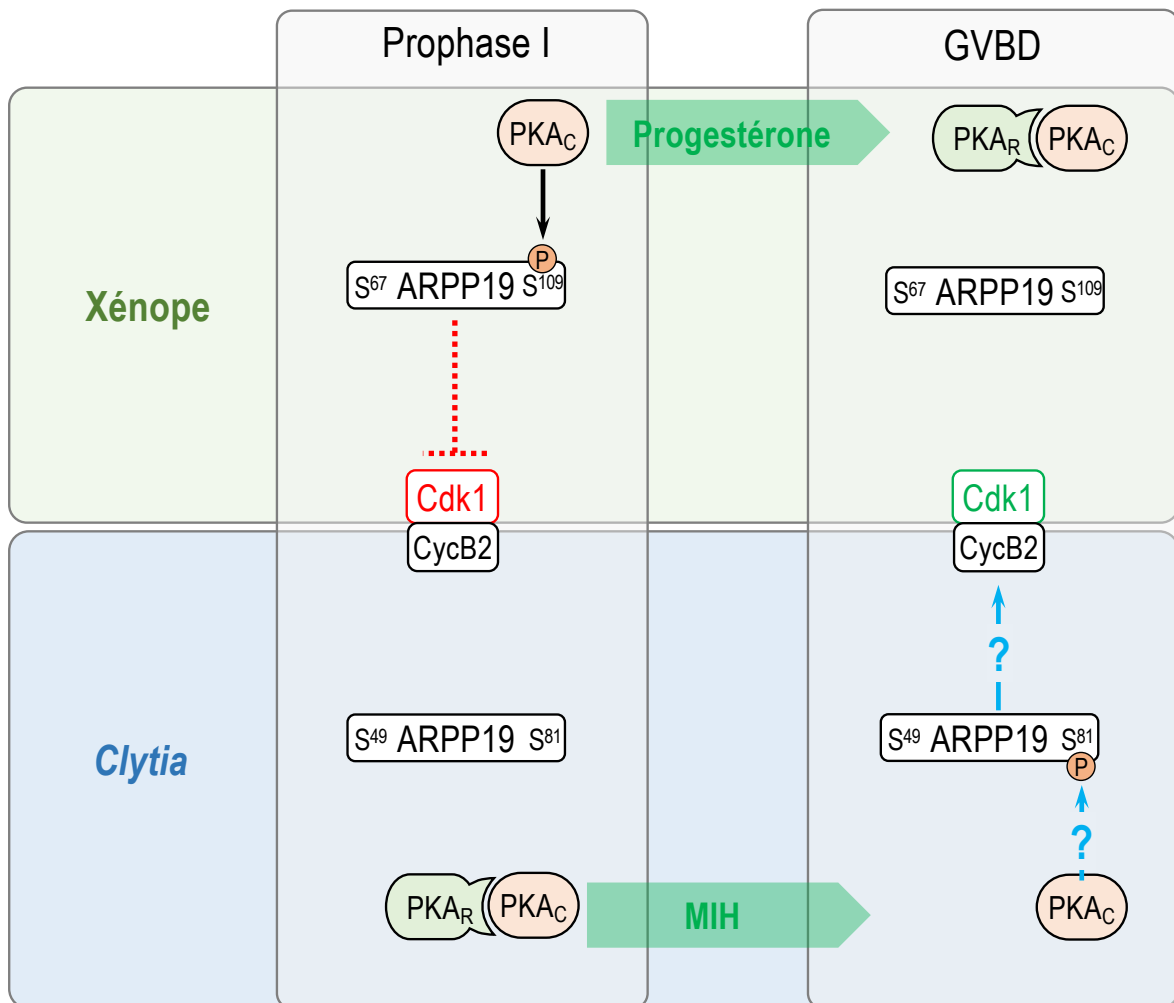


Figure 21 : Le paradoxe « PKA » entre l'ovocyte de Xénope et l'ovocyte de Clytia.

L'arrêt en prophase chez le Xénope est maintenu par l'activité de la sous-unité catalytique PKA_C qui phosphoryle notamment la protéine ARPP19 sur S109. Cette phosphorylation concourt au maintien du MPF inactif jusqu'à la stimulation hormonale par la progestérone. Cette stimulation inactive PKA_C en permettant la liaison avec sa sous-unité régulatrice PKA_R. La déphosphorylation d'ARPP19 est un des premiers événements qui conduira à l'activation du MPF et la reprise de la méiose. A l'inverse chez *Clytia*, PKA_C, en complexe avec PKA_R, est inactivé durant l'arrêt en prophase. PKA s'active seulement à la suite de la stimulation hormonale par le MIH et conduit à l'activation du MPF. ARPP19 étant présent chez *Clytia*, deux questions se posent : 1) est-il phosphorylé par PKA ? 2) est-il capable de réguler le MPF sous sa forme phosphorylée par PKA ?

deux espèces dont le niveau d'AMPc est inversé lors de la reprise de la méiose. Chez *Clytia*, il a été montré que ce n'est pas l'inactivation de PKA qui est l'élément déclencheur de la reprise de la méiose, mais au contraire son activation qui induit la maturation de l'ovocyte (Jesus, Munro and Houliston, 2020; Houliston *et al.*, 2022). De plus, chez *Clytia*, le MIH et son récepteur ont été identifiés (Quiroga Artigas *et al.*, 2020). L'équipe d'Evelyn Houliston avec laquelle nous avons collaboré pour cette étude, a montré que l'ARNm codant pour ARPP19 était présent dans l'ovocyte de *Clytia*. Chez cette espèce, l'expression d'un ARNm est étroitement corrélée avec celle de la protéine pour laquelle il code, suggérant la présence d'ARPP19, le substrat de PKA identifié dans l'ovocyte de Xénope.

Chez le Xénope, comme dit précédemment, la phosphorylation par PKA conduit ARPP19 à interdire l'activation du MPF et maintient l'ovocyte en prophase. On se trouve donc dans le cas de figure paradoxal décrit précédemment où un substrat de PKA, ARPP19, dont la phosphorylation inhibe l'activation du MPF chez le Xénope, est exprimé chez une espèce, *Clytia*, où l'on attend des substrats de PKA qu'ils activent le MPF (**Fig. 21**). Comment, chez *Clytia*, ARPP19 ne bloque-t-il pas la maturation méiotique ? La fonction du site 109, phosphorylé par PKA chez le Xénope, dans le blocage en prophase est-elle conservée ?

Dans ce travail, nous avons débuté notre étude par une analyse d'alignements de séquences pour évaluer le degré de conservation du site S109 chez les eucaryotes. Puis nous avons comparé la propriété la plus évidente des deux protéines, XeARPP19 (ARPP19 de Xénope) et ClyARPP19 (ARPP19 de *Clytia*), pouvant expliquer leur fonction chez une espèce et l'absence de cette fonction chez l'autre : leur capacité à être phosphorylé par PKA *in vitro*, ainsi qu'*in vivo* dans les ovocytes de Xénope et de *Clytia*. Enfin, leur fonction dans le maintien ou la reprise de la méiose chez ces deux espèces a été explorée. Ce travail a fait l'objet d'un article déposé sur la plateforme bioRxiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.07.05.547804v1>) et en cours de review par le système Review Commons (<https://www.reviewcommons.org/>).

2. Article 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

Cross-species analysis of ARPP19 phosphorylation during oocyte meiotic maturation charts the emergence of a new cAMP-dependent role in vertebrates

¹Ferdinand Meneau, ²Pascal Lapébie, ¹Enrico Maria Daldello, ¹Tran Le, ²Sandra Chevalier, ²Evelyn Houliston, ¹Catherine Jessus, ^{1*}Marika Miot

¹Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement - Institut de Biologie Paris Seine, LBD - IBPS, F-75005 Paris, France

²Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-mer (LBDV), F-06230 Villefranche-sur-mer, France

*Corresponding author
marika.miot-marinho@upmc.fr

Running title: ARPP19 and PKA in *Clytia* and *Xenopus* oocytes

Keywords: oocyte; meiotic maturation; *Clytia*; *Xenopus*; ARPP19; cAMP; PKA; Cdk1

1 **ABSTRACT**

2 In many animal species, elevated cAMP-PKA signaling initiates oocyte meiotic maturation
3 upon hormonal stimulation, whereas in vertebrates, it acts as a negative regulator of this
4 process. To address this “cAMP paradox”, we have focused on ARPP19 proteins.
5 Dephosphorylation of *Xenopus* ARPP19 on a specific PKA site has been identified as a key step
6 in initiating oocyte maturation. We first tracked evolution of the ARPP19 PKA phosphorylation
7 site, revealing that it appeared early during the emergence of metazoans. This contrasts with
8 strong conservation across eukaryotes of a phosphorylation site for the kinase Gwl in ARPP19
9 proteins, able to transform them into potent PP2A-B55 inhibitors and thus promote M-phase
10 entry. We then compared the phosphorylation and function of *Xenopus* ARPP19 with its
11 orthologue from the jellyfish *Clytia*, a model species showing cAMP-induced oocyte
12 maturation. We confirmed that *Clytia* ARPP19 is phosphorylated on the conserved Gwl site *in*
13 *vitro* as well as in maturing *Xenopus* and *Clytia* oocytes, behaving as a PP2A inhibitor and
14 contributing to Cdk1 activation. However, Gwl-phosphorylated ARPP19 was unable to initiate
15 oocyte maturation in *Clytia*, suggesting the presence of additional locks released by hormonal
16 stimulation. *Clytia* ARPP19 was *in vitro* phosphorylated by PKA uniquely on the predicted site,
17 but it was a much poorer substrate of PKA and of its antagonizing phosphatase, PP2A-B55 δ ,
18 than the *Xenopus* protein. Correspondingly, PKA-phosphomimetic *Clytia* ARPP19 had a much
19 weaker inhibitory activity on meiosis resumption in *Xenopus* oocytes than its *Xenopus*
20 counterpart. Hence, poor recognition of *Clytia* ARPP19 by PKA and the absence of its targets
21 in *Clytia* oocytes account for the cAMP paradox. This cross-species study of ARPP19 illustrates
22 how initiation of oocyte maturation has complexified during animal evolution, and provides
23 further insight into its biochemical regulation.

24

25

1 INTRODUCTION

2 Meiosis in ovarian oocytes is arrested at the first prophase stage, until appropriate hormonal
3 stimulation triggers progression into the meiotic divisions and the accompanying
4 “maturation” events that prepare the egg for fertilisation. The molecular mechanisms
5 responsible for maintaining and then releasing the prophase arrest of fully-grown ovarian
6 oocytes have been the subject of intense study in several animal model species, but the
7 regulation has proved very difficult to fully decipher and many questions remain open (Jesus
8 *et al*, 2020). This reflects in part the convoluted evolutionary history of reproductive biology,
9 in which the tissular origin and molecular nature of upstream regulating hormones has
10 complexified independently in different animal lineages. As a consequence, the “Maturation
11 Inducing Hormones” (MIHs) directly responsible for releasing the prophase arrest have varied
12 molecular natures across species, and thus trigger distinct cytoplasmic signaling pathways
13 (Quiroga Artigas *et al*, 2020; Von Stetina & Orr-Weaver, 2011; Voronina & Wessel, 2003).
14 These diverse signaling pathways nevertheless all converge to activate a highly conserved
15 kinase activation system that initiates entry into M-phase and thus the first meiotic division.
16 The core element of this system is the Cdk1-Cyclin B complex known as MPF (M-phase
17 promoting factor), which initiates M-phase by the phosphorylation of multiple substrates
18 (Kishimoto, 2018; Masui, 2001). In this study, we take a comparative approach between two
19 species that use opposing signaling pathways to trigger oocyte maturation initiation, in order
20 to help unpick the hierarchy of regulations upstream of MPF activation. Specifically, we
21 address the “cAMP paradox”, whereby cAMP/PKA signaling inhibits oocyte maturation
22 initiation in vertebrates but triggers it in many other species, focusing on the sequence,
23 phosphorylation characteristics and function of the regulatory protein ARPP19 from the
24 amphibian *Xenopus* and its orthologue in the hydrozoan *Clytia*.

25 In vertebrates, high levels of intracellular cAMP and cAMP-dependent kinase (PKA) activity are
26 essential in maintaining the prophase arrest. MIH stimulation induces a drop of both cAMP
27 levels and of PKA activity to launch a signaling pathway leading to MPF activation, manifest as
28 disassembly of the nuclear envelope, referred as GVBD for germinal vesicle breakdown (Maller
29 *et al*, 1979; Ozon *et al*, 1979; Wang & Liu, 2004). cAMP levels and PKA activity can be
30 experimentally manipulated by either inhibiting or stimulating the two antagonistic enzyme
31 families that control cAMP level, adenylate cyclases and phosphodiesterases, or by
32 overexpression or specific inhibition of PKA. Such experiments have revealed that in
33 mammals, amphibia and fish oocytes, any elevation in cAMP or PKA activity blocks meiotic
34 resumption induced by MIH, whereas cAMP decrease or PKA inhibition is sufficient to trigger
35 meiotic resumption in the absence of MIH (Conti *et al*, 2002; Eyers *et al*, 2005; Huchon *et al*,
36 1981; Kovo *et al*, 2006; Maller & Krebs, 1977). Although the necessity of a drop in cAMP and
37 PKA activity for meiosis resumption in *Xenopus* has been questioned (Nader *et al*, 2016), high
38 levels of cAMP and PKA activity thus clearly play central roles in maintaining the prophase
39 arrest in all vertebrates studied to date.

40 In various studied animal species from various non-vertebrate taxa, distinct signaling systems
41 have been shown to be involved in maintaining or releasing the oocyte prophase arrest, some

1 dependent on cAMP and PKA and some not. Remarkably, in several cases, cytoplasmic cAMP
2 concentrations and PKA activity in the oocyte rise in response to MIH stimulation, and thus
3 act as positive rather than negative regulators (Deguchi *et al*, 2011). Such cAMP rises during
4 meiosis resumption have been documented in the brittle star *Amphipholis kochii*
5 (echinoderm) (Yamashita, 1988), various nemertean (Stricker & Smythe, 2001), the surf clam
6 *Spisula solidissima* (mollusk) (Yi *et al*, 2002) and multiple hydrozoan species (Freeman &
7 Ridgway, 1988; Takeda *et al*, 2006). Moreover, in these species, but also in *Boltenia villosa*
8 (ascidian) (Lambert, 2011), *Pseudopotamilla ocellata* (annelid) (Deguchi *et al.*, 2011) and
9 hydrozoans including *Cytaeis uchidae* and *Clytia hemisphaerica* (Amiel & Houliston, 2009;
10 Takeda *et al.*, 2006), meiosis resumption is triggered by externally-applied membrane-
11 permeable cAMP, or cAMP injection, or by activators of adenylate cyclase or inhibitors of
12 phosphodiesterase that increase cAMP. From these observations it is clear that in many
13 animal species PKA is essential for triggering the pathway leading to MPF activation in
14 response to MIH, and thus has a role opposite to that in vertebrates. The evolutionary history
15 of this regulation is complex since in other cases including some echinoderms and ascidians,
16 no role for cAMP has been detected in meiotic resumption, which is mediated by distinct
17 signaling pathways (Deguchi *et al.*, 2011).

18 The small protein ARPP19 (cAMP-regulated phosphoprotein 19), which in vertebrates has a
19 paralog called ENSA, belongs to the Endosulfine protein family, widespread across eukaryotes
20 (Labandera *et al*, 2015). In *Xenopus* oocytes, ARPP19 is phosphorylated by PKA on serine 109
21 (S109) and this S109-phosphorylated form is involved in maintaining the arrest in prophase
22 (Dupre *et al*, 2014). In response to the *Xenopus* MIH, progesterone, ARPP19 becomes
23 dephosphorylated on S109 by a specific phosphatase, PP2A-B55 δ , authorizing the release of
24 the prophase block (Labbe *et al*, 2021; Lemonnier *et al*, 2021). Subsequently, ARPP19 plays a
25 second role in meiotic maturation, one widely shared with other dividing cells. It mediates
26 inhibition of the PP2A-B55 δ phosphatase, which is necessary for Cdk1 activation and thus
27 entry into M-phase (Mochida *et al*, 2009; Vigneron *et al*, 2009). This inhibition is achieved by
28 a distinct phosphorylation of ARPP19, by the protein kinase Greatwall (Gwl), on serine 67 (S67)
29 (Dupre *et al*, 2013; Gharbi-Ayachi *et al*, 2010; Mochida *et al*, 2010). This specific
30 phosphorylation converts ARPP19 into a potent and specific inhibitor of PP2A-B55 δ and allows
31 Cdk1 activation. ARPP19 thus assumes successively two distinct functions during *Xenopus*
32 meiosis resumption. Its phosphorylation on S109 by PKA maintains the prophase arrest such
33 that dephosphorylation on this site by PP2A-B55 δ releases the prophase block. A poorly
34 understood molecular signaling cascade is then induced leading to the phosphorylation of
35 ARPP19 on S67 by Gwl. This inhibits PP2A-B55 δ and activates Cdk1.

36 The positive role of ARPP19 on Cdk1 activation, through the S67 phosphorylation by Gwl,
37 appears to be widespread across all eukaryotic mitotic and meiotic divisions (Dupre & Jessus,
38 2017). In contrast, the PKA-dependence of ARPP19 on the oocyte meiotic prophase
39 arrest has only been studied so far in *Xenopus* (Dupre *et al.*, 2013; Dupre *et al.*, 2014; Dupre
40 *et al.*, 2017; Lemonnier *et al.*, 2021). Here we investigate the phospho-regulation and role
41 during oocyte maturation of ARPP19 from *Clytia hemisphaerica*, a laboratory model

1 hydrozoan species well suited to oogenesis studies (Amiel *et al*, 2009; Jesus *et al.*, 2020;
2 Lechable *et al*, 2020; Munro *et al*, 2023; Quiroga Artigas *et al*, 2018). Meiotic maturation in
3 hydrozoan oocytes is initiated by a rise in intracellular cAMP and PKA activity downstream of
4 GPCR-G α_s signaling (Freeman & Ridgway, 1988; Quiroga Artigas *et al.*, 2020; Takeda *et al.*,
5 2006). We first compared the sequence of ARPP19 proteins across eukaryotes to track its
6 evolution, focusing specifically on the phosphorylation site by PKA. We then explored and
7 compared the phosphorylation of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 proteins on the PKA-site and
8 the Gwl-site. This functional comparative study revealed that, despite a recognisable and
9 functional site of phosphorylation by PKA that emerged during animal evolution, *Clytia*
10 ARPP19 is a poor substrate for PKA and PP2A-B55, the two enzymes regulating this
11 phosphorylation site. Furthermore, the targets of ARPP19 regulating the resumption of
12 meiosis in *Xenopus* are not functionally detectable in *Clytia* oocytes. These two features
13 account for the ability of PKA activity to trigger meiosis resumption in *Clytia* oocyte despite
14 the presence of ARPP19. More broadly, our results provide new perspectives regarding the
15 intramolecular regulation of ARPP19 functions and the evolutionary scenarios underlying a
16 universal feature of animal reproductive biology: maintenance and release of the oocyte
17 prophase arrest.
18

1 RESULTS

2 The PKA phosphorylation site of ARPP19 is restricted to animals

3 To understand better the dual role of ARPP19 in regulating *Xenopus* oocyte meiotic
4 maturation, we addressed the evolutionary conservation of the key sequence motifs
5 phosphorylated by Gwl and PKA. Previous analyses focused on the site for phosphorylation by
6 Gwl, which is highly conserved across eukaryotes suggesting an ancient origin and conserved
7 function (Labandera *et al.*, 2015). In this work, we examined more specifically the conservation
8 of the PKA phosphorylation site, identified by functional analysis in various metazoans
9 (Dulubova *et al.*, 2001; Dupre *et al.*, 2014; Horiuchi *et al.*, 1990).

10 We aligned ARPP19 protein sequences recovered from publicly available genomic
11 /transcriptome data from plants, fungi, choanoflagellates, teretosporeans and a range of
12 metazoans (Fig. 1A, Supp Figs. S1 and S2). As highlighted in previous analysis (Labandera *et al.*,
13 2015), the key motif for Gwl phosphorylation (FDS*G/AD) is very highly conserved across
14 eukaryotes. The central serine of this motif is phosphorylated by Gwl to generate a potent
15 PP2A-B55 inhibitor (Dupre *et al.*, 2013; Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Juanes *et al.*, 2013; Mochida
16 *et al.*, 2010). In contrast with the Gwl phosphorylation site, the known *Xenopus* ARPP19 PKA
17 phosphorylation motif was only recognizable in the alignment in sequences from metazoan
18 species (Labandera *et al.*, 2015). It was not found in ARPP19 sequences from sponge species,
19 but was clearly present in the ctenophore sequences. Under the scenario that ctenophores
20 are the sister to all other animals (Schultz *et al.*, 2023), this implies that it was present in a
21 common metazoan ancestor. On the C-terminal side of the PKA site, we noted a SxL motif
22 present in species scattered right across the metazoan phylogeny (including sponges), and
23 also in the choanoflagellate *Hartaetosiga balthica* and the teretosporean *Sphaeroforma*
24 *artica*. Even more widely conserved was a sequence lying N terminal side of the PKA
25 phosphorylation motif, GxxxPTPxx ϕ P (where ϕ is a hydrophobic amino acid), detectable in the
26 ARPP19 sequences across the opisthokonts (Fig. 1A, Supp Figs. S1 and S2). The significance of
27 these motifs is unknown (see Discussion).

28 In conclusion, the site for PKA phosphorylation likely appeared as an important feature of
29 ARPP19/ENSA proteins early during the emergence of metazoans. It remains very well
30 conserved across the clade Eumetazoa (Cnidaria plus Bilateria), suggesting that
31 phosphorylation on this site conveys an important biological property common to these
32 animals. We thus undertook a comparative functional analysis of the PKA site of ARPP19 in
33 the cnidarian *Clytia hemisphaerica* (ClyARPP19) and the amphibian *Xenopus laevis*
34 (XeARPP19). The alignment of two sequences in Fig. 1B highlights the serines phosphorylated
35 by Gwl and PKA in XeARPP19 (S67 and S109 respectively) and the corresponding serines in
36 ClyARPP19 (S49 and S81 respectively). We focused on the process of oocyte maturation, in
37 which intriguingly PKA plays opposite roles in the two species (Jesus *et al.*, 2020). From
38 available genome transcriptome data (Leclere *et al.*, 2019; Takeda *et al.*, 2018), we determined
39 that *Clytia* has a single ARPP19 orthologue, expressed in growing and fully grown oocytes and
40 across all life cycle stages. *In situ* hybridization experiments confirmed that ARPP19 mRNA is

1 strongly expressed in ovarian oocytes and detected expression also in other tissues of the
2 *Clytia* medusa, notably the nerve rings that run around the bell margin (Fig. 1C).

4 **The Cdk1 activation function of ARPP19 is conserved in *Clytia* and *Xenopus***

5 In *Xenopus* oocytes, ARPP19 phosphorylated by Gwl on S67 becomes a direct inhibitor of
6 PP2A-B55 δ , activating the Cdk1 auto-amplification loop and leading to meiotic division (Dupre
7 *et al.*, 2013). Injection into *Xenopus* prophase-arrested oocytes of XeARPP19
8 thiophosphorylated on S67 bypasses the progesterone-triggered maturation initiation
9 mechanism to promote M-phase entry and meiotic divisions (Dupre *et al.*, 2013) (Fig. 2A-B).
10 To test whether ClyARPP19 can similarly induce meiosis resumption, we produced ClyARPP19
11 thiophosphorylated on S49 (Supp Fig. S3), injected it into *Xenopus* prophase oocytes, and then
12 monitored GVBD as well as the phosphorylation level of MAPK and Cdk1, two molecular
13 markers of meiotic cell division (Fig. 2A-B). Cdk1 is activated by Y15 dephosphorylation while
14 MAPK is activated by phosphorylation (Jesus *et al.*, 1991). Injection of S49-thiophosphorylated
15 ClyARPP19 promoted meiosis resumption accompanied by Cdk1 and MAPK activation.
16 ClyARPP19 phosphorylated on S49 is thus sufficient to promote meiotic maturation and Cdk1
17 activation in *Xenopus* oocyte, strongly suggesting that the *Clytia* protein shares with the
18 *Xenopus* protein the inhibitory capacity of Gwl-phosphorylated ARPP19 towards PP2A-B55 δ ,
19 leading to Cdk1 activation.

20 The inhibitory potential of S49-thiophosphorylated ClyARPP19 towards PP2A was confirmed
21 in *Xenopus* prophase oocyte extracts. As already described (Lemonnier *et al.*, 2021), PP2A is
22 active in these extracts, efficiently dephosphorylates an artificial substrate, the C-ter part of
23 XeARPP19 (amino-acids 68 to 117) phosphorylated on S109, and is inhibited by S67-
24 thiophosphorylated XeARPP19. The *Xenopus* prophase oocyte extracts were supplemented
25 with this phosphorylated C-ter substrate in the absence or presence of S49-
26 thiophosphorylated ClyARPP19. PP2A activity was impaired by Gwl-phosphorylated
27 ClyARPP19 (Fig. 2C-E), confirming the inhibitory activity of this protein towards PP2A.

29 **Gwl phosphorylation of ClyARPP19 is insufficient to initiate oocyte maturation**

30 Although entry into first meiotic M-phase in both species is mediated by Cdk1 activation, the
31 mechanisms that promote this activation following oocyte hormonal stimulation are
32 molecularly distinct and far from fully understood (Jesus *et al.*, 2020). In *Xenopus*, key
33 progesterone-triggered events are a drop in cytoplasmic cAMP concentration, leading to
34 synthesis of Cyclin B and Mos proteins, while in hydrozoans like *Clytia* binding of the peptide
35 hormone MIH to its GPCR on the oocyte surface causes an immediate endogenous
36 cytoplasmic cAMP rise, via G α_s signaling (Deguchi *et al.*, 2011; Quiroga Artigas *et al.*, 2020;
37 Takeda *et al.*, 2018). Subsequently, meiotic maturation proceeds much more rapidly in *Clytia*
38 than in *Xenopus*, GVBD occurring 10-20 minutes after treatment with MIH rather than several
39 hours after progesterone stimulation. To gain insight into the molecular regulation of meiotic
40 maturation in *Xenopus* vs *Clytia* oocytes, we investigated whether ARPP19 is phosphorylated

1 on the Gwl site in *Clytia* oocytes during meiosis resumption. As endogenous ClyARPP19 is
2 barely detectable by western blot, we injected exogenous ClyARPP19 and XeARPP19 into
3 *Clytia* oocytes and analyzed the phosphorylation of the Gwl site in response to MIH
4 stimulation. Both proteins were strongly phosphorylated on their Gwl sites (S49 and S67
5 respectively) in oocytes collected 15 minutes following MIH treatment (Fig. 3A-B). Thus, the
6 mechanism of MPF activation in maturing *Clytia* oocytes matches that observed in *Xenopus*
7 oocytes in involving phosphorylation of ARPP19 by Gwl or a related kinase downstream of
8 MIH stimulation.

9 We further tested whether injection of Gwl-phosphorylated ARPP19 proteins could promote
10 oocyte meiotic maturation in *Clytia*. We were unable to induce maturation of *Clytia* oocytes
11 by injection of any versions of *Clytia* or *Xenopus* ARPP19 including wild-type XeARPP19 or
12 ClyARPP19 thiophosphorylated by Gwl. Injecting 4mg/ml pipette concentration of these two
13 proteins induced only non-specific incidence of GVBD (0 or 1 oocyte from each of 4 groups of
14 9-20 oocytes injected with each of the thiophosphorylated proteins, comparable with buffer
15 injections; results summarized in Fig. 3C, full details in Supplementary Table 1). It was not
16 possible to increase injection volumes or protein concentrations without inducing high levels
17 of non-specific toxicity. These experiments suggest that, unlike in *Xenopus*, PP2A inhibition is
18 not sufficient to induce oocyte meiotic division in *Clytia*. To confirm that this lack of
19 maturation induction was not due to ineffective PP2A inhibition by the injected proteins, we
20 repeated the experiment injecting okadaic acid (OA), a powerful PP2A inhibitor (Takai *et al*,
21 1987) that induces meiosis resumption in *Xenopus* oocytes (Goris *et al*, 1989). Injection of
22 *Clytia* oocytes with OA at 2 μ M did not promote GVBD, however between 40 and 90 minutes
23 post-injection all injected oocytes showed cortical contractions followed by fragmentation
24 and/or degradation (Fig. 3C), suggesting that prolonged PP2A inhibition is lethal to the
25 oocytes. These results suggest that PP2A inhibition is not sufficient to induce oocyte
26 maturation in *Clytia*, although we cannot rule out that the quantity of OA or Gwl-
27 thiophosphorylated ARPP proteins delivered was insufficient to trigger GVBD.

28 To summarise these findings, we have shown that ClyARPP19 is phosphorylated on the Gwl
29 site in response to MIH and that Gwl-phosphorylated ARPP19 from either *Clytia* or *Xenopus*
30 origin can inhibit PP2A, confirming the strong conservation of this function in eukaryotes. In
31 *Clytia* oocytes, however, unlike in *Xenopus* oocytes, this inhibition appears insufficient to
32 override the prophase arrest mechanism

34 **ClyARPP19 is phosphorylated on S81 by PKA *in vitro***

35 In *Xenopus*, phosphorylation of ARPP19 by PKA on S109 within the PKA consensus motif
36 RKPS₁₀₉L maintains the oocyte prophase arrest (Dupre *et al.*, 2014). The general consensus
37 PKA site is reported to be R/K-R/K-X-S*/T*. The phosphopredict program retrieved the site
38 RKIS₈₁S₈₂ in ClyARPP19 recognized in our alignments (Fig1. A) as a PKA consensus sequence
39 (Fig. 1B). It includes two serines, S81 and S82, the first matching the position of the
40 phosphorylated residue in the general PKA consensus site. To determine if one or both of
41 these are phosphorylated by PKA, we produced four forms of ClyARPP19 tagged by GST: wild-

1 type (WT), the single amino acid substitutions S81D and S82D, and the double mutant S81D-
2 S82D (Fig. 4A), the 'phosphomimetic' substitution of Serine with Aspartic acid preventing
3 phosphorylation. All recombinant proteins were incubated *in vitro* in the presence of purified
4 recombinant bovine PKA and γ S-ATP. An extended period of incubation (2 hours) was required
5 to detect their phosphorylation by western blot with an antibody that detects
6 thiophosphorylated residues (Fig. 4B, Supp Fig. S4). Wild-type ClyARPP19 but not the double
7 S81D-S82D was phosphorylated by PKA *in vitro*, showing that the only residues
8 phosphorylated by PKA in ClyARPP19 are located in the PKA consensus motif. As predicted, no
9 phosphorylation was detected in the S81D mutant. The S82D mutant was phosphorylated by
10 PKA, although the level of phosphorylation was reduced compared to that of WT-ClyARPP19
11 (Fig. 4B, Supp Fig. S4), indicating that mutation of this residue impairs the phosphorylation of
12 the neighboring S81. This *in vitro* assay thus places S81 as the sole residue in ClyARPP19 for
13 phosphorylation by PKA.

14

15 **ClyARPP19 only weakly affects *Xenopus* oocyte meiosis resumption**

16 When injected into prophase-arrested *Xenopus* oocytes, XeARPP19 rapidly becomes
17 phosphorylated by PKA on S109, and this exogenous protein prevents progesterone from
18 inducing GVBD in a dose-dependent manner (Dupre *et al.*, 2014). To test whether ClyARPP19
19 has equivalent inhibitory properties, we injected it into *Xenopus* oocytes and monitored GVBD
20 following progesterone stimulation. Whereas injection of XeARPP19 delayed meiosis
21 resumption (2-fold increase in GVBD₅₀) and fully inhibited GVBD in 35% of oocytes (Fig. 5A-C,
22 Supp Fig. S5), injection of the same amount (800 ng) of ClyARPP19 had no effect on the timing
23 of GVBD, with 100% of oocytes injected with ClyARPP19 showing a similar time-course to
24 uninjected oocytes (Fig. 5A-C, Supp Fig. S5).

25 How PKA-phosphorylated XeARPP19 inhibits meiosis resumption in *Xenopus* is not yet
26 understood, but must involve unidentified cis or trans interactions specific to this form that
27 somehow prevent initiation of the Cdk1 and MAPK activation cascades (Dupre & Jessus, 2017;
28 Dupre *et al.*, 2017; Labbe *et al.*, 2021). We reasoned that the lack of inhibitory activity of
29 ClyARPP19 in the *Xenopus* oocyte could reflect its inability to recognise targets of the *Xenopus*
30 protein and/or less efficient phosphorylation by PKA. To address the first hypothesis, we took
31 advantage of phosphomimetic mutant proteins. The S109D-XeARPP19 mutant mimics
32 constitutive phosphorylation on S109 and inhibits meiotic resumption (Dupre *et al.*, 2014). We
33 produced ClyARPP19 with the equivalent mutation, S81D, and compared the effects of
34 progesterone following injection into *Xenopus* oocytes (Fig. 5D-F, Supp Fig. S5). While S109D-
35 XeARPP19 fully abolished Pg-induced GVBD, S81D-ClyARPP19 did not, although the time
36 course of meiosis resumption was delayed (1.5-fold increase in GVBD₅₀ compared to
37 uninjected oocytes or oocytes injected with wild-type ClyARPP19) (Fig. 5D-F, Supp Fig. S5). In
38 all experiments, the observed effects were confirmed molecularly by monitoring the
39 phosphorylation of MAPK and Cdk1 (Fig. 5G). Hence, ClyARPP19, when phosphorylated on
40 S81, has a weaker inhibitory activity on meiosis resumption than its *Xenopus* counterpart,
41 suggesting that it cannot effectively recognise XeARPP19 targets.

1 This lack of recognition could have two origins: either equivalent ARPP19 interactors are
2 present in *Clytia* oocytes but their *Xenopus* counterparts are too divergent in sequence to be
3 recognized by ClyARPP19, or they are absent in *Clytia* oocytes. To address this question, we
4 injected the S81D phospho-mimetic mutant protein into *Clytia* oocytes, which were then
5 stimulated with MIH. Neither this mutant protein nor wild-type ClyARPP19 affected meiotic
6 resumption, as seen by GVBD in all cases (Fig. 5H). Furthermore, neither S109D-XeARPP19 nor
7 wild-type XeARPP19 affected meiotic resumption in *Clytia* oocytes (Fig. 5H). Although we
8 cannot rule out that the amount of protein injected was insufficient to compete with
9 endogenous pools, these results support the hypothesis that specific interactors of PKA-
10 phosphorylated ARPP19 that prevent entry of *Xenopus* oocytes into first meiotic M-phase are
11 absent from *Clytia* oocytes. They do not exclude the possibility that ClyARPP19 is
12 phosphorylated only weakly or not at all by PKA *in vivo* in *Clytia* oocytes.

13

14 **Inefficient S81 phosphorylation of ClyARPP19 in *Xenopus* oocyte extracts**

15 We addressed the efficiency of S81 phosphorylation by PKA of ClyARPP19 compared to S109
16 of XeARPP19 using extracts from prophase-arrested *Xenopus* oocytes, in which PKA is active.
17 Purified GST-tagged ClyARPP19 or XeARPP19 proteins were incubated in extracts pre-
18 incubated or not with PKI, a specific inhibitor of PKA. S81 phosphorylation of ClyARPP19 and
19 S109 phosphorylation of XeARPP19 were monitored by western blot using anti-phospho-
20 antibodies that specifically recognize phospho-S81-ClyARPP19 and phospho-S109-XeARPP19
21 (Fig. 6A, Supp Fig. S6). S109 phosphorylation of XeARPP19 was detected after only 5 minutes
22 of incubation and then increased during the following 15 minutes (Fig. 6A). This
23 phosphorylation was totally abolished in the presence of PKI (Fig. 6A), confirming that
24 XeARPP19 is efficiently phosphorylated by PKA at the prophase stage (Dupre *et al.*, 2014). In
25 contrast, S81 phosphorylation of ClyARPP19 was not detected by the anti-phospho-S81
26 antibody in either condition (Fig. 6A; compare with the positive control of ClyARPP19 *in vitro*
27 phosphorylated by PKA after a 2 hour-incubation). We conclude that in *Xenopus* prophase
28 oocyte extracts, ClyARPP19 is not detectably phosphorylated on S81, whereas XeARPP19
29 shows phosphorylation on S109 strictly dependent of PKA.

30 Two possible mechanisms can account for the absence of ClyARPP19 detectable
31 phosphorylation on S81 in *Xenopus* oocyte extracts. Either S81 of ClyARPP19 is rapidly
32 dephosphorylated by a phosphatase and/or the ability of PKA to phosphorylate ClyARPP19 is
33 lower than for the *Xenopus* counterpart as already observed in the assays using purified PKA
34 (see above). To address the first mechanism, we measured the dephosphorylation rate of
35 ARPP19 proteins. We produced ClyARPP19 and XeARPP19 phosphorylated on S81 and S109
36 respectively by a 4 hours *in vitro* incubation with PKA. In order to compare the
37 dephosphorylation of equivalent starting amounts of phosphorylated ClyARPP19 and
38 XeARPP19, their phosphorylation levels were calibrated as shown in Supp Fig. S7. The
39 prophase oocyte extracts were supplemented with PKI to inhibit PKA activity and with
40 hexokinase/glucose to deplete ATP and thus eliminate any kinase activity. S81-
41 phosphorylated-ClyARPP19 or S109-phosphorylated-XeARPP19 were added to these kinase-

1 dead oocyte extracts, and aliquots were collected over time to estimate ARPP19
2 dephosphorylation using specific phospho-antibodies. As shown in Fig. 6B-D, 50%
3 dephosphorylation was reached in 7 minutes for XeARPP19 and 28 minutes for ClyARPP19,
4 meaning that XeARPP19 was dephosphorylated 4 times faster than ClyArpp19. Hence, for the
5 same starting amount of phosphorylated proteins and in the absence of any kinase activity,
6 the *Clytia* protein is dephosphorylated less efficiently than its *Xenopus* counterpart (Fig. 6A-D
7 and Supp Fig. S8), indicating that ClyARPP19 is a poor substrate of the phosphatase specific of
8 the S81 residue.

9 It has been shown that in *Xenopus*, ARPP19 is dephosphorylated on S109 by PP2A-
10 B55 δ (Lemonnier *et al.*, 2021). To verify that this PP2A isoform also dephosphorylates
11 ClyARPP19, the dephosphorylation assay was repeated in prophase oocyte extracts depleted
12 in PP2A-B55 δ . Extracts were incubated with beads coupled to both a specific anti-B55 δ
13 antibody (Supp Fig. S9) and the S67-thio-phosphorylated form of XeARPP19 (thio-S67-
14 ARPP19), which acts as a specific inhibitor of the PP2A-B55 δ isoform (Gharbi-Ayachi *et al.*,
15 2010; Mochida *et al.*, 2010). To avoid any side-effects from the S109 residue of the thio-S67-
16 ARPP19 inhibitor, we produced a S109A mutant, called thio-S67-S109A-ARPP19. We assessed
17 that the level of B55 δ was reduced in the extracts after removal of the beads (Fig. 7A).
18 Dephosphorylation of ClyARPP19 and XeARPP19 was estimated after a 45 min-incubation in
19 these depleted extracts. As shown in Fig. 7, XeARPP19 and ClyARPP19 dephosphorylation on
20 S109 and S81 respectively were strongly reduced.

21 Taken together these results show that ClyARPP19 is dephosphorylated on S81 by PP2A-B55 δ
22 much less efficiently than the *Xenopus* protein. This implies that the absence of S81
23 phosphorylation in the prophase oocyte extract (Fig. 6A) is not due to hyper active
24 dephosphorylation but rather to poor phosphorylation by PKA.

25

26 **ClyARPP19 is poorly phosphorylated by PKA *in vitro* and *in vivo***

27 We compared PKA phosphorylation of ClyARPP19 versus XeARPP19 first *in vitro* using
28 recombinant bovine PKA, and then *in vivo* by injection into *Xenopus* and *Clytia* oocytes. To
29 assess the *in vitro* phosphorylation rate of purified ClyARPP19 and XeARPP19, the proteins
30 were thio-phosphorylated by using γ S-ATP, enabling us to make direct comparisons using a
31 single antibody targeting thio-phosphates rather than using separate species-specific
32 phospho-antibodies. ClyARPP19 or XeARPP19 were incubated with recombinant PKA and γ S-
33 ATP and samples were collected at successive times up to 60 min (Fig. 8A). Thio-
34 phosphorylation of XeARPP19 was detected after 5 min of incubation with PKA and increased
35 until 60 min. In contrast, ClyARPP19 thiophosphorylation only started to be detected at 30
36 min. Quantification of 3 independent experiments determined that ClyARPP19 is indeed
37 phosphorylated by PKA less efficiently than XeARPP19 (Fig. 8B-C, Supp Fig. S10). 50% of
38 XeARPP19 was phosphorylated within 18 minutes whereas the extrapolation of the curve
39 indicates that it would take 148 minutes to reach the same level for ClyARPP19, showing that
40 thio-phosphorylation of XeARPP19 is 8 times faster than that of ClyARPP19 (Fig. 8C).
41 ClyARPP19 is thus a relatively poor substrate of purified PKA.

1 To assess phosphorylation of ARPP19 proteins in intact oocytes, ClyARPP19 and XeARPP19
2 were first injected into *Xenopus* prophase-arrested oocytes. Oocytes were collected 30 min
3 later and phosphorylation of the PKA sites were estimated by western blot (Fig. 9A, Supp Fig.
4 S11). For each of 3 experiments (A, B and C), 3 pools of 5 oocytes were analyzed, with *in vitro*
5 thiophosphorylated forms of ClyARPP19 and XeARPP19 included as positive controls. Injected
6 XeARPP19 became phosphorylated on S109 in the oocyte, and this phosphorylation was
7 prevented by prior injection of PKI, confirming that PKA is entirely responsible for it (Fig. 9). In
8 contrast, no phosphorylation on S81 of injected ClyARPP19 was detected, despite the fact that
9 the protein remained stable in the oocytes and detectable by anti-GST antibodies (Fig. 9).
10 These results show that, while XeARPP19 is actively phosphorylated by PKA in prophase-
11 arrested *Xenopus* oocytes, ClyARPP19 is not.

12 The catalytic subunit of PKA (PKA-C) is highly conserved in the animal kingdom, the sequence
13 being almost identical across species (Supp Fig. S12). The few differences in the sequences lie
14 outside the critical motifs of PKA (catalytic loop, activation loop, Mg²⁺-binding loop or the two
15 P-loops, Supp Fig. S12). Hence, it is unlikely that divergence between the catalytic subunits of
16 the kinase prevents *Xenopus* or bovine PKA from phosphorylating ClyARPP19 in the
17 experiments reported above, or *Clytia* PKA from phosphorylating XeARPP19. PKA activation in
18 hydrozoan oocytes is induced by MIH (Amiel & Houlston, 2009; Deguchi *et al.*, 2011; Takeda
19 *et al.*, 2006). We confirmed the increased PKA activity following MIH stimulation in *Clytia*
20 oocytes using an antibody recognizing the phosphorylated PKA consensus site, which detected
21 a set of protein bands more strongly in *Clytia* oocytes harvested 15 minutes post-MIH than in
22 non-stimulated oocytes (Fig. 3A, B). Furthermore, a specific phospho-S109-XeARPP19
23 antibody detected phosphorylation of XeARPP19 injected into *Clytia* oocytes following MIH
24 stimulation (Fig. 3A). In contrast, a distinct phospho-S81-ClyARPP19 antibody detected weak
25 phosphorylation of exogenous ClyARPP19 injected to *Clytia* both before and after MIH, with
26 no increase in signal intensity (Fig. 3B).

27 These experiments together demonstrate that *Clytia* ARPP19 is inherently a poorer PKA
28 substrate than *Xenopus* ARPP109 both *in vivo* and *in vitro*, despite the presence of a functional
29 PKA site. The endogenous rise in PKA activity in *Clytia* in MIH-stimulated oocytes likely
30 generates little or no phosphorylation on this site.

31

1 DISCUSSION

2 Maintenance and release of the prophase arrest of oocytes play a critical role in metazoan
3 sexual reproduction. Correct regulation of these processes is of prime importance for the
4 subsequent transformation of ovarian oocytes into fertilisable haploid eggs equipped with the
5 maternal reserves necessary for early embryogenesis. cAMP and PKA activity play a central
6 role in controlling the prophase arrest in many species, but with opposite roles in vertebrates
7 versus many invertebrates (Deguchi *et al.*, 2011; Jesus *et al.*, 2020). Since ARPP19 is one of
8 the substrates mediating the negative role of PKA on meiosis resumption in *Xenopus* (Dupre
9 *et al.*, 2014; Lemonnier *et al.*, 2021), we conducted a comparative study of the
10 phosphorylation and function of ARPP19 homologues between *Xenopus* and a species where
11 PKA plays an opposite role, the hydrozoan jellyfish *Clytia* (Amiel & Houliston, 2009; Freeman
12 & Ridgway, 1988; Takeda *et al.*, 2006). Although a consensus sequence for phosphorylation
13 by PKA can be recognised in both species, we show here by *in vitro* and *in vivo* approaches
14 that ClyARPP19 is a weak substrate of the two enzymes that regulate its phosphorylation in
15 *Xenopus*, PKA and PP2A-B55 δ . Furthermore, the targets of XeARPP19 that allow it to exert its
16 negative control of meiosis resumption are not present in the *Clytia* oocyte. As discussed
17 below, these findings provide an evolutionary perspective on the control of the release of the
18 oocyte prophase arrest by PKA.

19 The evolutionary history of the ARPP19 PKA site contrasts with that of the site phosphorylated
20 by the kinase, Gwl (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). The Gwl phosphorylation
21 motif is highly conserved across eukaryotes and can be used as a hallmark of the ARPP19/ENSA
22 family (Labandera *et al.*, 2015). It is well established that across a very wide range of
23 eukaryotic species including yeast and man, the serine of this short sequence is
24 phosphorylated by Gwl, converting ARPP19 into an inhibitor of PP2A-B55 δ that is essential for
25 Cdk1 activation and M-phase completion (Castro & Lorca, 2018; Haccard & Jesus, 2011). Our
26 work confirms that phosphorylation by Gwl of the central serine of this motif in ClyARPP19,
27 S49, inhibits PP2A-B55 δ activity. This property can be correlated with the conservation of
28 several basic (K or R) residues flanking the Gwl site across eukaryotic species, previously
29 reported to serve as a recognition signal for PP2A-B55 (Cundell *et al.*, 2016; Labbe *et al.*, 2021).
30 Other conserved features of the ARPP19 proteins may have roles in modulating their
31 phosphorylation by Gwl and thereby PP2A inhibition in different physiological contexts.
32 Common sequences conserved across animal groups and even more widely, are candidates
33 for such roles. A GxxxPTPxx ϕ P sequence is present across the opisthokonts, although it has
34 degenerated in some animal lineages including ctenophores and sponges, while a C-terminal
35 SxL sequence can be detected in species across all metazoan groups and amongst their closest
36 unicellular relatives. It would be interesting in the future to address the significance of these
37 sites by functional studies.

38 The XeARPP19 sequence contains only one site fitting the PKA phosphorylation consensus
39 (Dupre *et al.*, 2014). In contrast to the Gwl site, this site of PKA phosphorylation is not an
40 ancient eukaryotic feature. We found the central serine in ARPP19 sequences from a range
41 metazoan species, including from the most basally branching clade *Ctenophora* (Schultz *et al.*,

1 2023), but no phosphorylatable residues at this position in ARPP19 proteins from non-
2 metazoan species including choanoflagellates, plant and fungi. Under the likely scenario that
3 ctenophores are the sister to all other animals (Schultz *et al.*, 2023), this suggests that PKA
4 phosphorylation of ARPP19 arose in a common metazoan ancestor, with rapid evolution of
5 the C-ter half of the protein within the sponge clade leading to loss of this site as well as the
6 GxxxPTPxxϕP motif (but not the C-terminal SxL). We have shown that this site is indeed
7 phosphorylatable by PKA in a cnidarian ARPP19, from *Clytia hemisphaerica*. The emergence
8 of a functional PKA phosphorylation site as a feature of ARPP19 proteins early during the
9 emergence of metazoans and its subsequent maintenance across the clade of Eumetazoans
10 (Cnidaria and Bilateria), suggests that phosphorylation on this site is involved in an important
11 biological process common to these animals. One possibility is that it relates to the emergence
12 of neural cell types in animals. ARPP19 and its splice-variant, ARPP16, were initially discovered
13 in mammals as substrates of PKA in dopaminergic neurons of the striatum (Dulubova *et al.*,
14 2001; Horiuchi *et al.*, 1990). Since then, it has been shown that a complex antagonistic
15 interplay between the control of ARPP16 by Gwl and PKA regulates key components of the
16 striatal signaling by a mechanism whereby cAMP mediates PP2A disinhibition (Andrade *et al.*,
17 2017; Musante *et al.*, 2017). In the *Clytia* medusa, ARPP19 is expressed in the nerve rings that
18 run around the bell margin as well as in ovarian oocytes. Thus, the appearance of the PKA site
19 in the ARPP19 proteins at the time of the emergence of metazoans could have participated,
20 thanks to its interaction with the pre-existing Gwl site, in the establishment of neural-type
21 communication systems, which have been largely lost in sponges but have diversified in
22 parallel in ctenophores (Burkhardt *et al.*, 2023).

23 We have addressed another critical physiological feature common to all metazoans, the
24 oocyte prophase arrest, which is regulated by PKA through the phosphorylation of ARPP19 in
25 *Xenopus* (Lemonnier *et al.*, 2020). In *Clytia*, PKA activation is required for release from
26 prophase and Cdk1 activation (Amiel & Houliston, 2009; Freeman & Ridgway, 1988; Takeda *et al.*,
27 2006). If ClyARPP19 was phosphorylated by PKA as in *Xenopus*, and if the targets of the
28 PKA-phosphorylated form were expressed in the *Clytia* oocyte, how to explain that the protein
29 does not block meiosis resumption in the *Clytia* oocyte as it does in *Xenopus*? In this paper we
30 uncover two main explanations for this apparent paradox. First, the ability of PKA to
31 phosphorylate ClyARPP19 is lower than for the *Xenopus* orthologue, both *in vitro*, in oocyte
32 extracts and in the oocyte. *Xenopus* and *Clytia* catalytic subunits of PKA being almost identical,
33 the differences in the ability of *Xenopus* and *Clytia* ARPP19 to become phosphorylated should
34 reflect the ARPP19 sequences. Similarly, ClyARPP19 is a poor substrate of the phosphatase(s)
35 acting on the PKA phosphosite, mainly PP2A-B55δ. Hence, in contrast to *Xenopus*, the two
36 antagonistic enzymes controlling S81 phosphorylation are not very effective towards *Clytia*
37 ARPP19. Unsurprisingly, the activity of the two enzymes is balanced, preventing their
38 substrate from being in a permanent state of phosphorylation or dephosphorylation. On the
39 other hand, the affinity of the two antagonistic enzymes for ARPP19 is very different in these
40 species despite the presence of a similar motif, endowed with the characteristics of a PKA
41 consensus site. This highlights the importance of studying in more detail variations within the

1 consensus motif and in their surrounding sequences that may modulate its affinity for PKA
2 and PP2A-B55 δ , as was done for Gwl flanking sequences (Cundell *et al.*, 2016; Labbe *et al.*,
3 2021). It would also be instructive to analyse PKA phosphorylatability of ARPP19 proteins from
4 other species previously demonstrated to show cAMP-induced oocyte maturation, such as the
5 annelid *Pseudopotamilla* and the brittle star *Amphipholis* (Deguchi *et al.*, 2011). Another
6 avenue of investigation would be to address the impact of PKA site regulation on the access
7 of the Gwl site to its two regulatory enzymes, Gwl and PP2A-B55 δ . It is clear that feedback
8 occurs between the two sites, but the sequence elements responsible for these interactions
9 remain to be identified (Dupre *et al.*, 2017; Labbe *et al.*, 2021). Thus, a comparison between
10 *Clytia* and *Xenopus* ARPP19, respectively offering a site of low or high affinity for the
11 PKA/PP2A-B55 δ tandem, could shed light on the sequences outside the PKA and Gwl sites that
12 regulate both their phosphorylation level and their reciprocal influences.

13 The low affinity of PKA for ClyARPP19 can explain why the protein does not interfere with the
14 prophase release of the *Clytia* oocyte when PKA is activated by MIH. However, another
15 mechanism relying on the ARPP19 interactors also protects the *Clytia* oocyte from a
16 potentially negative action of S81-phosphorylated ARPP19. The nature of the proteins
17 controlled by the S109 phosphorylation of XeARPP19 responsible for maintaining the
18 prophase block in *Xenopus* oocytes remain unknown but their presence can be deduced
19 experimentally. First, our results indicate that ClyARPP19 interacts only weakly with these
20 *Xenopus* effectors since wild-type ClyARPP19 or a ClyARPP19 mutant mimicking a constitutive
21 S81-phosphorylation are not as efficient as their *Xenopus* counterparts in blocking meiotic
22 resumption of *Xenopus* oocytes. Second, they suggest that their *Clytia* homologs are not
23 expressed or have divergent structures in *Clytia* oocytes since neither the injection of S81-
24 phosphomimetic ClyARPP19 nor the injection of S109-phosphomimetic XeARPP19 prevented
25 MIH-induced oocyte maturation in *Clytia*. In addition, Gwl-phosphorylated forms of *Xenopus*
26 (S67) or of *Clytia* (S49) ARPP19 were not able to trigger meiotic resumption of *Clytia* oocytes,
27 supporting the hypothesis that additional mechanisms lock the resting *Clytia* oocyte in a
28 prophase state. OA, which has a broader spectrum towards PP2A isoforms than ARPP19
29 (Dounay & Forsyth, 2002), was also unable to induce GVBD when injected into *Clytia* oocytes,
30 but did provoke cortical contractions and lysis likely reflecting PP2A regulation of the actin
31 cytoskeleton as reported in other cells (Basu, 2011; Hoffman *et al.*, 2017). Taken together, our
32 results suggest that the low capacity of *Clytia* ARPP19 to be phosphorylated by PKA combined
33 with the absence of functional interactors mediating its negative effects on Cdk1 activation
34 may provide a double security allowing induction of meiosis resumption in *Clytia* by elevated
35 PKA activity despite the presence of ARPP19, while additional as yet unidentified mechanisms
36 ensure the *Clytia* oocyte prophase arrest.

37 What can we conclude from this study about the evolution of oocyte maturation initiation
38 mechanisms? It is likely that the ancestral ARPP19 was expressed in oocytes of early
39 metazoans to ensure MPF activation through its highly conserved eukaryotic role in the
40 Gwl/PP2A regulatory circuit, and this ancestral ARPP19 had a “prototype” PKA
41 phosphorylation site (Fig. 10), but it remains to be established how strongly this was regulated

1 and its role in the oocyte. One scenario consistent with our findings is that in the earliest
2 metazoan, the ARPP19 proteins present in the oocyte had no role in the maturation initiation
3 step; cAMP-PKA would have played a positive role in initiating oocyte maturation, perhaps
4 relating to an ancient involvement of a GPCR related to the *Clytia* MIH receptor (Quiroga
5 Artigas *et al.*, 2020). Such ARPP19-independent cAMP/PKA-activated oocyte maturation
6 initiation would have been maintained in hydrozoan cnidarians and in some protostomes (eg
7 *Spisula* and *Pseudopotamilla*) and non-vertebrate deuterostomes (eg *Amphipholis* and
8 *Boltenia*). Maturation initiation is tightly linked to spawning/ovulation and so its regulation
9 would have been modulated repeatedly during evolution in relation to the ecology and
10 ethology of each species (for instance integrating the influence of daily and lunar cycles,
11 nutritional availability, etc.) The emergence of the vertebrate lineage was accompanied by
12 major changes in reproductive biology linked to the complexification of the hormone systems
13 regulating ovulation (Deguchi *et al.*, 2011; Quiroga Artigas *et al.*, 2020). If cAMP-PKA activation
14 of oocyte maturation was indeed ancestral, this ancient initiation mechanism would have
15 become over-ridden by an alternative regulation in which cAMP-PKA inhibits meiotic
16 maturation. Under this scenario, the biochemical pathways within the oocyte linking the
17 initiation trigger to Cdk1 activation would have undergone modifications during the
18 emergence of the vertebrate lineage, including the co-option of ARPP19 for an inhibitory role
19 under the control of cAMP-PKA. Whatever the ancestral situation for oocyte maturation
20 control, it is highly likely that cAMP-PKA of ARPP19 initially arose during metazoan evolution
21 for other functions, for instance in the nervous system. Consistent with this, we detected
22 expression of ARPP19 in both the oocytes and the nerve ring of *Clytia* jellyfish.

23 To address this hypothesis much remains to be clarified about the phylogenetic distribution
24 of cAMP regulation modes of oocyte maturation initiation. From the relatively sparse available
25 data it is already clear that this is quite patchy: not all protostome oocytes use cAMP-PKA to
26 trigger meiosis resumption and not all deuterostome use cAMP-PKA to maintain the prophase
27 block. Thus, whatever the ancestral situation, there were likely multiple acquisitions or losses
28 of the activatory role of cAMP-PKA in oocyte meiotic maturation during the evolution of
29 metazoans. We propose that the new and critical function in oocytes of vertebrates and of
30 some other protostome lineages complemented existing roles for ARPP19 under the control
31 of PKA, that emerged during early metazoan evolution (Fig. 10). More knowledge of the
32 sequence modifications around the PKA site of ARPP19 and the identification of its binding
33 partners will be important to understand fully these evolutionary transitions. This will increase
34 our understanding of the function of ARPP19 in the control of oocyte meiosis, and more widely
35 in the control of cell cycle progression and its dysfunction in pathologies related to fertility
36 and cancer.

37
38

1 MATERIAL AND METHODS

2 Material

3 *Xenopus laevis* adult females (Centre de Ressources Biologiques Xenopus, CNRS, France) were
4 bred and maintained according to current French guidelines in the IBPS aquatic animal facility,
5 with authorization: Animal Facility Agreement: #A75-05-25. All *Xenopus* experiments were
6 subject to ethical review and approved by the French Ministry of Higher Education and
7 Research (reference APAFIS#14127-2018031614373133v2). Sexually mature jellyfish were
8 generated from laboratory-maintained *Clytia hemisphaerica* polyp colonies (“A strains” or “Z
9 strains”) (Houliston *et al*, 2010). All reagents, unless otherwise specified, were from Roth.

10

11 *Xenopus* oocyte handling

12 *Xenopus laevis* stage VI oocytes (Dumont, 1972) were obtained from unprimed female. The
13 edges of the ovarian lobes were collected from anesthetized *Xenopus* females (30 minutes
14 bath in 1 g/l MS222 (Sigma). To obtain defolliculated fully-grown oocytes, pieces of ovaries
15 were incubated for 3 hours in buffer M (10 mM HEPES pH 7.8, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33
16 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄) in the presence of dispase (0.4 mg/ml) to
17 weaken ovary connective tissues without altering oocyte integrity and potentiate the effect
18 of collagenase used in the sub-sequent step. Oocytes were then washed in 1 liter of buffer M
19 and incubated for 1 hour in the presence of collagenase (0.4 mg/ml) diluted in buffer M. After
20 washing with 2 liters of buffer M to eliminate collagenase, the oocytes were sorted by size to
21 collect stage VI (≈ 1200 μm of diameter). They were kept in buffer M at 16°C for experiments
22 and then immediately lysed or stored at -80°C.

23 Prophase-arrested oocytes were micro-injected with the following recombinant proteins
24 (injection volume: 50 nL per oocyte): 100 ng or 800 ng of GST-XeARPP19, GST-ClyARPP19, GST-
25 S109D-XeARPP19 or GST-S81D-ClyARPP19; 200 ng of GST-S49thio-ClyARPP19 or GST-S67thio-
26 XeARPP19; 75 ng of PKI.

27 Meiotic maturation was induced by 2 μM progesterone. Oocytes were referred to as GVBD
28 when the first pigment rearrangement was detected at the animal pole. The percentage of
29 oocytes at GVBD over the time, calculated for group of 20 to 30 injected oocytes, was then
30 fitted with a four-parameter logistic regression whose the equation is the following:

31
$$y = (x^{Hill\ slope}) \times \frac{100}{x^{Hill\ slope} + EC50^{Hill\ slope}}$$

32

33 *Clytia* oocyte handling

34 *Clytia hemisphaerica* fully grown (stage III) oocytes were obtained from manually isolated
35 ovaries of jellyfish cultured overnight in MFSW (Millipore filtrated seawater). The harvested
36 gonads in were opened lengthwise using fine tweezers. Oocytes were then recovered using
37 0.3 μm diameter tungsten wire loops mounted on glass capillaries. Meiotic maturation was
38 induced by MIH treatment (100 nM WPRP-NH₂(Takeda *et al.*, 2018). GVBD was scored every
39 5 minutes under Zeiss dissecting microscopes, or from time lapse films recorded using a Zeiss

1 Axiobserver with DIC optics. Protein injection into *Clytia* isolated oocytes was performed using
2 Nanoject compressed air microinjection systems (Eppendorf) (Momose & Houliston, 2007) in
3 continuous flow mode. Recombinant proteins and OA (Enzo Life Sciences) were diluted in PBS
4 and centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 5 minutes before injection. Solutions of 2-4 mg/ml
5 of each recombinant ARPP19 protein or 2 µM OA were injected, aiming at a delivering 3-5%
6 oocyte volume based on the size of the cloud of injected liquid. ADD

8 **Cloning and recombinant protein purification**

9 Construction of plasmids encoding GST-tagged XeARPP19, S109D-XeARPP19, S67A-XeARPP19
10 and PKI were previously described (Dupre *et al.*, 2014). A cDNA fragment encoding full ORF of
11 *Clytia* ARPP19, identified from gene models in the *Clytia* genome assembly and associated
12 transcriptome data (Leclere *et al.*, 2019) (Supp Fig. S1A and S1C) was amplified by PCR from
13 medusa gonad cDNA and subcloned into pGex4-T1 vector to express GST-tagged ClyARPP19.
14 S49A, S81D, S82D and S81D-S82D-ClyARPP19 were generated according to the manufacturer
15 protocol (Stratagene) and sequences were verified by DNA sequencing (Genewiz-Azenta,
16 Germany). The cDNA of 6XHIS-tagged S109A-XeARPP19 has been subcloned into pET14b
17 vector. Both vectors were used to transform BL21 strain of *E. coli* and GST-tagged or 6XHIS-
18 tagged recombinant proteins were produced by autoinduction (Studier, 2005). Bacteria were
19 lysed by sonification in PBS pH 7,4 (13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM KH₂PO₄, 1.4 mM
20 Na₂HPO₄) with 1 mg/ml lysozyme in the presence of 10% Triton. After a brief centrifugation
21 step, supernatants were loaded either onto an equilibrated glutathione-agarose column
22 (Sigma) for GST-tagged protein or on Nickel beads column (Qiagen) for 6XHIS-tagged protein.
23 Columns were then washed and eluted with respectively 10 mM glutathione in PBS or 160
24 mM imidazole diluted in 1 M of β-glycerophosphate. The purified proteins were concentrated
25 against polyethyleneglycol, dialyzed overnight against PBS and stored at -80°C.

27 ***Clytia in situ* hybridization**

28 For *in situ* hybridization, female jellyfish were fixed in 3.7% formaldehyde, 0.2%
29 glutaraldehyde in PBS on ice for 60-120 min. They were then washed 5 times with PBST (PBS
30 + 0.1% Tween20), dehydrated stepwise in methanol and stored in 100% methanol at -20°C.
31 Hybridization (at 62°C for 72h) and washing steps were performed in a robot (Intavis AG,
32 Bioanalytical Instruments) using 20X SSC pH adjusted to 4.7. Acetylation steps using 0.1M
33 triethanolamine in PBST (2x5min), then 0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine
34 (2x5min) followed by PBST washes (3x10min) were included before pre-hybridization to
35 reduce probe non-specific binding. Incubation with Anti-DIG AP, 1:2000 in 1X blocking solution
36 was performed for 3h and the NCB-BCIP performed at pH 9, monitoring colour development
37 under the binocular microscope. Following post-fixation, washing and equilibration of samples
38 in 50% glycerol/PBS, Images were acquired on an Olympus BX51 microscope.

40 **ARPP19 *in vitro* phosphorylation or thiophosphorylation by Gwl and PKA**

1 Active Gwl was obtained by injecting *Xenopus* prophase oocytes with mRNA encoding
2 Histidine-tagged *Xenopus* K71M-Gwl (Dupre *et al.*, 2013). Oocytes were collected at
3 metaphase II and K71M-Gwl was recovered by incubating the oocyte extract with Nickel beads
4 in the presence of 1 μ M OA (Enzo Life Sciences). Nickel beads were washed in kinase buffer
5 (20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM 2-Mercaptoethanol). Recombinant 400 μ M GST-ARPP19 or
6 6XHIS-S109A-XeARPP19 was added to the beads in the presence of 1 mM γ S-ATP. The reaction
7 was performed in a final volume of 60 μ L for 60 min at 30°C under stirring (750 RPM,
8 Thermomixer, Eppendorf). γ S-ATP was removed by dialyzing the reaction mix against kinase
9 buffer. For PKA thiophosphorylation, 3 nM of either XeARPP19 or various forms of ClyARPP19
10 (stock solutions at 1 μ g/ μ L) were incubated in the presence of 62.5 units of recombinant
11 bovine PKA (Promega) and 1 mM γ S-ATP in a final volume of 30 μ L of PKA Buffer (20 mM HEPES
12 pH 7.4, 20 mM MgCl₂), at 37°C under stirring (750 RPM, Thermomixer, Eppendorf). At
13 indicated times, 5 μ L of reaction were sampled, supplemented with Laemmli buffer (Laemmli,
14 1970) and heated for 1 minute at 90°C. To be detected by the thiophosphate-ester antibody,
15 thiophosphates incorporated in proteins were then subjected to alkylation by incubation with
16 1 mM P-nitrobenzyl mesylate (PNBM) (Cayman Chemical) for 1 hour at room temperature.
17 Samples were then stored at -20°C. Positive controls of XeARPP19 and ClyARPP19
18 phosphorylation used in various experiments were obtained by incubating 3 nM of XeARPP19
19 and ClyARPP19 for respectively 30 and 180 minutes to reach a similar thiophosphorylation
20 level for both proteins. In some experiments, XeARPP19 and ClyARPP19 were phosphorylated
21 by PKA. 100 ng of either XeARPP19 or ClyARPP19 were incubated with 200 μ M ATP and 25
22 units of recombinant bovine PKA (Promega) in PKA Buffer for 3 hours at 37°C under 1200 RPM
23 stirring. The reaction was stopped by Laemmli buffer (Laemmli, 1970) and heating for 1 minute
24 at 90°C.

25

26 **ARPP19 phosphorylation and dephosphorylation in *Xenopus* oocyte extract**

27 Prophase-arrested oocytes were lysed in 10 volumes of Extraction buffer (80 mM β -
28 glycerophosphate pH 7.3, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂). Lysates were centrifuged for 15
29 minutes at 12,000 rpm and 4°C and the supernatant was then used as the “oocyte extract”.
30 For PKA phosphorylation, 50 ng (25 μ M) of either GST-XeARPP19 or GST-ClyARPP19 (stock
31 solution of 1 μ g/ μ L) were added in 50 μ L of prophase extract previously incubated 30 min or
32 not with 75 ng PKI, and further incubated at 30°C, under 750 RPM stirring. 5 μ L of extract were
33 sampled every 5 minutes, supplemented with Laemmli buffer (Laemmli, 1970), heated at 90°C
34 for 1 minute and stored at -20°C. To measure ARPP19 dephosphorylation, “kinase-dead”
35 oocyte extracts, were generated by addition of 75 ng PKI, 0,1 units/ml hexokinase (Sigma) and
36 10 mM glucose to deplete endogenous ATP (Newmeyer *et al*, 1986) followed by a 1 hour
37 incubation at 18°C. In some experiments, kinase-dead extracts were incubated 3 consecutive
38 times with protein A-beads (Bio-Rad) previously coated with the anti-B55 δ antibody (1 hour
39 incubation at 4°C, followed by extensive washes) and Nickel beads (Qiagen) coated with 400
40 μ g of 6XHIS-S67thio-S109A-XeARPP19. The extract was then incubated with protein A-beads

1 to deplete free IgG against B55δ. 250 ng of GST-phosphoS109-XeARPP19 or GST-phosphoS81-
2 ClyARPP19 (stock solution of 1 μg/μL) were then added in 4 μL of kinase-dead oocyte extract
3 and incubated at 30°C under 1250 RPM stirring. 3 μL of extract were collected every 5 minutes,
4 supplemented with Laemmli buffer (Laemmli, 1970), heated and stored at -20°C. All western
5 blot signals were quantified using Image J software. In assays using recombinant GST-ARPP19,
6 each phosphorylation or thiophosphorylation signal was divided by the corresponding GST
7 signal to obtain a ratio (normalized signals).

8 *Dephosphorylation assays (Figs 2 and 6)*: the normalized signals were standardized on the time
9 0 minute that was set as 100% of phosphorylation. Standardized signals were fitted with a
10 one-phase decay equation (Supp Fig. S8):

$$11 \quad y = 100 \times e^{(-Kx)}$$

12 The half-time for each experiment, defined as the time of 50% of dephosphorylation, was
13 calculated with the following equation (Supp Fig. S8):

$$14 \quad \text{half life} = \frac{\ln(2)}{K}$$

15 Comparison of the half-times of dephosphorylation between XeARPP19 and ClyARPP19 was
16 done by applying a paired T-test.

17 *Phosphorylation assays (Fig. 8)*: the normalized signals were standardized on the time 60
18 minutes of XeARPP19 that was considered as 100% phosphorylation. Standardized signals
19 were fitted with a one-phase association equation (Supp Fig. S10):

$$20 \quad y = 100 \times (1 - e^{(-Kx)})$$

21 For each experiment, the half-time is defined as the time of 50% of phosphorylation and was
22 calculated with the following equation (Supp Fig. S10):

$$23 \quad \text{half time} = \frac{\ln(2)}{K}$$

24 Comparison of the half-times of phosphorylation between XeARPP19 and ClyARPP19 was
25 done by applying a paired T-test. *: P≤0.05; **: P≤0.01; ***: P≤0.001; ****: P≤0.0001;
26 P>0.05: not significant (ns).

27

28 **Antibodies and western blots**

29 The equivalent of 0.5 oocyte or 50 ng of Xe-ARPP19 and ClyARPP19 (*in vitro* and *in vivo*
30 phosphorylation/dephosphorylation assays) were loaded on 12% acrylamide gel, subjected to
31 SDS gel electrophoresis (Laemmli, 1970) and then transferred onto nitrocellulose membranes
32 (Dupre *et al*, 2002). The antibodies directed against the following proteins were used:
33 phosphoS109-XeARPP19 (Dupre *et al.*, 2014) (1:100,000 for *Xenopus* proteins or 1:500 for
34 *Clytia* proteins), phosphoS81-ClyARPP19 (1:160,000 for *Xenopus* proteins or 1:500 after retro-
35 elution for *Clytia* proteins, see Supp Fig. S6 for validation), B55δ (see Supp Fig. S9 for
36 validation), thiophosphate ester (1:60,000, Abcam ab92570), GST (1:5,000, Sigma A-7340),
37 karyopherin (1:1,000, Santa-Cruz biotechnology sc-1863), phospho-MAPK (1:1,000, Cell
38 Signaling 9106), phosphoY15-Cdk1 (1:1,000, Cell Signaling 9111) and phosphorylated-PKA
39 substrates (1:1000, Cell Signaling 9624). After overnight incubation at 4°C, nitrocellulose

1 membranes were incubated 1 hour at room temperature in the appropriate horse-radish
2 peroxidase-labeled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and revealed by
3 chemiluminescence (Pierce). All western blots are representative of at least three different
4 experiments.

5

6 **Bioinformatics and sequence alignments**

7 ARPP19 protein sequences were retrieved from public databases. Accession numbers along
8 with the *Clytia* ARPP19 protein and transcript sequence are provided in Supp Fig. S1.

9 Alignments of different subsets of sequences were made using Clustal Omega on the EBI
10 portal (www.ebi.ac.uk) and then compared and adjusted by eye.

11

1 **ACKNOWLEDGMENTS**

2 We thank Julie Uviera and Gonzalo Quiroga-Artigas for their invaluable contributions to the
3 *Clytia* oocyte injection experiments, and all members of the team “Oocyte Biology” for helpful
4 discussions. This work was supported by the National Center for Scientific Research (CNRS),
5 Sorbonne University and the National Research Agency (ANR grants 13-BSV2-0008-01 to C.J.
6 and E.H. and 18-CE13- 0013-01 to C.J.). F.M. received a PhD grant from the CNRS and from the
7 ARC foundation (Association pour la Recherche sur le Cancer, grant
8 ARCD0C42021120004303).

9

10

1 **REFERENCES**

- 2 Amiel A, Houliston E (2009) Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte
3 polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Dev Biol* 327: 191-203
- 4 Amiel A, Leclere L, Robert L, Chevalier S, Houliston E (2009) Conserved functions for Mos in
5 eumetazoan oocyte maturation revealed by studies in a cnidarian. *Curr Biol* 19: 305-311
- 6 Andrade EC, Musante V, Horiuchi A, Matsuzaki H, Brody AH, Wu T, Greengard P, Taylor JR,
7 Nairn AC (2017) ARPP-16 Is a Striatal-Enriched Inhibitor of Protein Phosphatase 2A
8 Regulated by Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinase 3 (Mast 3 Kinase). *J*
9 *Neurosci* 37: 2709-2722
- 10 Basu S (2011) PP2A in the regulation of cell motility and invasion. *Curr Protein Pept Sci* 12: 3-
11 11
- 12 Burkhardt P, Colgren J, Medhus A, Digel L, Naumann B, Soto-Angel JJ, Nordmann EL, Sachkova
13 MY, Kittelmann M (2023) Syncytial nerve net in a ctenophore adds insights on the evolution
14 of nervous systems. *Science* 380: 293-297
- 15 Castro A, Lorca T (2018) Greatwall kinase at a glance. *J Cell Sci* 131
- 16 Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiri A (2002) Role of
17 cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 187: 153-159
- 18 Cundell MJ, Hutter LH, Nunes Bastos R, Poser E, Holder J, Mohammed S, Novak B, Barr FA
19 (2016) A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during
20 mitotic exit. *J Cell Biol* 214: 539-554
- 21 Deguchi R, Takeda N, Stricker SA (2011) Comparative biology of cAMP-induced germinal
22 vesicle breakdown in marine invertebrate oocytes. *Mol Reprod Dev* 78: 708-725
- 23 Dounay AB, Forsyth CJ (2002) Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein
24 phosphatase inhibitor. *Curr Med Chem* 9: 1939-1980
- 25 Dulubova I, Horiuchi A, Snyder GL, Girault JA, Czernik AJ, Shao L, Ramabhadran R, Greengard
26 P, Nairn AC (2001) ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated
27 phosphoproteins. *J Neurochem* 77: 229-238
- 28 Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in
29 laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-179
- 30 Dupre A, Buffin E, Roustan C, Nairn AC, Jessus C, Haccard O (2013) The phosphorylation of
31 ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in
32 *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 126: 3916-3926
- 33 Dupre A, Daldello EM, Nairn AC, Jessus C, Haccard O (2014) Phosphorylation of ARPP19 by
34 protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications*
35 5: 3318
- 36 Dupre A, Jessus C (2017) ARPP19 Phosphorylations by PKA and Greatwall: The Yin and the
37 Yang of the Cell Decision to Divide. In: *Protein Phosphorylation*, Prigent C. (ed.) pp. 3-29.
38 IntechOpen: Rijeka, Croatia
- 39 Dupre A, Jessus C, Ozon R, Haccard O (2002) Mos is not required for the initiation of meiotic
40 maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 21: 4026-4036
- 41 Dupre AI, Haccard O, Jessus C (2017) The greatwall kinase is dominant over PKA in controlling
42 the antagonistic function of ARPP19 in *Xenopus* oocytes. *Cell Cycle* 16: 1440-1452
- 43 Eysers PA, Liu J, Hayashi NR, Lewellyn AL, Gautier J, Maller JL (2005) Regulation of the G(2)/M
44 transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:
45 24339-24346

1 Freeman G, Ridgway EB (1988) The role of cAMP in oocyte maturation and the role of the
2 germinal vesicle contents in mediating maturation and subsequent developmental events
3 in hydrozoans. *Roux Arch Dev Biol* 197: 197-211

4 Gharbi-Ayachi A, Labbé J-C, Burgess A, Vigneron S, Strub J-M, Brioude E, Van-Dorselaer A,
5 Castro A, Lorca T (2010) The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by
6 Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science* 330: 1673-1677

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

10 Grau-Bove X, Torruella G, Donachie S, Suga H, Leonard G, Richards TA, Ruiz-Trillo I (2017)
11 Dynamics of genomic innovation in the unicellular ancestry of animals. *eLife* 6

12 Haccard O, Jessus C (2011) Greatwall Kinase, ARPP-19 and Protein Phosphatase 2A: Shifting
13 the Mitosis Paradigm. *Results Probl Cell Differ* 53: 219-234

14 Hoffman A, Taleski G, Sontag E (2017) The protein serine/threonine phosphatases PP2A, PP1
15 and calcineurin: A triple threat in the regulation of the neuronal cytoskeleton. *Mol Cell*
16 *Neurosci* 84: 119-131

17 Horiuchi A, Williams KR, Kurihara T, Nairn AC, Greengard P (1990) Purification and cDNA
18 cloning of ARPP-16, a cAMP-regulated phosphoprotein enriched in basal ganglia, and of a
19 related phosphoprotein, ARPP-19. *The Journal of biological chemistry* 265: 9476-9484

20 Houliston E, Momose T, Manuel M (2010) *Clytia hemisphaerica*: a jellyfish cousin joins the
21 laboratory. *Trends Genet* 26: 159-167

22 Huchon D, Ozon R, Fischer EH, Demaille JG (1981) The pure inhibitor of cAMP-dependent
23 protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation. A 4-step scheme for meiotic
24 maturation. *Mol Cell Endocrinol* 22: 211-222

25 Jessus C, Munro C, Houliston E (2020) Managing the Oocyte Meiotic Arrest-Lessons from Frogs
26 and Jellyfish. *Cells* 9

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

30 Juanes MA, Khoueiry R, Kupka T, Castro A, Mudrak I, Ogris E, Lorca T, Piatti S (2013) Budding
31 yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for
32 timely mitotic progression. *PLoS genetics* 9: e1003575

33 Kishimoto T (2018) MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish
34 oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 94: 180-203

35 Kovo M, Kandli-Cohen M, Ben-Haim M, Galiani D, Carr DW, Dekel N (2006) An active protein
36 kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*
37 *(Cambridge, England)* 132: 33-43

38 Labandera AM, Vahab AR, Chaudhuri S, Kerk D, Moorhead GB (2015) The mitotic PP2A
39 regulator ENSA/ARPP-19 is remarkably conserved across plants and most eukaryotes.
40 *Biochem Biophys Res Commun* 458: 739-744

41 Labbe JC, Vigneron S, Mechali F, Robert P, Roque S, Genoud C, Goguuet-Rubio P, Barthe P,
42 Labesse G, Cohen-Gonsaud M *et al* (2021) The study of the determinants controlling
43 Arpp19 phosphatase-inhibitory activity reveals an Arpp19/PP2A-B55 feedback loop. *Nature*
44 *communications* 12: 3565

45 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
46 bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

1 Lambert CC (2011) Signaling pathways in ascidian oocyte maturation: the roles of cAMP/Epac,
2 intracellular calcium levels, and calmodulin kinase in regulating GVBD. *Mol Reprod Dev* 78:
3 726-733

4 Lechable M, Jan A, Duchene A, Uveira J, Weissbourd B, Gissat L, Collet S, Gilletta L, Chevalier
5 S, Leclere L *et al* (2020) An improved whole life cycle culture protocol for the hydrozoan
6 genetic model *Clytia hemisphaerica*. *Biol Open* 9

7 Leclere L, Horin C, Chevalier S, Lapebie P, Dru P, Peron S, Jager M, Condamine T, Pottin K,
8 Romano S *et al* (2019) The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution
9 of the cnidarian life-cycle. *Nature ecology & evolution* 3: 801-810

10 Lemonnier T, Daldello EM, Poulhe R, Le T, Miot M, Lignieres L, Jesus C, Dupre A (2021) The
11 M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55delta opposes protein kinase A on Arpp19 to
12 initiate meiotic division. *Nature communications* 12: 1837

13 Lemonnier T, Dupre A, Jesus C (2020) The G2-to-M transition from a phosphatase
14 perspective: a new vision of the meiotic division. *Cell Div* 15: 9

15 Maller JL, Butcher FR, Krebs EG (1979) Early effect of progesterone on levels of cyclic
16 adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 254: 579-582

17 Maller JL, Krebs EG (1977) Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes.
18 Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-
19 monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 252: 1712-1718

20 Masui Y (2001) From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of
21 Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 69: 1-17

22 Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T (2009) Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for
23 controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 28: 2777-2785

24 Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T (2010) Greatwall phosphorylates an inhibitor of
25 protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* 330: 1670-1673

26 Momose T, Houliston E (2007) Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in
27 a cnidarian embryo. *PLoS biology* 5: e70

28 Munro C, Cadis H, Pagnotta S, Houliston E, Huynh JR (2023) Conserved meiotic mechanisms in
29 the cnidarian *Clytia hemisphaerica* revealed by Spo11 knockout. *Sci Adv* 9: eadd2873

30 Musante V, Li L, Kanyo J, Lam TT, Colangelo CM, Cheng SK, Brody AH, Greengard P, Le Novere
31 N, Nairn AC (2017) Reciprocal regulation of ARPP-16 by PKA and MAST3 kinases provides a
32 cAMP-regulated switch in protein phosphatase 2A inhibition. *eLife* 6

33 Nader N, Courjaret R, Dib M, Kulkarni RP, Machaca K (2016) Release from *Xenopus* oocyte
34 prophase I meiotic arrest is independent of a decrease in cAMP levels or PKA activity.
35 *Development* 143: 1926-1936

36 Newmeyer DD, Lucocq JM, Burglin TR, De Robertis EM (1986) Assembly in vitro of nuclei active
37 in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmic accumulation. *EMBO J* 5:
38 501-510

39 Ozon R, Belle R, Huchon D, Mulner O (1979) Roles of cyclic AMP and calcium in maturation of
40 *Xenopus laevis* oocytes. *J Steroid Biochem* 11: 709-713

41 Quiroga Artigas G, Lapebie P, Leclere L, Bauknecht P, Uveira J, Chevalier S, Jekely G, Momose
42 T, Houliston E (2020) A G protein-coupled receptor mediates neuropeptide-induced oocyte
43 maturation in the jellyfish *Clytia*. *PLoS biology* 18: e3000614

44 Quiroga Artigas G, Lapebie P, Leclere L, Takeda N, Deguchi R, Jekely G, Momose T, Houliston
45 E (2018) A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish *Clytia*.
46 *eLife* 7

1 Schultz DT, Haddock SHD, Bredeson JV, Green RE, Simakov O, Rokhsar DS (2023) Ancient gene
2 linkages support ctenophores as sister to other animals. *Nature* 618: 110-117
3 Stricker SA, Smythe TL (2001) 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than
4 inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development* 128: 1415-1427
5 Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.
6 *Protein Expr Purif* 41: 207-234
7 Takai A, Bialojan C, Troschka M, Ruegg JC (1987) Smooth muscle myosin phosphatase
8 inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett* 217: 81-84
9 Takeda N, Kon Y, Quiroga Artigas G, Lapebie P, Barreau C, Koizumi O, Kishimoto T, Tachibana
10 K, Houliston E, Deguchi R (2018) Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as
11 oocyte maturation-inducing hormones. *Development* 145
12 Takeda N, Kyojuka K, Deguchi R (2006) Increase in intracellular cAMP is a prerequisite signal
13 for initiation of physiological oocyte meiotic maturation in the hydrozoan *Cytaeis uchidae*.
14 *Dev Biol* 298: 248-258
15 Vigneron S, Brioude E, Burgess A, Labbe JC, Lorca T, Castro A (2009) Greatwall maintains
16 mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J* 28: 2786-2793
17 Von Stetina JR, Orr-Weaver TL (2011) Developmental control of oocyte maturation and egg
18 activation in metazoan models. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005553
19 Voronina E, Wessel GM (2003) The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 58: 53-
20 110
21 Wang J, Liu XJ (2004) Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes:
22 demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J Cell Sci* 117:
23 5107-5116
24 Yamashita M (1988) Involvement of cAMP in initiating maturation of the brittle-star
25 *Amphipholis kochii* oocytes: induction of oocyte maturation by inhibitors of cyclic
26 nucleotide phosphodiesterase and activators of adenylate cyclase. *Dev Biol* 125: 109-114
27 Yi JH, Lefievre L, Gagnon C, Anctil M, Dube F (2002) Increase of cAMP upon release from
28 prophase arrest in surf clam oocytes. *J Cell Sci* 115: 311-320
29
30

1 **FIGURE LEGENDS**

2
3 **Figure 1. The conservation of the PKA site of ARPP19 is restricted to the animal kingdom.**

4 **(A)** Comparison of ARPP19 protein sequences from a selection of eukaryotic species (right).
5 The Gwl (F-D-S*-G-D-Y) and PKA (R/K-R/K-X-S*/T*) phosphorylation sites, the GxxxPTPxxφP
6 sequence and the SxL terminal motif are colored in green, purple, yellow blue and red
7 respectively. Residues in yellow and grey may vary from one species to another. The
8 phylogenetic tree on the left indicates relationships between the main eukaryotic clades to
9 which these species belong, adapted from(Grau-Bove *et al*, 2017). Additional sequence
10 alignments and all accession numbers are provided in Supp Figs. S1 and S2.

11 **(B)** Alignments of ClyARPP19 and XeARPP19 (same color code as in A). The Gwl (F-D-S*-G-D-
12 Y) and PKA (R/K-R/K-X- S*/T*) phosphorylation sites identified in XeARPP19 are conserved in
13 ClyARPP19. S67 and S109 correspond to the serines phosphorylated by Gwl and PKA
14 respectively in XeARPP19. Their equivalents are respectively S49 and S81 in ClyARPP19. They
15 are indicated by an arrow.

16 **(C)** *In situ* hybridization detecting ClyARPP19 mRNA in a female baby medusa (left) and an
17 adult isolated ovary (right). G= gonad; nr= nerve ring; tb= tentable bulb; man: manubrium
18 (feeding organ); vo = vitellogenic oocytes; pvo= pre-vitellogenic oocytes. Scale bar= 100μm.
19

20 **Figure 2. XeARPP19 and ClyARPP19 thio-phosphorylated on the Gwl site induce meiosis**
21 **resumption in *Xenopus* oocytes and inhibit PP2A.**

22 **(A)** GVBD time-course of oocytes stimulated or not by progesterone (Pg) or injected with 200
23 ng of either GST-S67thio-XeARPP19 or GST-S49thio-ClyARPP19. One representative
24 experiment out of 3 is shown.

25 **(B)** Oocytes from the experiment illustrated in (A) were collected at GVBD and lysates were
26 immunoblotted for karyopherin as a loading control, GST (tag of ARPP19 proteins),
27 phosphorylated MAPK (pMAPK) and Y15-phosphorylated Cdk1 (pY15-Cdk1). The experiment
28 was repeated 3 times with similar results.

29 **(C)** *Xenopus* prophase oocyte extracts were incubated with hexokinase/glucose and PKI.
30 Extracts were supplemented or not with S49-thiophosphorylated ClyARPP19 for 5 min, then
31 with C-ter-XeARPP19 phosphorylated on S109 as a substrate. At indicated times, the
32 phosphorylation of C-ter-XeARPP19 was analyzed by western blot with antibodies raised
33 against phosphoS109-XeARPP19. The total amount of the substrate and of ClyARPP19 were
34 detected by an anti-GST antibody. Karyopherin was used as a loading control.

35 **(D)** Quantification of the phosphorylation level of C-ter-XeARPP19 of 3 independent
36 experiments performed as in (C). The dashed lines correspond to the mean of the 3
37 experiments.

38 **(E)** Comparison of the half-time dephosphorylation of C-ter-XeARPP19 calculated from 3
39 independent experiments performed as in (C), each represented by a dot. Paired T-test no
40 treatment/S49thio-ClyARPP19 half-time Pvalue = 0.0388.
41

1 **Figure 3. Phosphorylation and effects of XeARPP19 and ClyARPP19, or OA, on maturation in**
2 ***Clytia* oocytes.**

3 **(A)** GST-XeARPP19 (3mg/ml) or control buffer were injected in *Clytia* prophase-arrested
4 oocytes. One hour after injection, MIH was added or not. Oocytes were collected either at
5 GVBD (15 minutes after MIH addition), or at the prophase stage (without MIH). Lysates were
6 immunoblotted with antibodies against GST, phosphoS67-XeARPP19, phosphoS109-
7 XeARPP19 and phosphoPKA substrates.

8 **(B)** GST-ClyARPP19 (3mg/ml) or control buffer were injected in *Clytia* prophase-arrested
9 oocytes. One hour after injection, MIH was added or not. Oocytes were collected either at
10 GVBD (15 minutes after MIH addition), or at the prophase stage (without MIH). Lysates were
11 immunoblotted with antibodies against GST, phosphoS67-XeARPP19, phosphoS81-ClyARPP19
12 and phosphoPKA substrates.

13 **(C)** Summary of experiments in which GST-XeARPP19 (4mg/ml), GST-ClyARPP19 (4mg/ml), OA
14 (2 μ M) or control buffer were injected into *Clytia* prophase-arrested oocytes. Within one hour
15 after injection, contractions followed by the lysis of the oocytes were observed in some cases
16 (purple). The percentage of oocytes exhibiting this cytological effect is indicated. In other
17 experiments, MIH (10⁻⁷ M WPRP-amide) was added and GVBD was monitored. The percentage
18 of oocytes that underwent GVBD in the absence (spontaneous GVBD, orange) or in the
19 presence (MIH-induced GVBD, red) of MIH is indicated. Each point represents one experiment.
20 The average of the experiments (A) is indicated for each condition. Full details and data for
21 these experiments is provided in Supplementary Table 1.

22

23 **Figure 4. Identification of the ClyARPP19 residue phosphorylated by PKA.**

24 **(A)** Summary of the different mutations introduced into ClyARPP19.

25 **(B)** Wild-type (WT), single or double mutants of ClyARPP19 at S81 and S82 (S81D, S82D and
26 S81D-S82D) were thiophosphorylated *in vitro* using recombinant bovine PKA catalytic subunit
27 in the presence of γ S-ATP for 2 hours. The thiophosphorylation was analyzed by western-blot
28 with an anti-thiophosphate ester antibody. The levels of ClyARPP19 proteins were detected
29 with an anti-GST antibody. The experiment was repeated 3 times with similar results.

30

31 **Figure 5. ClyARPP19 and XeARPP19 phosphorylated on the PKA sites modulate oocyte**
32 **meiosis resumption.**

33 **(A)** GVBD time course of oocytes injected with either XeARPP19 or ClyARPP19 (800 ng/oocyte)
34 and then stimulated by Pg. One representative experiment from 4 independent experiments
35 is shown.

36 **(B)** Time to reach 50% GVBD for the 3 conditions of panel (A). Ordinary one-way ANOVA
37 analysis: XeARPP19/Pg Pvalue=0.0005, ClyARPP19/Pg Pvalue=0.8593 (ns). Each dot represents
38 an independent experiment.

39 **(C)** % of GVBD 9 hours after Pg addition for the 3 conditions of panel (A). Ordinary one-way
40 ANOVA: XeARPP19/Pg Pvalue=0.0009, ClyARPP19/Pg Pvalue=0.9093 (ns). Each dot represents
41 an independent experiment.

1 (D) Same experiment as in (A) with injection of S109D-XeARPP19 or S81D-ClyARPP19 (800
2 ng/oocyte). One representative experiment from 4 independent experiments is shown.
3 (E) Time to reach 50% GVBD for the 3 conditions of panel (D). Note that S109D-XeARPP19
4 injected oocytes never reached GVBD. Ordinary one-way ANOVA: Pg/S81D-ClyARPP19
5 Pvalue=0.0040. Each dot represents an independent experiment.
6 (F) % of GVBD 9 hours after Pg addition for the 3 conditions of panel (D). Ordinary one-way
7 ANOVA: Pg/S109D-XeARPP19 Pvalue<0.0001, Pg/S81D-ClyARPP19 Pvalue=0.0988. Each dot
8 represents an independent experiment.
9 (G) Oocytes from experiments represented in (A) and (D) were collected at GVBD and lysates
10 were immunoblotted for karyopherin as a loading control, GST (tag of ARPP19 proteins),
11 phosphorylated MAPK (pMAPK) and Y15-phosphorylated Cdk1 (pY15-Cdk1). The experiment
12 was repeated 4 times with similar results.
13 (H) ARPP19 proteins, either wild-type or mutated (S81D-ClyARPP19 or S109D-XeARPP19) were
14 injected in *Clytia* prophase-arrested oocytes. MIH was then added or not and GVBD was
15 monitored. The number of oocytes having undergone GVBD is indicated.

16

17 **Figure 6. S81 phosphorylation and dephosphorylation of ClyARPP19 in *Xenopus* oocyte**
18 **extracts.**

19 (A) After 30 minutes preincubation with or without PKI, *Xenopus* prophase oocyte extracts
20 were supplemented with XeARPP19 (left panel) or ClyARPP19 (right panel). At indicated times,
21 samples were collected and phosphorylation was analyzed by western blot with antibodies
22 raised against phosphoS109-XeARPP19 or phosphoS81-ClyARPP19. The total ARPP19 amount
23 was detected by an anti-GST antibody. Karyopherin was used as a loading control. A control
24 (CTL) is represented by recombinant XeARPP19 and ClyARPP19 *in vitro* phosphorylated by PKA
25 for 2 hours. One representative experiment from 3 independent experiments is shown.

26 (B) *Xenopus* prophase oocyte extracts were incubated with hexokinase/glucose and PKI. They
27 were supplemented with S109-phosphorylated XeARPP19 (left panel) or S81-phosphorylated
28 ClyARPP19 (right panel). At indicated times, samples were collected and the phosphorylation
29 level was followed by western blot using antibodies directed against phosphoS109-XeARPP19
30 or phosphoS81-ClyARPP19. The total ARPP19 amount was detected by an anti-GST antibody.
31 One representative experiment from 3 independent experiments is shown.

32 (C) Quantification of the phosphorylation level of 3 independent experiments performed as in
33 (B). The dashed lines correspond to the mean of the 3 experiments.

34 (D) Comparison of the half-time dephosphorylation of phosphoS81-ClyARPP19 and
35 phosphoS109-XeARPP19 calculated from 3 independent experiments performed as in (B),
36 each represented by a dot. Unpaired T-test XeARPP19/ClyARPP19 half-time Pvalue = 0.0026.

37

38 **Figure 7. ClyARPP19 is dephosphorylated by PP2A-B55 δ on S81**

39 (A) *Xenopus* prophase oocyte extracts were incubated with hexokinase/glucose and PKI. They
40 were depleted or not in B55 δ by beads coated with S67thio-S109A-XeARPP19 and B55 δ
41 antibody. They were then supplemented with S109-phosphorylated XeARPP19 or S81-

1 phosphorylated ClyARPP19 for 45 min. The phosphorylation level was estimated by western
2 blot using antibodies directed against phosphoS109-XeARPP19 or phosphoS81-ClyARPP19.
3 The total Arpp19 amount was detected by an anti-GST antibody and B55 δ by a specific
4 antibody. Karyopherin was used as a loading control. One representative experiment from 3
5 independent experiments is shown.

6 **(B)** Quantification of the phosphorylation level at 45 min of 3 independent experiments
7 performed as in (A), each of them represented by a dot. Data are shown as mean +/- SD.
8 Ordinary one-way ANOVA has been applied. S109XeARPP19 dephosphorylation: no treatment
9 0'/no treatment 45' Pvalue=0.0471, no treatment 0'/B55 depletion Pvalue=0.3873.
10 S81ClyARPP19 dephosphorylation: no treatment 0'/no treatment 45' Pvalue=0.0021, no
11 treatment 0'/B55 depletion Pvalue=0.0537.

12
13 **Figure 8. ClyARPP19 is phosphorylated *in vitro* by PKA at low rate compared to XeARPP19.**

14 **(A)** Purified bovine PKA was incubated with XeARPP19 or ClyARPP19 in the presence of γ S-
15 ATP. Samples were collected at various times as indicated. The phosphorylation of ARPP19
16 proteins was assessed by western blot with an anti-thiophosphate ester antibody. The total
17 ARPP19 amount was detected by an anti-GST antibody.

18 **(B)** Quantification of the phosphorylation level of 3 independent experiments performed as in
19 (A). The dashed lines correspond to the mean of the 3 experiments.

20 **(C)** The half-time of XeARPP19 and ClyARPP19 phosphorylation by PKA was determined from
21 the regression curve of the phosphorylation level obtained for the 3 independent
22 experiments, each represented by a dot. Unpaired T-test XeARPP19/ClyARPP19 half-time
23 Pvalue=0.0361.

24
25 **Figure 9. Phosphorylation of XeARPP19 and ClyARPP19 by PKA in *Xenopus* oocytes.**

26 **(A)** XeARPP19 or ClyARPP19 were injected into *Xenopus* oocytes previously injected or not
27 with PKI. 30 min after ARPP19 injection, injected ARPP19 proteins were recovered by GST pull-
28 down and their phosphorylation was monitored by western blot using antibodies against
29 phosphoS109-XeARPP19 or phosphoS81-ClyARPP19. The total ARPP19 amount was detected
30 with an anti-GST antibody. Three groups of 5 oocytes (A, B and C) were analyzed in both
31 conditions. An *in vitro* phosphorylated form of ARPP19 was used as a positive control of
32 phosphorylation (CTL). One representative experiment from 3 independent experiments is
33 shown.

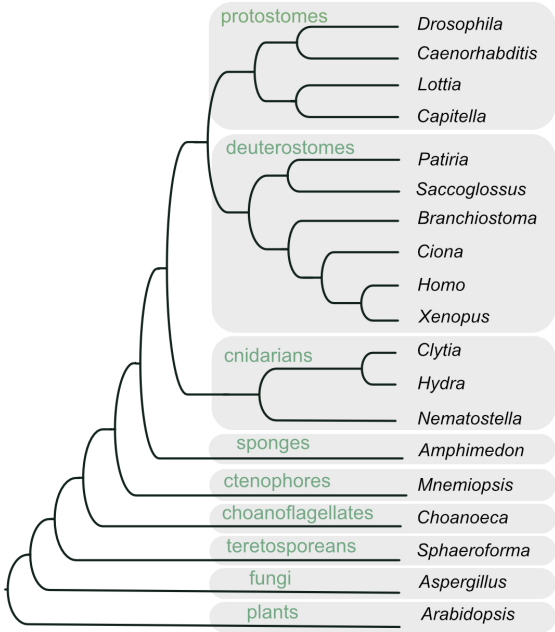
34 **(B)** Quantification of the phosphorylation level of S109-XeARPP19 or S81-ClyARPP19
35 expressed as the % of the phosphorylation of the positive control. The quantifications were
36 made from 3 independent experiments performed as in (A). Data are shown as mean +/- SD.
37 Each dot represents one experiment. Ordinary one-way ANOVA: +PKI/-PKI Pvalue<0.0001.

38
39 **Figure 10. Complexification of ARPP19 phosphorylation sites and functions in oocyte**
40 **maturation during animal evolution.**

1 **(A)** Evolutionary history of the PKA and Gwl sites of ARPP19 among Opisthokonts. **1.** A widely
2 conserved Gwl phosphorylation site among eukaryotes, hence present in the opisthokont
3 ancestor. **2.** Arising of a consensus PKA phosphorylation site early in the clade Metazoa. It
4 could play a biological role common to these animals, but not related to oocyte meiotic
5 maturation. **3.** Loss of the PKA site in *Porifera*. **4.** Species specific changes in the
6 phosphorability of the PKA site: strong in *Xenopus*, weak in *Clytia*.
7 **(B)** Functions of ARPP19 in oocyte meiotic maturation. **1. Prophase arrest.** In *Xenopus*, PKA is
8 active and phosphorylates ARPP19 that indirectly inhibits MPF activation by unknown
9 mechanisms. In *Clytia*, PKA is inactive and ARPP19, even if its phosphorylation by PKA is
10 artificially mimicked, is unable to inhibit MPF. **2. MIH stimulation and meiotic maturation**
11 **initiation.** In *Xenopus*, progesterone causes a drop of PKA activity, ARPP19 is
12 dephosphorylated, releasing the activatory pathway of MPF. In *Clytia*, MIH activates PKA
13 whose hypothetical substrate X activates MPF. **3. Entry into M-phase.** In both species, Gwl
14 phosphorylates ARPP19 that plays its highly conserved action as a PP2A-B55 inhibitor,
15 essential for MPF activity.
16
17

Figure 1

A



<i>Drosophila</i>	-----MSSAEEN-----	-----SNSPA-----	---TTPQ---	---DTTETQANLTDLEKIEEELKSKYPSG
<i>Caenorhabditis</i>	-----MRGE-----	-----AGEL-----	---A-----	---VSSGEIATGALSPEKQEQELMKLAAT
<i>Lottia</i>	-----MSMASE-----	-----TGND-----	---VPTG---	---DADVKQPKQKVTVEQEARLRSKYPNL
<i>Capitella</i>	-----MSQEEO-----	-----RIASAGS-----	-----KASDEGSEKVDGSEKDFKVPKSLVDIEREQENKLRKARYGV	
<i>Patiria</i>	MSDNSVKAQKQATEQEPKPEAQTAEETETEPEVEDKPTPLPLGG-----	-----KENQQA-----	---AS-----	---FKPFLDVKPLQSPKMEAKLSAKYGV
<i>Saccoglossus</i>	-----MSIETSQKSQLQEMEAELSKYVGM			
<i>Branchiostoma</i>	-----MATDTA-----	---RP-----	---PSMESGEAKELTPEQAEAKLAKYPAL	
<i>Ciona</i>	MSVSP---DVVPTMEPVNKPYETVPSISVQQEQQLLAKAYGNL			
<i>Homo</i>	-----MSAEVPEAAS-----	---AE-EQKSEH-----	-----NMLPW-----	-----SLQPS-----
<i>Xenopus</i>	-----MSGNQET-----	-----K-----	-----AQEES-----	---SA-----
<i>Hydra</i>				---LEQKEIDDKVSPSEKIEILKARYPNL
<i>Nematostella</i>				---MSTMATFGKQPELPEAERFKQKFPQ---
<i>Amphimedon</i>				---MEATLKIQDQSEADHFKNKFPNK
<i>Mnemiopsis</i>				---MSAEPATNATLSEEEKFKRFPNK
<i>Choanoeca</i>				---MANKEE-----
<i>Sphaeroforma</i>				---ATVPEVKPSESEKDTIDPKKSEQLMSRYPKH
<i>Aspergillus</i>	-----MASCQED-----	---Q-----	---IPSNTAGSDVNASNTSNEVISEVASDVPVN---	---APANAPLAQAQTEEEKKAAKRYGMM
<i>Arabidopsis</i>				---HADAGLTPEQIMFKKYGRLL
				---MADAPSNLSAQDQFLKFKGRLL
				---MNPHQNKIDTSKMSPDQERFLRLYGM
				---MED-----
				---VKGKEIIDDAPIDNKSDEMESENAIKKYGL
<i>Drosophila</i>	---MRVPGGHSALQKRLQ---	---KQKFFFDSDYQMAKQKGGVYK---	-----QV-----	-----FANKV
<i>Caenorhabditis</i>	---QKRFFDSDYAMDKSKAGTGLGSK---	---PHPLAGGPPPAAPPVVAQRSPAPAAATPSASPTSQQTNRPSSDRNSD		-----FLTEE
<i>Lottia</i>	---KGGGSAILQKRLI---	---NKGKYFDSDYMAKAKLNNPKPLNQ---	-----SEK-----	-----APALA
<i>Capitella</i>	---KSGGSALLQKRIA---	---KPKQFFDSDYMAKAKKQVPT---	---VG-----	---VKLPYN---
<i>Patiria</i>	---KPGGSDFLRKRLLN---	---KGVNYFDSDYQMEQSGKMLRPNSSGKPMGLAGARVG---	---GAMPAP---	---LPRGP---
<i>Saccoglossus</i>	---QRPGGSDFLRKRLLQ---	---KGPKYFDSDYMAKATKQGLLRKPNNA---	---NGG---	---EKMPPP---
<i>Branchiostoma</i>	GHQQRPGGSDFLRKRLLQ---	---KGPKYFDSDYMAKAKTKKVPKIRG---	---NG---	---AR-LPQ---
<i>Ciona</i>	---AKGGSLLQKRLAQ---	---KGGNYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---PI---
<i>Homo</i>	---KPKGSDFLRKRLLQ---	---KQKQYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---TAA---
<i>Xenopus</i>	G---KPKGSDFLRKRLLQ---	---KQKQYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---TAA---
<i>Clytia</i>	G---APRQSDFLRKRLLQ---	---KGGAKYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---SDKTE---
<i>Hydra</i>	G---APKQTDFLRKRLLQ---	---KSGGKYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---NV---
<i>Nematostella</i>	---KMTTDDMRKRLLQ---	---KGVKYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---ATI---
<i>Amphimedon</i>	---LQPKQSAQRKI-S---	---SGGVQYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---NPAVL---
<i>Mnemiopsis</i>	---KKKQSDVMKRMRM---	---GGGVQYFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---
<i>Choanoeca</i>	---PPKXVMKQPLGRVGGGERFTFADHMSKAGISV---			---
<i>Sphaeroforma</i>	---PPKXVMKQPLGRVGGGERFTFADHMSKAGISV---			---
<i>Aspergillus</i>	---PTKDLLQMK---	---LKERAFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---
<i>Arabidopsis</i>	---LPKKIPLISK---	---DHERAFDSDYMAKAKMKNKQLP---		---
<i>Drosophila</i>	TTTEAIRTPEVPA-RKTSII--QPCKFP-----	-----ATS-----		
<i>Caenorhabditis</i>	DDNLQIRPDTVPO-RKASIIIN--PWHCKLSPAPHVQHDAASPNATSE			
<i>Lottia</i>	SVGEAIRTPEVPA-RKASL--PKLWNLPLEQAKQ			
<i>Capitella</i>	PTQDEHIRTPEVPA-RKASLV--QNKLTRLT			
<i>Patiria</i>	ATQKIPTPEVPA-RKOSTE--IRKIAV			
<i>Saccoglossus</i>	LTQDSIPTPEVPA-RKSSIT--ARKAAM			
<i>Branchiostoma</i>	VTIDTIPTPEVPA-RKPSLQ--TKKIVS--DQPQITKPEAVV			---GLKKGDDGAGEEKKDEEKPEEQSTENQENHHS
<i>Ciona</i>	VTEDHMTPEVPA-RKASQSS--LVI--PQLN			
<i>Homo</i>	VTEDHMTPEVPA-RKPSLV--ARKIAG			
<i>Xenopus</i>	VTEDHMTPEVPA-RKPSLV--ARKIAG			
<i>Clytia</i>	PTQKAIPTPEVPA-RKISSTK--QNLIEGG-TSPQSQALP			---EKKAVTEGEQHSKHQITEQE
<i>Hydra</i>	ITQKAIPTPEVPA-RKPSSS--QNLIEGG-TSPQSQALP			---EKKAVTEGEQHSKHQITEQE
<i>Nematostella</i>	AVGKGIPTPEVPA-RKISVSP--MTEHPVTQVTPHQP			---HTMVEVEN
<i>Amphimedon</i>	---PGRPAINPAMARLQGRP--PKITAPKSGLASVARSEQ			
<i>Mnemiopsis</i>	AINPEQPAPEKLRN-RKASIPNKTFIRIQS			
<i>Choanoeca</i>	DNGKVIIPENISA-KPHAX--PQMTKGAUVDEDAADAESAAPA			---TDTAAEPEEKPAQ
<i>Sphaeroforma</i>	KVGRALPTPEVPA-HSDNVQPKQHSSEKSGSLTNPDKPS			---DSEKKA
<i>Aspergillus</i>	NIGSQHVPENIPLTATSPGANPAAASNGSISAQGGQITPGSISGHPGSIQFQSRSPVKEASYLQRETSADETEAEKEDDVSPPPARGGVPIRQ			
<i>Arabidopsis</i>	LRPKLQITPQQPRARRMAYSSGETEDTEIDNNEAPDDQ			---ACASAVDSTNLKDDG---AKDNKS

B

<i>Clytia</i>	-----MSTMATFGKQPELPEAERFKQKFPQG---	APRQSDFLRKRLLQGGGAKYFDSDYMAKAKMKNKQLP	-----RVNPTGKAIPTPEVPA-RKISSTK--QNLIEGG-TSPQSQALP	-----EKKAVTEGEQHSKHQITEQE
<i>Xenopus</i>	MSGNQETKAQEESALAEQKEIDDKVSPSEKIEILKARYPNL	GKPGGSDFLRKRLLQ--KQKQYFDSDYMAKAKMKNKQLP	LAATSDKTEVTGDIHTPQDLRKRPSLV-ASKIAG	

C

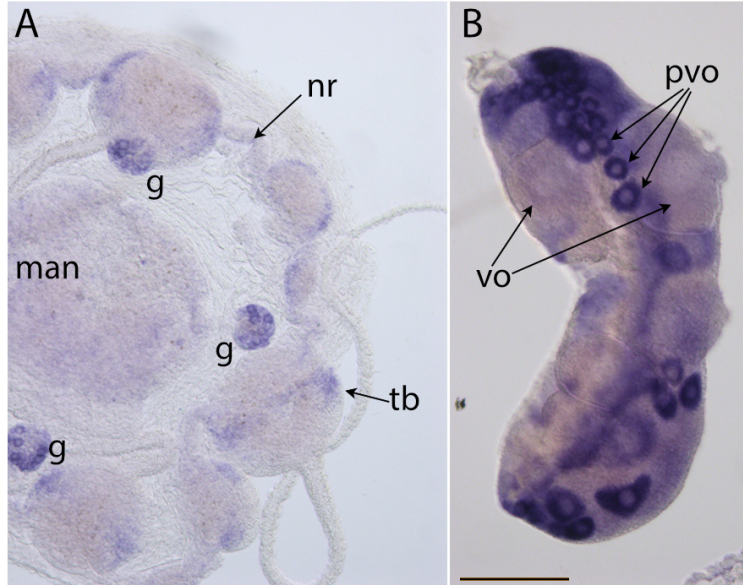


Figure 2

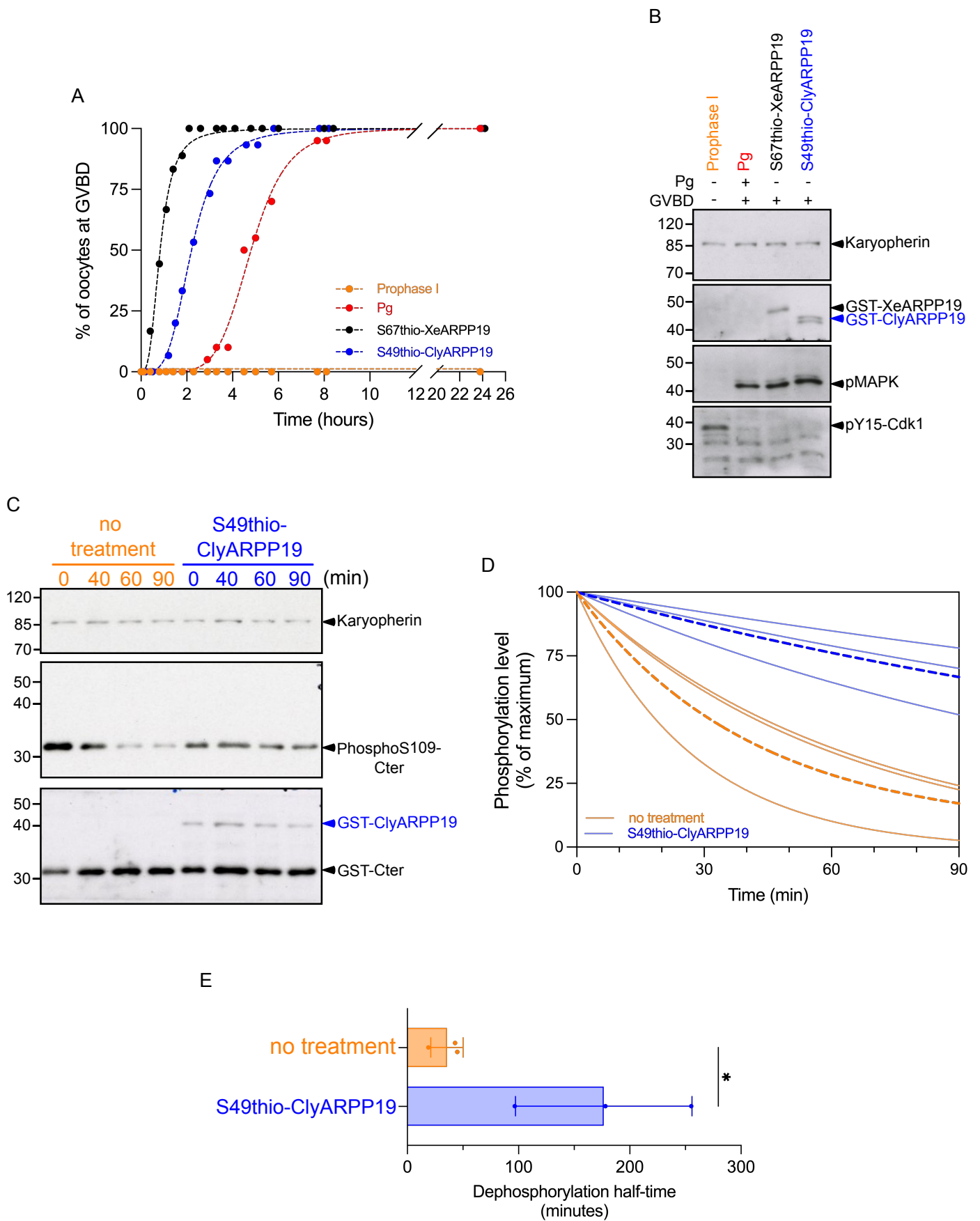


Figure 3

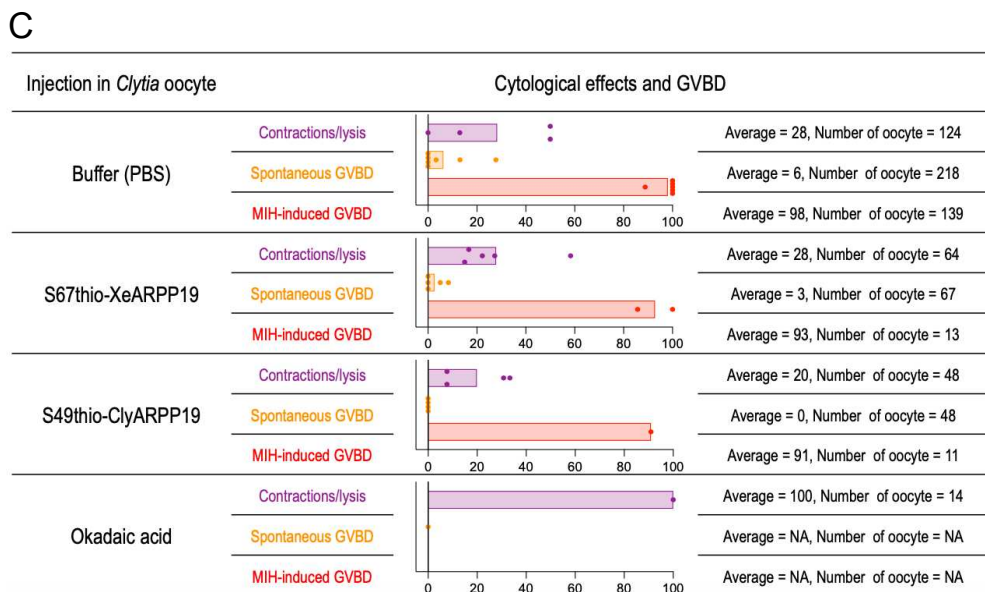
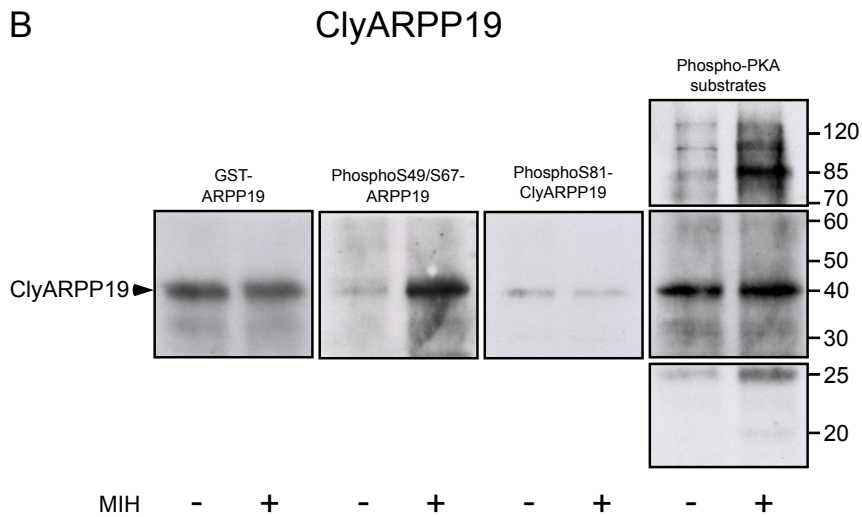
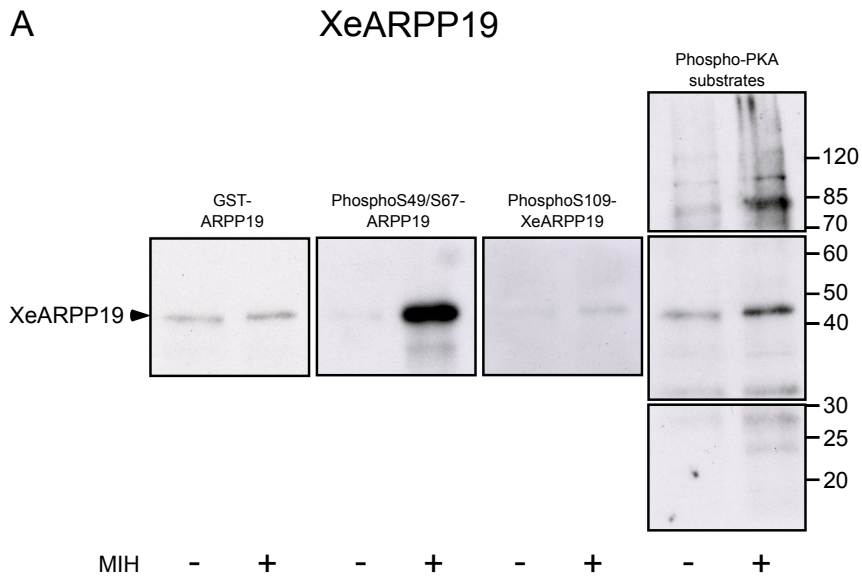


Figure 4

A

	Proteins	PKA sites
Wild-type	ClyARPP19	_RKISS_
PKA site mutants	S81D-ClyARPP19	_RKIDS_
	S82D-ClyARPP19	_RKISD_
	S81D-S82D-ClyARPP19	_RKIDD_

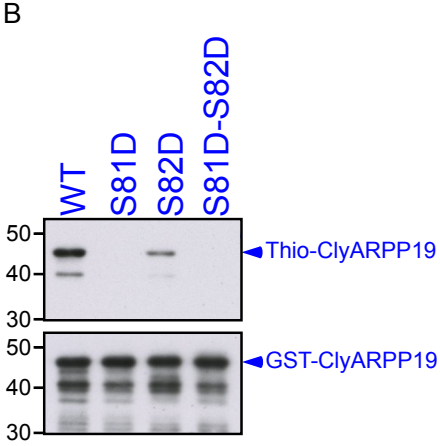


Figure 5

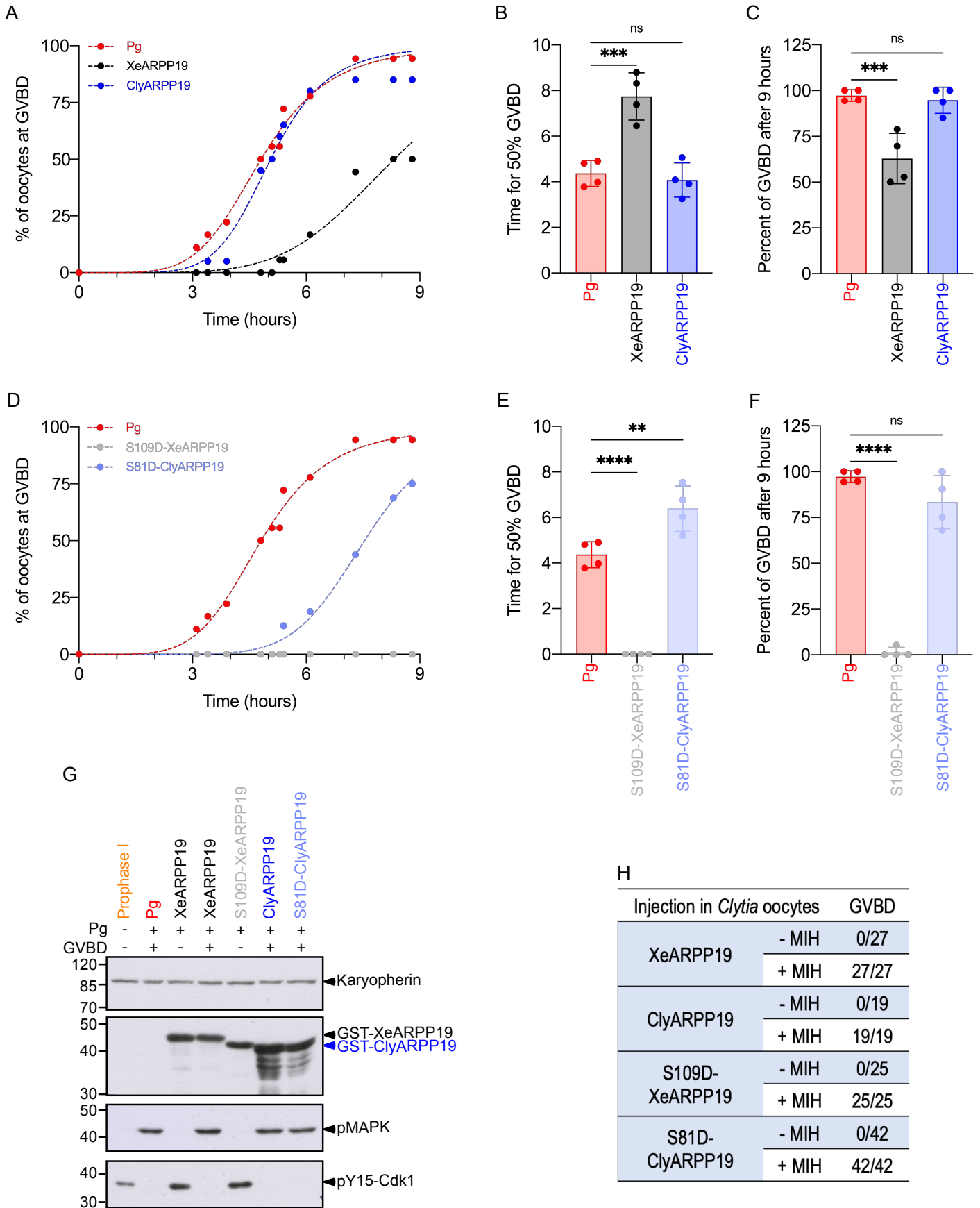


Figure 6

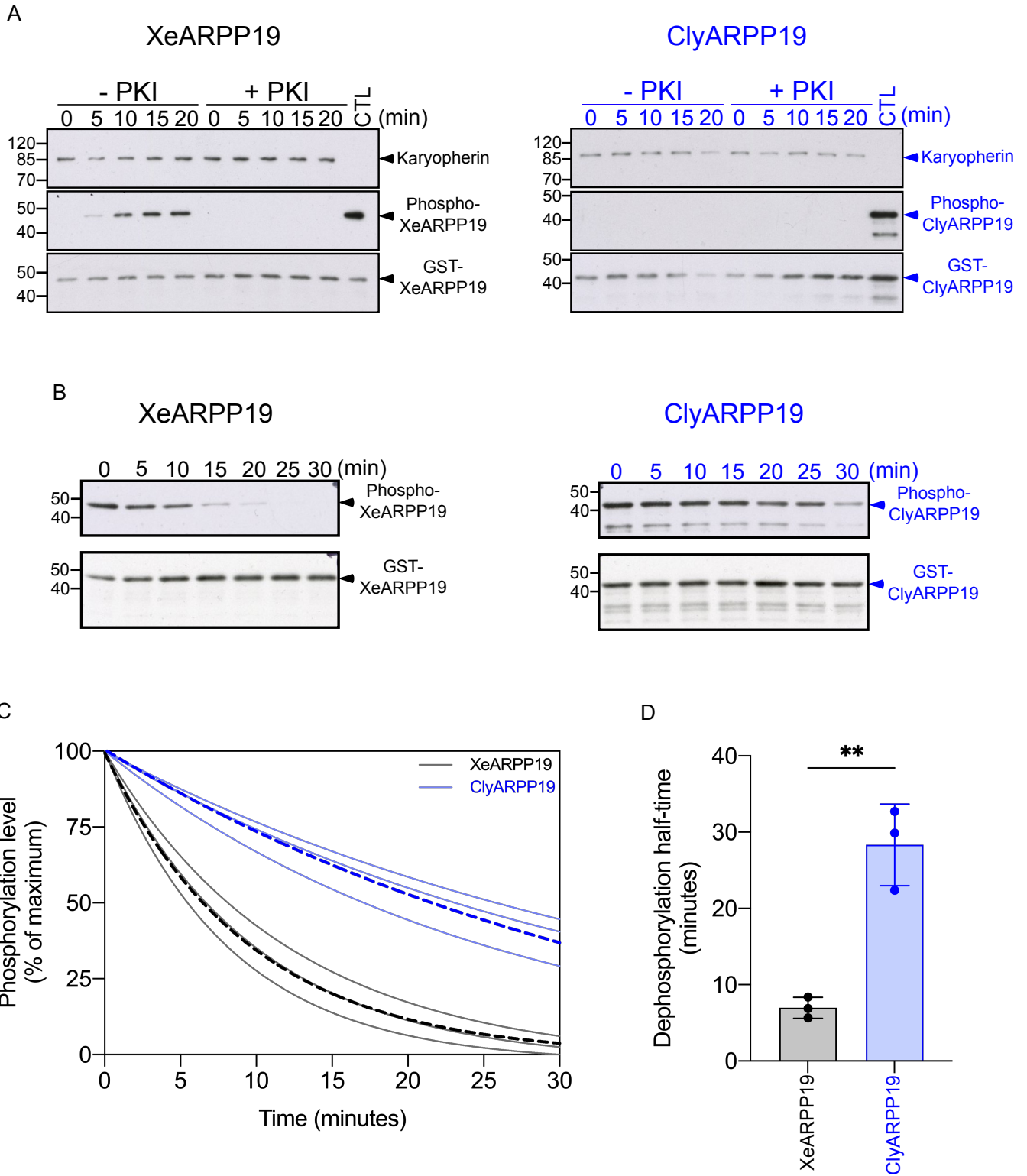
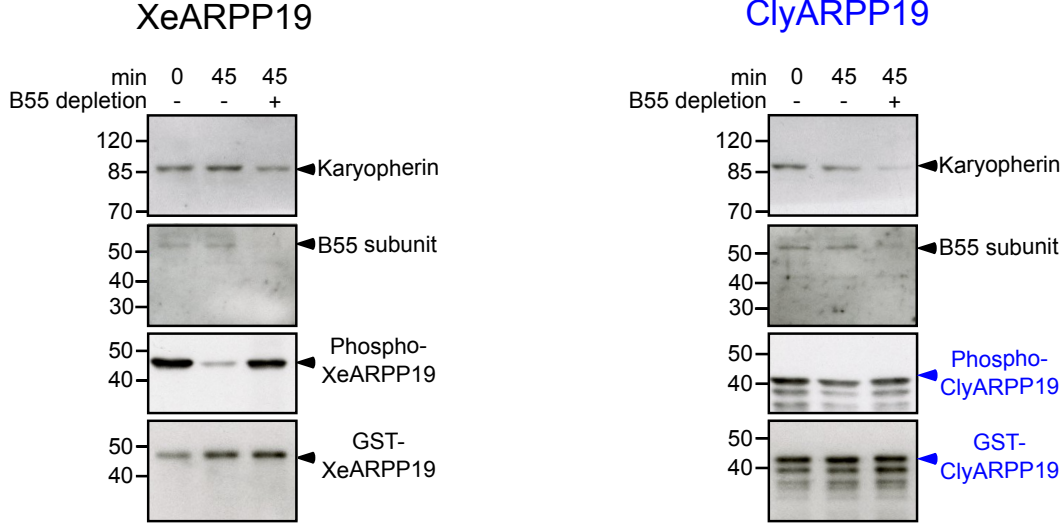


Figure 7

A



B

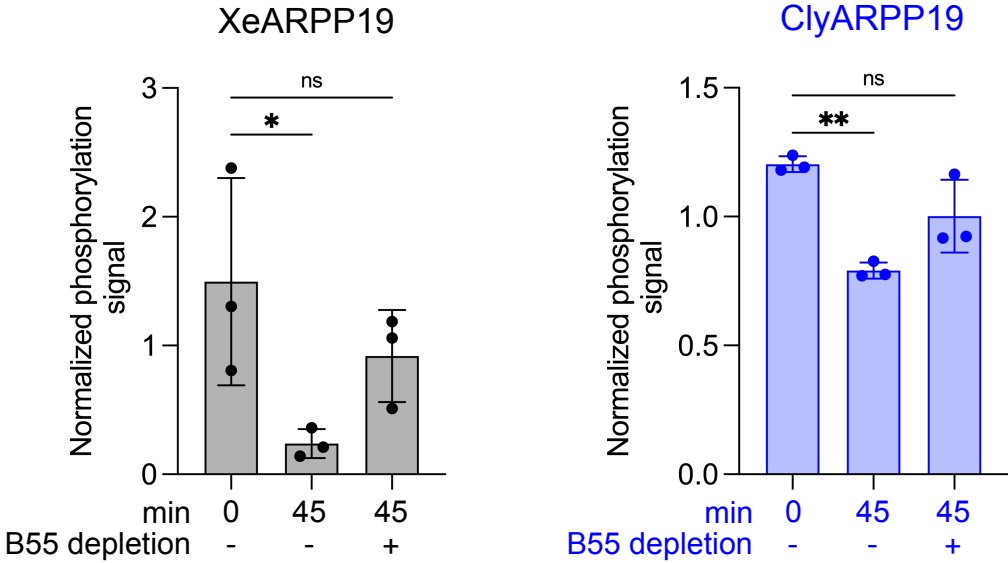


Figure 8

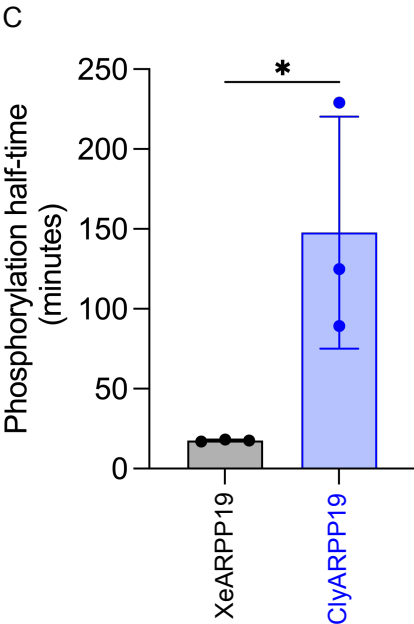
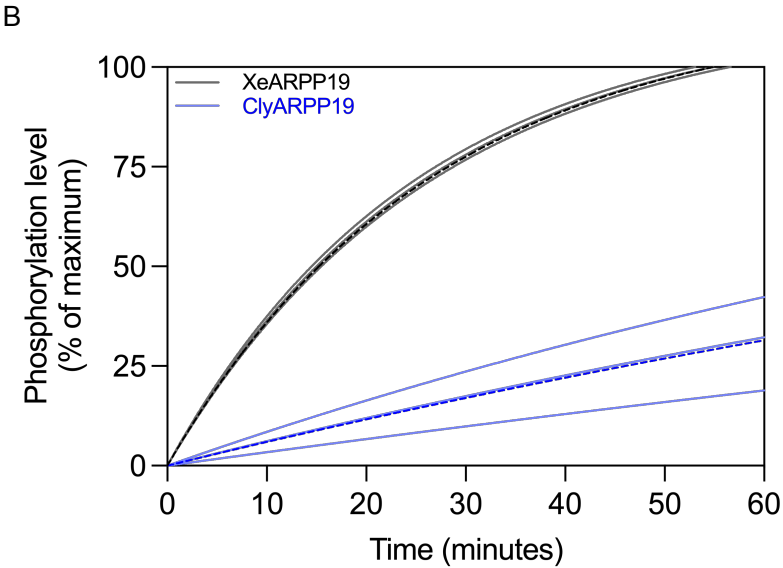
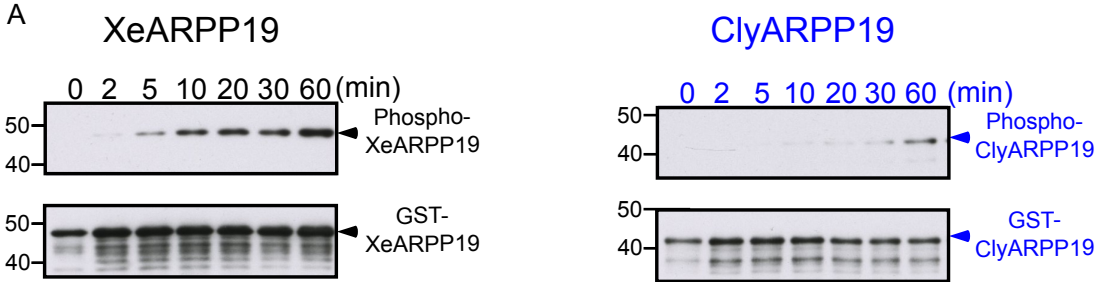


Figure 9

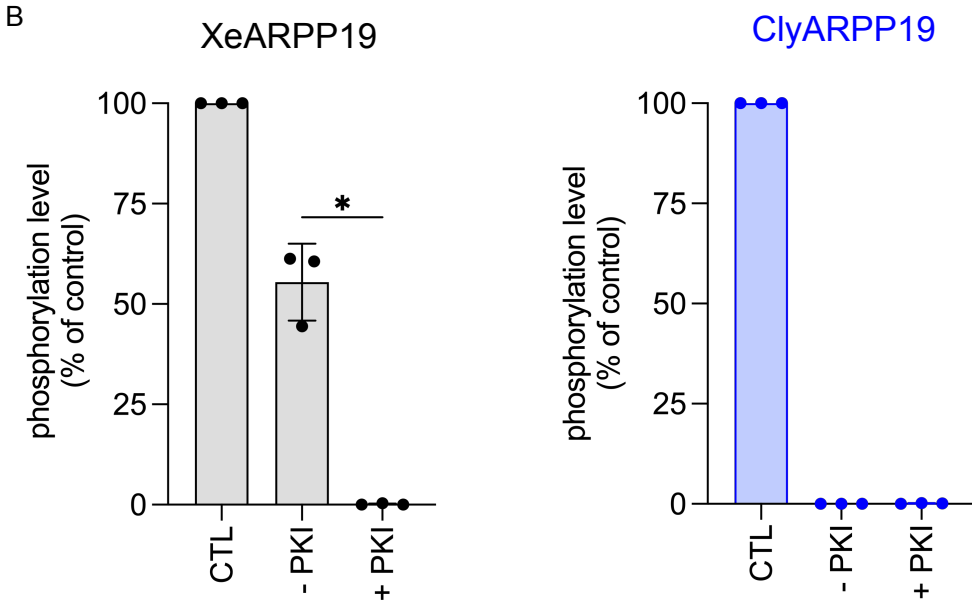
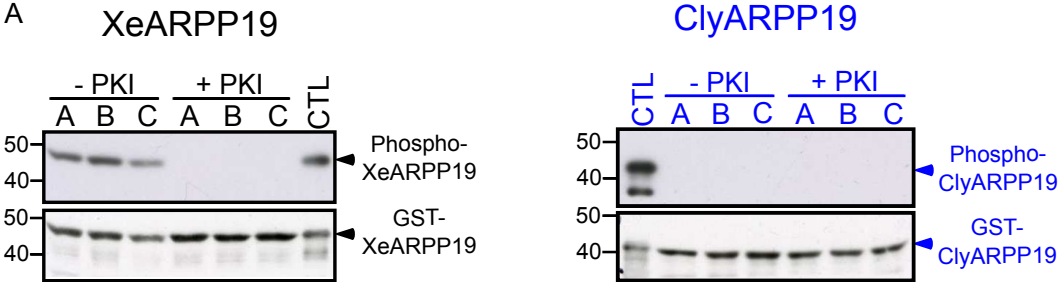


Figure 10

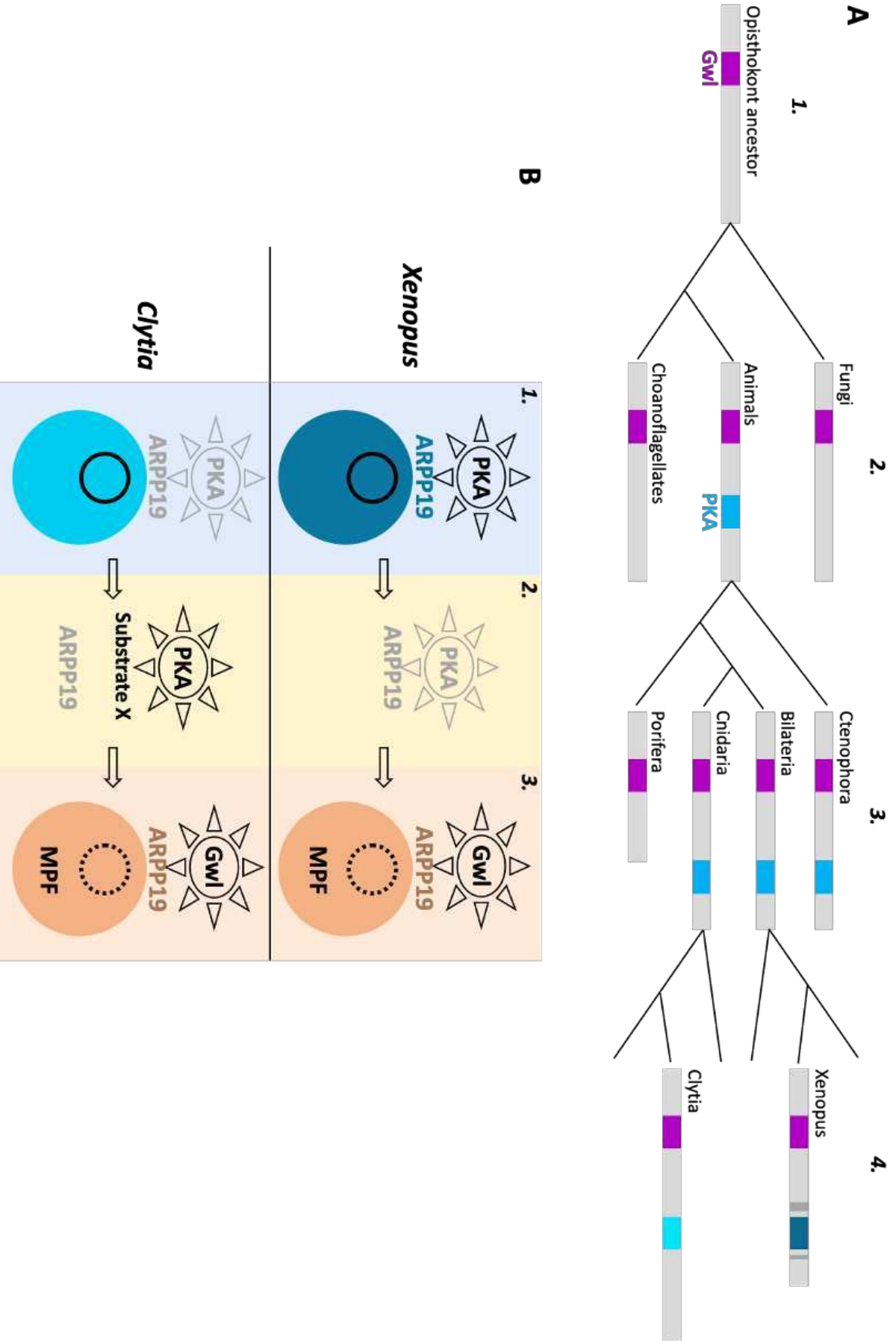


Figure S1. ARPP19/ENSA protein sequences used in the study and their accession identifiers

A. Sequences used for the alignments in Figure 1

<i>Amphimedon queenslandica</i>	XP_003389546.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564967.1
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001392163.1
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	CAH1254632.1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_492609.1
<i>Capitella teleta</i>	ELT98737.1
<i>Ciona intestinalis</i>	XP_002129373.1
<i>Choanoeca perplexa</i>	GGOP01002813.1 (TSA translation)
<i>Clytia hemisphaerica</i>	XLOC_041555 from <i>Clytia</i> genome assembly GCA_902728285.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001246745.1
<i>Homo sapiens</i> (ARPP19)	KAI4057880.1
<i>Hydra vulgaris</i>	XP_047140150.1
<i>Lottia gigantea</i>	XP_009048785.1
<i>Nematostella vectensis</i>	XP_032227676.1
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	ML210012a (from https://research.nhgri.nih.gov/mnemiopsis/)
<i>Patiria miniata</i>	XP_038072705.1
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_002732849.1
<i>Sphaeroforma arctica</i>	EC804984.1 (TSA translation)
<i>Xenopus laevis</i> (ARPP19)	NP_001086634.1

B. Additional sequences used for alignments used in Supp Fig. S2

<i>Acropora digitifera</i>	XP_015773650.1
<i>Actinia tenebrosa</i>	XP_031564726.1
<i>Amphiprion ocellaris</i>	XP_023139216.1
<i>Aplysina aerophoba</i>	HANI01464700.1 (TSA translation)
<i>Asterias rubens</i>	XP_033633809.1
<i>Aurelia aurita</i>	GHAG01094477.1 (TSA translation)
<i>Bufo bufo</i>	XP_040269877.1
<i>Beroe forskalii</i>	GHXY01160637.1 (TSA translation)
<i>Byssothecium circinans</i>	KAF1955593.1
<i>Cassiopea andromeda</i>	GJJJ01041283.1 (TSA translation)
<i>Danio rerio</i>	Q7ZUT5
<i>Dendronephthya gigantean</i>	XP_028399175.1
<i>Dynamena pumila</i>	GHMC01017442.1 (TSA translation)
<i>Ephydatia muelleri</i>	AM760832.1 (cDNA translation)
<i>Exaiptasia diaphana</i>	XP_020907908.1
<i>Haplosporangium sp. Z 27</i>	KAF9202459.1
<i>Hartaetosiga balthica</i>	GGOO01015587.1 (TSA translation)
<i>Hormiphora californensis</i>	GGLO01016586.1 (TSA translation)
<i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	GAWH01050646.1 (TSA translation)
<i>Hymeraphia stellifera</i>	GKDX01076453.1 (TSA translation)
<i>Limulus polyphemus</i>	XP_013774917.1
<i>Lupinus albus</i>	KAE9595631.1
<i>Lytechinus variegatus</i>	XP_041465673
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI17929.1
<i>Paracentrotus lividus</i>	27929.1
<i>Podila clonocystis</i>	KAG0011881.1
<i>Podocoryna carnea</i>	GCHV01001733.1 (TSA translation)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	KXG51649.1
<i>Physalia physalis</i>	GHBB01030377.1 (TSA translation)
<i>Quercus robur</i>	XP_050277191.1
<i>Rana temporaria</i>	XP_040198643.1

<i>Rhopilema esculentum</i>	GEMS01057539.1 (TSA translation)
<i>Salpingoeca rosetta</i>	XP_004988287
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KZV10868.1
<i>Salmo salar</i>	ACN10327.1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593267.1
<i>Stylophora pistillata</i>	PFX34499.1
<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003969615.1
<i>Veleva veleva</i>	GHAZ01100014.1 (TSA translation)

C. *Clytia hemisphaerica* ARPP19 sequences

gene identifier XLOC_041555 from genome assembly GCA_902728285.1¹

Nucleotide sequence of transcript

GTTTTGTTTCAGGAAGCGCTCGCACTCGCAGGCAAGAAGATTCAACCAAGGCCAAGGTTAAAGCCAAGAGTGAGGA
 AATCAAAGAAAATCAACATCATTTTAAATTTAAATCGAGAAGAAAAGCAACACAAGGGTATCGAAGACGATGATTT
 AGATTGAGAATTTAACCTTACAAATTCATAAGGAGCGTTTGTACTCAACGTTGAATCAACAAAACAACTTTGTC
 TCGTCTGAGAAGCTGTCAAGCAAAAAGAAGTTTTTAAAGCATATTGTTGTTTTCTCTTGACTATTATCACCCAAA
 TGCTTACAATGGCAACATTTAAAGGCCCAACAAGAGTTGCCAGAAGCAGAACGCTTCAAACAGAAGTTCCCACAAG
 GAGCACC AAGG CAGTCTGATTTTCTAAGAAAACGCTTACAAGGCAAAGGAGGGGCAAAGTATTTTGATTCTGGGG
 ATTACAACATGGCCAAGAGCACTCATGGTAGGAATGTTCCAAC TGGGAAAGCCATTCCAACGCCTGAAAATTTAC
 CTCAAAGGAAAATCTCTTCTACTAAACAGAGTAACCTGATAGAAGGCGGCACGAGTCCCCCGCAGAGCGCTCTAC
 CAGAGGAAAAAGCTGTGACTGAAGGTGAGCAGCATAAATCAAAACAACATATCACTGAACAAGAATAATGTTTTAT
 ATATACCCCAATTAATATTTTTAGCCAGAAAAGTTGTAGTCACTTGACTTGAATTTATTAAGTTTATTAGGAAT
 GGATCCATTTTTATTTTGTCCATTTCTCACATTAACACTGTACATAGCTCATATCTGTAGATAGGAATTAGATC
 TTCATTGGGTCAAGCTTCTGAATTCCTTTCTGAAGCTTCTTTTGGACCTATGATTGGGCTATAGTTTTATCTACT
 TTTTAAAGACTTTTCCCTAATACCCCAACCGTCAATATTTTGTATTTAAGGGTTTCTTTCCCTACGATCTTA
 TCTCTGTTGATATGAAACCTTTTTTACACAATCGTCAGCAATTTAATCTACCTTGATATACCAAATCCTTGCCCC
 TTCCCCCTCCCCCTCAGGTTCTATATTATGCCACAGCAGTATAAATGAACTCTGGCTATGCCCATGGTTGCTGT
 AGACTACACCTGTTATCTTCGTTTTATGTAGTAAC TTTTTGTTTATGTTTTATTTTTTGGTAAAACCGAAAA

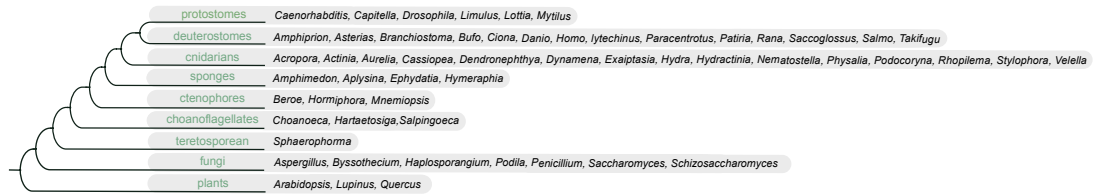
Predicted protein sequence

MSTMATFKGPQELPEAERFKQKFPQGAPRQSDFLRKR LQGKGGAKYFDSGDYNMAKSTHGRNVPTGKAIPTPENL
 PQRKISSTKQSNLIEGGTSPQ SALPEEKAVTEGEQHKSKQHITEQE

1. Leclere L, *et al.* The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle. *Nature ecology & evolution* **3**, 801-810 (2019).

Figure S2. Alignments of ARPP19 protein sequences from various eukaryotic species.

A. Relationships between the main eukaryotic clades



Phylogenetic tree indicating relationships between the main eukaryotic clades to which the species in B to H belong, adapted from¹. All accession numbers are provided in Supp Fig. S1.

¹Grau-Bove X, Torruella G, Donachie S, Suga H, Leonard G, Richards TA, Ruiz-Trillo I (2017) Dynamics of genomic innovation in the unicellular ancestry of animals. *eLife* 6

B. Alignment of an extended selection of ARPP19 protein sequences

Caenorhabditis	-----MRGEAGELA-----VS
Drosophila	MSS-----AEENSN-----SPAT-----TPQDT
Capitella	MSQE-----EQRIASAGSKASDEGSEKVDTS--EKDGEFK
Mytilus	MSSE-----GTIDRKEPEFVAPE-----
Lottia	-----MSMASETGNDVPTGDA
Limulus	MSS-----EEYSE-----SP----IKVEKCE
Saccoglossus	-----
Patiria	MSDNSVKAQKPKQATEQEPKPEAQ-VTAEETTQEPVIEDKPTPLPLGGKENQQAASF
Branchiostoma	-----MAT----DTARPPS
Ciona	-----MSVSPDVVPTMEPVNK
Takifugu	MSG-----DNEDP-----AEEESPVD
Xenopus	MSG-----ENQET-----KAQ----EESALE
Homo	MSA-----EVPEAASAEQKSEHNMLPWSL----QPSIPNS
Aurelia	-----MSAP
Clytia	-----
Hydra	-----
Dendronephthya	-----MADTSIP
Nematostella	-----M
Stylophora	-----M
Amphimedon	MANKEE-----A-----TVP-----EVKE
Ephydatia	MTTEGT-----ETTLVTEPEENT-----HQDKPIEPV-----TVSAE
Aplysina	MSAEK-----NPPA-----TEE
Hymeraphia	MSDEEK-----PRA-----EQEERE-----KANGASLPA-----TKD
Mnemiopsis	MASC-----QE----DQ-IP-----SNTAGSDVNASNTSNEVIS--EVASDSVVP
Beroe	MASC-----QE----DN-VH-----SEPSPPVIENIPQEQSEVTV--VEAEDVPCV
Choanoeca	-----
Hartaetosiga	-----
Sphaeroforma	-----
S.cerevisiae IGO2	-----MSEDLSPT-----SSRVDL-----SNPH
Aspergillus	-----MNP-
Arabidopsis	-----MEDVKGKEIIDD-----
Lupinus	MSDTNVEDVKKQESLHDPDKDDVGS----DNNSEDDK-----KDLN
Quercus	MSGANNEDIKEQELTDN-TLNNQVDG----D-SSVDD-----LNKA
Caenorhabditis	SGEIATGALSPEKQEQELMGKLAATGKLPARPASSFLQKQLQ-----QRKFFDSGDYAM
Drosophila	ETTEQANLTDLEKIEEEKLKSYPSPG-MRVPGGHSAFLQKRLQ---KGQKFFDSGDYQM
Capitella	---VPLSKVDIEREQENKLRKARYPGV---KSGGGSALLQKRIA---KPQKFFDSGDYAM
Mytilus	--PTTMTIKEKMMEEAKLKAKYPNV---KPGGSGLLAKRLQ---RGQKYFDSGDYNM
Lottia	DVPKQPQPTVEQNEEARLRKSKYPNL---KGGSAI LQKRLI---NKGKYFDSGDYNM
Limulus	ENEKKEELRKALEEEAKLRKYPQA---MRPGGS AFLQKRLH---KGQKYFDSGDYNM
Saccoglossus	MSIETSQKSQLEQMEAAKLKSKYPGM---QRPGGSDFLRKRQLQ---KGPKYFDSGDYNM
Patiria	KPLDVKPKLSPEKMEAAKLSAKYVKL---KPGGSDFLRKRRLN---KGVKYFDSGDYQM
Branchiostoma	MESGEAKELTPEQAEAAKLKAKYPALGHQQRPGGSDFLRKRQLQ---KGPKYFDSGDYNM
Ciona	PYTETVPSISVEQQEQEILKAKYGNL---AKKGGSSLLQKRLAQ---KGNKYFDSGDYNM
Takifugu	EKEIQDKVISPEKAAEAAKLKARYPNLG---NKPGGSDLLRKRQLQ---KGQKYFDSGDYNM
Xenopus	QKEIDDKVVSPEKSEI KLRKARYPNLG---PKPGGSDFLRKRQLQ---KGQKYFDSGDYNM
Homo	LEEMEDKVTSPKAAEAAKLKARYPHLG---QKPGGSDFLRKRQLQ---KGQKYFDSGDYNM
Aurelia	NAGLPPHLKAAELSEDQYKKNKFPKG---KAPANTDFLRKRQLQ---KGVKYFDSGDYNM
Clytia	MSTMATFKGPQELPEAERFKQKFP-Q---GAPRQSDFLRKRQLQ---KGGAKYFDSGDYNM
Hydra	--MEATLKI QPDSSEADHFNKFPKG---GAPKQTDFLRKRQLQ---KSGGKYFDSGDYNV
Dendronephthya	TVENPVEEKPKELSEEQKLKAKYPG---GLKKNFAQSRLQNR---GGVKYFDSGDYNM
Nematostella	SAE-EPATNATELSEEEKFKRKFPN---KPMTTDVMRKRQLQ---KGVKYFDSGDYNM

Stylophora SEETGLEEKPSSELTEEQKLALKFPG---KQPATDILKRMQ---RGVKY...YAM
Amphimedon PSSEEDTDIDPKKSEQELMSRYPKH---LQPKQKSVARQKISS---GGVQY...YNA
Ephydatia PGKATLDP-----QQADPKYGGI---VKKAPFAQRKISE---GGRQY...YQT
Aplysina DSSTEPDPSSDIKAEAEYMAKFGKN---QKSNFAQRKMM---EGKRY...YHST
Hymenophora --AGHLDPKSADAVAQAEYQKQYGFV---KKPPAFAQRKISS---GGRQY...YNYM
Mnemiopsis NAPANAPLAQAIQEEKKAAMKYGN---MKKQSDVMRKRMMG---GGKQY...YDGYNV
Beroe KNSVPTPLAKAIADDEQKAAAKYGN---MKKQSDVMRKRMMG---GGKQY...YDGYNV
Choanoeca -----MADAGLTPEQIMFKKKYGR---PPKKVMKGPLRGGGERTFDSMDHAM
Hartaetosiga -----MDPQMQAQEAVLKAKFGGM---MGK---KKKGHLSQFKNKDRAYFDSADHAL
Sphaeroforma ---MADAPSNLSAQDQEFLLKFGRL---PPKNLAQKRMN---RGGERKYFDSGDYAL
S.cerevisiae IGO2 GFTKEGVDSLKSLSPQELKLYKMYGKL---PSKKDLRHKM---QDRQYFDSGDYAL
Aspergillus -HQQNKIDTSKMSPEQRLFRLYGKM---PTKKDLLQNK---KERYKFDSGDYAL
Arabidopsis -APIDNKVSDMESEENAIKKKYGGL---LPKKIPLISKD---HERAF...AWAL
Lupinus EHKNDGNPMPSSHQEEVKKKYGGL---IPKKPPLISKD---HERAY...AWAL
Quercus VDRNDENPMPSPQEEIVKKKYGGL---LPRKHPLISKD---HERAF...AWAL

Caenorhabditis DKSAGTGLGSKPHPLAGGPPAAPPVVAQRSAPAATTPSPSASPISQOTNRPSDRN
Drosophila AKQKGGGVK-----QVF-----AN
Capitella AKAKKQPVT-----VGVKLPYNA-----PA
Mytilus AKAKMNNPK---TPLAP-----TEKM-----IL
Lottia AKAKLNNPK---KPLNQ-----SEKF-----LI
Limulus AKAKSQKAR---VP-----AAP-----IV
Saccoglossus AKQTGQLLR---KPNNA-----GNGEKMPPPP-----AR
Patiria EQQSGKMKL---RPNSGKPMGLAGARVGGAMPAPL-----PR
Branchiostoma ALAKTKKVP---IR-----NGARL---QQP-----NP
Ciona ARAKVGGKQ---KI-----PIE-----VK
Takifugu AKAKIKNKQ---LP-----TAAP-----EK
Xenopus AKAKMKNKQ---LP-----TAAS-----DK
Homo AKAKMKNKQ---LP-----TAAP-----DK
Aurelia AKSTNRTGS-----
Clytia AKSTHGR-----
Hydra AKSTKKKDA-----
Dendronephthya AKTTGNKSR-----
Nematostella AKSRDNKPR-----GPN-----PA
Stylophora AKSEKKAGPAAA-----AIGNRG-----KL
Amphimedon AAHKKEKQKMLDLP-----
Ephydatia ATG-KDRTAIASHPHAMAPEALQAQVPPKPVAG-----KA
Aplysina AGSKSRKEVAVSRPHLPLMNQQAKRPSVTS-----
Hymenophora HASKKDRQEIASHPHVMNPHLAQLRAKAVISKSS-----PS
Mnemiopsis GKSRPTAQMM-----
Beroe GKQC---TPTV-----
Choanoeca SKAGISVD-----
Hartaetosiga STAGVKVD-----
Sphaeroforma SQAGKSQNK-----
S.cerevisiae IGO2 KKAGVKS-----DD
Aspergillus SKAGKASD-----VG
Arabidopsis GKQKGQKPKG-----PL
Lupinus GKQGAQKPKG-----PL
Quercus GKQGAQKPKG-----PL

Caenorhabditis SDDNLIQIPRPDTPV-QRKASI--I-NPSVHCKLSPAPHVQHDAASP NATSE
Drosophila KVTTEGAIPTPETVP-ARKTSI--I-QPCNKFPATS
Capitella LAPTGDEHPTPETVP-ARKASL--V-QNKLLTRLT
Mytilus QESIGDAIPTPESLP-PRKPSI--I-QSRLAEGELS
Lottia EESVGEAIPTPENLP-ARKASL---PSKLVNPLLEQAKQ
Limulus RESTGDAIPTPDVLP-TRKTSL--V-QSKLATELS
Saccoglossus VPLTCDSIPTPEDLP-QRKSSI--T-ASKLAAM
Patiria GPATGKIPTPASIP-HRKQST--E-ISKLAV
Branchiostoma KEVTGDTIPTEDNVP-ARKPSL--Q-TSKLVS--DQPOITKPEAVVGLKKGDDGAGEKKDEEK--
Ciona KEVTGDHMTPEDELVRRKAS---Q--SSLVI--PQLN
Takifugu ABEITGDHIPTPDLP-QRKPSL--V-ASKLAG
Xenopus TEVTGDHIPTPDLP-QRKPSL--V-ASKLAG
Homo TEVTGDHIPTPDLP-QRKPSL--V-ASKLAG
Aurelia NPLLKAIPTTEGVT-QRKHST--ASKKLVVDG---AEKSPSPNDEKAFFEKMDKKNNAEIEEKQ
Clytia NVPTKAIPTPENL-QRKISS--TKQNLIEG--GTSPPQSALPEEKAVTEGQHKSKQHITQE
Hydra TIITKAIPTTEVI-HRKPS--S-QNMLGV-----PDHLEKKVEVENEAKNAE
Dendronephthya LPLGAAIPKPEDIP-HRKQSV---PSKLAASP-TSVSVQD
Nematostella VLAVGKGIPTEDKIP-HRKTSV---PMTEHPV-TQVTPHPQPHHTNVEVN
Stylophora PMGVCKAIPTEDNIP-HRKTSV---PSKLVGEG-QEPPVAVTR
Amphimedon ---GRPAINEAMAR-----LQGRPPKLTAFKSGLASVAREQ
Ephydatia MAERGFVPTERRAPA-----ERGVKLAASPKRVSVPSPLAQ
Aplysina KLVD
Hymenophora KLASGSP-----PSKLAAS---PRQSPPLAQ
Mnemiopsis PQAINPEQPAEKLK-RRKASIPNKTFSRQGS
Beroe PQTISPEQPAEKLK-RRKASIPNKHLTRIS
Choanoeca ---NKVIVNENIS-AK---PHAKPGLMGTGKGVVDEDAAPADESAAAPATDTPA-AEPEEKPAQ
Hartaetosiga -RTPNIIATPENI-KK---THAKPELVDTKEA---LAEDE
Sphaeroforma ---VORALPTPETIP-HHSDNVQPKQSEHSEKSGSLTNPDK-----PSDSEKKA
S.cerevisiae IGO2 VIVNNSNLEVTNIE-SGLRESIIRRMSSSSGGDSISRQGS-----ISSGP-----PPRSPNK
Aspergillus VTNIE-SOHVVENIE-HLTATSPGANNPAAASNGGSSISAQGGQIPGSSISGHPGSGIFQSRSPVK-
Arabidopsis EALRPKLOPTPQQQPRARMAYSSGETEDTEIDNNE-APDDQACASAVDSTNLKDDGGAKDNIS
Lupinus EALRPKLOPTPQQHARSRSAYAPADDS-EVDGCNNHASSEDSAAEDVANDTAQDQSSHQ

Quercus EALRPKLQ **T** **H** **Q** **V** **R** **S** **A** **Y** **A** **P** **A** **D** **E** **G** **G** **V** **D** **G** **S** **N** **N** **H** **S** **I** **S** **S** **E** **D** **Q** **S** **C** **M** **L** **D** **A** **G** **E** **H** **N** **D** **T** **S** **D** **G** **D** **H** **N** **D** **K** **T** **G** **S** **N** **D** **Q** **K** **C** **H** **E**

Branchiostoma PEEQSTENQENQEH

Aspergillus EASYLQRETSADETEAEAKKEDDSVSPPPARGGVPIRQ

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta. Text colours indicate species belonging to different taxa as following: Red=Deuterostomes; Black=Protostomes; Dark blue=Anthozoan cnidarians; Light blue=Medusazoans; Purple=Sponges; Red=Ctenophores; Orange=Choanoflagellates. Pale orange=Teretosporeans; Grey=Fungi; Green=Plants.

C. Alignment of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 protein sequences with those from a selection of other deuterostomes

Clytia	MST-----	3
Xenopus	MSGENQET-----K-----AQEES--	14
Lytechinus	MS-SAEETQSTPAEAPGTEVQAPAE-ESMDTTPAAPAADTTESAPSQTTPPPETTPSQPV	61
Paracentrotus	METPAETTQTTPAEATAAEVEAPAQEEESMDTTPAPAP-----APTTPESPVVNVAQPV	56
Asterias	MSE--DTVKTDSPTVPE-----SEPEVAMETTQAESATVEEKSSPLPSVE-DEDKPTPLPT	54
Patiria	MSDNSVKAQKPEATEQEKPPEAQVTAEEETTQEPEVIEDKPTPLPLGG-----KENQQA--	55
Saccoglossus	M-SIETS-----	6
Branchiostoma	M-ATDTA-----	6
Ciona	MSVSP-----D	6
Takifugu	MSG----DNEDP-----QPAAE--	13
Salmo	MSEEIEG-----TRPAT--	12
Danio	MS-----SEVET--	7
Amphiprion	MSEEVEG-----TR--	9
Bufo	MSADNQET-----K-----AHEEN--	14
Rana	MSAENLES-----K-----TPEEA--	14
Homo	MSAEVPEAAS-----AE-EQKSEH-----NMLPW-----SLQPS--	28
Clytia	-----MATFKGPO-ELPEAERFKQKFP-QG---AP	28
Xenopus	-----SA-----LEQ-KEIDDK-VVSEKSEEEKLKARYPNLG--PKP	48
Lytechinus	MTESNQNI PKTDTGKFFIRPAQVPIKPPVKTITDRPSKQSEIQMEEAKLKAKFGGLS---KP	120
Paracentrotus	MTESNQNI PKSDSGKFIRPANPLIKPPVKTIQ-DRPSKQSEIQMEEAKLKAKFGGLS---KP	114
Asterias	VTEDVKPAPLPTATLTATEKP-----PFKK-PMDIKKQLSPEKAEAKLNAYKGV---KP	107
Patiria	-----AS-----FKK-PLDVK-PQLSPEKMEEAKLSAKYGKL---KP	87
Saccoglossus	-----KQSLEQMEEAKLSKYPGM---QRP	29
Branchiostoma	-----RP-----PSM-ESGEA-KELTPEQAEAKLKAKYPALGHQQR	42
Ciona	-----VVP-TMEPVNKP-YTETV-PSISVEQQEQILKAKYGNL---AKK	45
Takifugu	-----SP-----VDE-KEIQD-KVISPEKAEAKLKARYPNLG--NKP	47
Salmo	-----GE-----ATR-EEMDD-TVLSPEKAEVVKLRFPHLG--AKP	46
Danio	-----ST-----EEQ-QEMQD-TVVSEKAEIEIKLKARYPHLG--ARP	41
Amphiprion	-----TL-----DEQ-QEMED-KVISPEKAEAKLKARYPNLA--PKH	43
Bufo	-----SS-----DEQ-KEMED-KVISPEKAEAKLKARYPHLG--PKP	48
Rana	-----TT-----DEQ-KEVDD-KVVSPEKAEAKLKARYPHLG--PKP	48
Homo	-----IP-----NSL-EEMED-KVTSPEKAEAKLKARYPHLG--QKP	62
Clytia	-RQSDFLRKRLQKGGAKY FDSGDY NMAKSTHGR-----N	62
Xenopus	-GGSDFLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKMKNK-QLP-----TAAADKT	90
Lytechinus	-GGSQFLQKRLN-KG-MKY FDSGDY NMAKQSGKLG-RRP-----LSGKPG-GIP--SA--P	168
Paracentrotus	-GGSQFLQKRLN-KGQMKY FDSGDY NMAKQSGKLG-MRP-----LSGKPG-GIA--PVPVP	165
Asterias	-GGSDFLRKRLN-KGV-KY FDSGDY NMEQSGKLR-NR---GKPPGLAGPPG-VRLPVQSLG	162
Patiria	-GGSDFLRKRLN-KGV-KY FDSGDY QMEQSGKMK-LRPNSGKPMGLAGARVGGAMPAPLRG	146
Saccoglossus	-GGSDFLRKRLQ-KGP-KY FDSGDY NMAKQTGQLL-RKPNN-----GNGEKMPPPARV	80
Branchiostoma	-GGSDFLRKRLQ-KGP-KY FDSGDY NMAKAKTKKV-PIRG-----NGAR-LQQPNPK	89
Ciona	-GGSDLLQKRLAQKGGNKY FDSGDY NMAKAVGGK-QKI-----PIEVKK	88
Takifugu	-GGSDLLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKIKNK-QLP-----TAAPEKA	89
Salmo	-GGSDLLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKVKNKQQLP-----AVTPAEKA	90
Danio	-GGSDLLRKRLQ-KGQQKY FDSGDY NMAKAKMKNK-QLP-----AAAAEKT	84
Amphiprion	-GGSDFLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKMKNK-QLP-----SAPTEKT	85
Bufo	-GGSDFLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKIKNK-QLP-----AAPDKT	90
Rana	-GGSDFLRKRLT-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKMKNK-QLP-----TTAADKA	91
Homo	-GGSDFLRKRLQ-KGQ-KY FDSGDY NMAKAKMKNK-QLP-----TAAADKT	104
Clytia	VPTGKAIP T P E N L P Q R K I S S T K S N L I E G G - T S P P Q S A L P ----- E E K A V T E	108
Xenopus	EVTGDH I P T P D L L P Q R K P S L - V A S K L A G	117
Lytechinus	KPTGEA I P T P D S I H H - R K Q S - E I S K L A V	195
Paracentrotus	KPTGEA I P T P D S I H H - R K Q S - E I S K L A V	192
Asterias	QATGKT I P T P A S I H H - R K Q S - E I S K L A V	189

Patiria	PATGKTIPTFASIFH-RKQST-EISKLAIV	173
Saccoglossus	PLTGDSIPTEDLQ-RHSSI-TAKKLAAM	108
Branchiostoma	EVTGDTIPTDNVFA-RKPSL-QTKLAS-----DQPQITKPEAVVGLKKGDGAGEKKDEEK	146
Ciona	EVTGDHMTDELFRVRFAS---QSSVI-----PQLN	118
Takifugu	EITGDHIPTQDLQ-RKPSL-VASKLAG	116
Salmo	EITGDHIPTQDLQ-RKPSI-MASKLAG	117
Danio	EITGDHIPTQDLQ-RKQSL-EASKLAF	111
Amphiprion	EITGDHIPTQDLQ-RKTSI-VASKLAG	112
Bufo	EVTGDHIPTQDLQ-RKPSL-VASKLAG	117
Rana	EVTGDHIPTQDLQ-RKPSL-VASKLAG	118
Homo	EVTGDHIPTQDLQ-RKPSL-VASKLAG	131
Clytia	GEQHKSKQHITEQE	122
Branchiostoma	PEEQSTENQENQEHS	105

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta. Text colours indicate species belonging to different taxa as following: Dark blue=Fish; Light blue=Tunicates; Purple=Echinoderms; Orange=Hemichordate. Grey=Cephalochordate; Green=Amphibians; Red=Mammals.

D. Alignment of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 protein sequences with those from a selection of other cnidarians

Clytia	MST-----MATFKGPQ-ELPEAERFKQKFP-QG-AP-RQSDFLRKRRLQGK	41
Xenopus	MSGENQETKAQEESSALEQKEIDDK-VVSPEKSEEIKLKARYPNLGPKP-GGSDFLRKRRLQ-K	60
Physalia	ME-----SGLKEMSETE-RFKAKYGAHE-AP-RQSAFLRKRRLQG-	37
Velevella	MEA-----ETFVKVPHKVMNEAE-TFKKKFPGHG-AP-KQSDFLRKKLHGK	43
Hydra	MEA-----TLKIQP---DSSEADHFKNKFPKGK-AP-KQTDFLRKRRLQGK	40
Dynamena	MD-----TFKAPH---EMSEAELEFKKKFPGQG-VP-RQSDFLRKRRLQGK	39
Podocoryna	MA-----TFKAPH---EISEADRFKQKFPQG-VP-KQSDFLRKRRLQGK	39
Hydractinia	MA-----TFKAPQ---EISEADRFKQKFPHG-VP-KQSDFLRKRRLQGK	39
Aurelia	MSA-----PNAGLPPHLKAA-ELSEDQKYKKNKFPGK-AP-ANTDFLRKRRLQ-K	45
Cassiopea	MTEM-----N-APKPAIPPHKAS-ELSEEQKFRNKYP--GKKP-ASTDFLRKRRLQ-K	47
Rhopilema	MTEM-----N-APKLGIPPHLAAE-EVSEEQKFKNKYP--GKKP-ASTDFLRKRRLQ-K	47
Dendronephthya	MADT-----S-IPTVENPVEEKPK-ELSEEQKLLKAKY----KPGGLKNFAQSRLQNR	46
Acropora	MS-----DGNLEEKPA-ELSEDQKFKALKYP--GKKP-VATDILKRR-MQR	41
Stylophora	MS-----EETGLEEKPS-ELTTEEQLALKFP--GKKP-VATDILKRR-MQR	41
Nematostella	MSA-----EE-PATNAT-ELSEEEKFKRKF--NKKP-MTTDVMRKRRLQ-K	40
Exaiptasia	MA-----TES-EPKNLS-EMSEEEKFRAKFP--GRKP-TTDDVMRKRRLQ-K	40
Actinia	MSGEN-----EPMDKP-QLTEEEKFKAKFP--NRKP-NTDLMRKRRLQ-K	40
Clytia	GGAKYFDSGYNMAKSTHG--RN-----VPTKAIITENLQSSISTKQSN	87
Xenopus	GQ-KYFDSGYNMAKAKMKNKQLPTA-----ASDKTEVTGDHIPTQDLQQRKPSLV-ASK	114
Physalia	G-NKYFDSGYNNAKSNKRKDDPT-----MVIKAIITVDKLCQNPSSKLSN	94
Velevella	GGNKYFDSGYNMAKSTKKKDAT-----IVTKAIITTEALQCRPSPATKQSN	91
Hydra	GGGKYFDSGYNNAKSTKKKDAT-----IITKAIITTEVITPSTPSS-QSN	88
Dynamena	GGAKYFDSGYNMAKSK-TKNAN-----VVTKAIITTDTLQSSISTKQSN	86
Podocoryna	GGAKYFDSGYNNAKSTKKKDAT-----IVIKAITTDNLQCRPSPCKSQST	87
Hydractinia	GGAKYFDSGYNNAKSTKKKDAT-----IVIKAIITTDNLQCRPSPCKSQSS	87
Aurelia	G-VKYFDSGYNMAKSTNRTGSN-----PLLGKAIITTEGVTQRKHSSTASKSK	92
Cassiopea	G-VKYFDSGYNMAKSNRTGPN-----PLLGKAIITAEAVTQRKHSSTACKSK	94
Rhopilema	G-VKYFDSGYNMAKSTNRTGPN-----PLLGKAIITTEAVTQRKHSSTACKSK	94
Dendronephthya	GGVKYFDSGYNMAKTGNS-----RLPGLGAAIPKPEDIHRKQSV--SK	92
Acropora	G-VKYFDSGYNMAKSEKKGPA--A INRGKPMPCMLGVGKAIITDENIHRKTSV--TE	99
Stylophora	G-VKYFDSGYNMAKSEKKGPA--AAIGN--RGKLPMGVGAITDENIHRKTSV--K	97
Nematostella	G-VKYFDSGYNMAKSRDKNP-----RGP----VNPAVLAVGKGIITPDKIHRKTSV--MT	91
Exaiptasia	GGVKYFDSGYNMAKSSKKGPI--HR----PNLDVLGVGRIITPDKIHRKTSV--IK	94
Actinia	GGVKYFDSGYNMAKSTEKKGPI--KPR----PNVDVLGVGRIITPDKIHRKTSV--IQ	95
Clytia	IIEGGTSPQSALPEEKAVTEGE-----Q----HKSQKHITEQE	122
Xenopus	LAG	117
Physalia	IIEGDNPPPEKTNNSTEEVVKDEK-----ELPDEKNAKLDLADGK	124
Velevella	IIELSCEERDPNPAESSNDNSEVEK-----IEPD-EKCK--LAG-----N	126
Hydra	IIELVG----PDHTLEEKKVEVENE-----EAKNAE	113
Dynamena	IIELGTSPPPMNATAEERASVQEV-----ASSDEQKTKQLITESDTTNTSNTS	133
Podocoryna	IIELEGDAPHPHPSDEKETTAAEQ-----A----VMTE	115
Hydractinia	IIELEGDTPHPPHPSDEKETPTVDS-----E----QKSNQAVMD	120
Aurelia	IIEVDGAEKSPSP--NDEKAFFKMKDEKENNAEEEBKQSHQMWIQLNAAHSNISNNNV	146
Cassiopea	IIEADGEEHSP--SAVTEPVFFADAEGVQTDENQDQTESR	130
Rhopilema	IIEADGEEQLSPCCGDEKVFVENVEQKDAQTENEEKN	130
Dendronephthya	IIEASPTSVSVQD-----	103

Acropora	YHSRTRSDEFNLVMDQ-----	115
Stylophora	VEGQEQPPVAVTR-----	111
Nematostella	EHPVTQTVPTHQPHHTNVEVEN-----	115
Exaiptasia	EHEHQDTVH--HTHTPVEN-----	111
Actinia	EHGVQSSTH--PEHPHTS-----	111

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta. Text colours indicate species belonging to different taxa as following: Light blue=Hydrozoans; Green=Scyphozoans; Purple=Octocoralian; Dark blue=Hexacoraliens.

E. Alignment of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 protein sequences with those from a selection of sponges

<i>Clytia</i>	MST-----MATFKGPQ--ELPEAERFKQKFPQ	25
<i>Xenopus</i>	MSGENQET-----KAQEESALEQKEIDDK--VVSPEKSEEIKLKARYPN	43
Amphimedon	MANKEEA-----TVP-----EVKEPSSEEKDTIDPIKKESEQLMSRYPK	39
Ephydatia	MTTEGTETITLVTEPEENTHQDKPVIEPV---TVSAEPGKATLDP-----QQADPKY--	49
Aplysina	MSAEK-----NPPA-----TEEDSSTEPDPSSDIKAEAEYMAKF--	38
Hymenaphia	MSDEEKFPA---EQEERE--KANGASLPA-----TKD--AGHLDPKSADAVAQAEYQKKY--	48
<i>Clytia</i>	-G-APRQSDFL-RKRLQGGKAKYFDSSGYNMAKSTHGR-----	61
<i>Xenopus</i>	LGPKPGGSDFL-RKRLQ-K-GQKYFSSSYNMAKAKMKNKQ--LP-----	83
Amphimedon	H-LQPKQKSVAQRK-ISS-GGVQYFDSGDYNAAAHHKKEKQKMLDLP-----	82
Ephydatia	-GGLVKKAPFAQRK-ISE-GGRQYFDSGDYQTATG-KDRTAIASHPHAMAPEALQAAKVPKPK	108
Aplysina	-GKNQKKSNAQRKMMME--GKRYFDSGDHSTAGSKSRKEEVASRPHLPLMNQKAKRPSVT-	98
Hymenaphia	-GFVKKPPAFAQRK-ISQ-GGRQYFDSGDYNMHASKKDRQEIASHPHVMNPHLAQLRAKAVIS	109
<i>Clytia</i>	-----NVPTGKAIPTPENLQQRKISS--TKQSNLIEG--GTSPPQSALPEEKAVTEGEQHK	113
<i>Xenopus</i>	-TAADKTEVTGDHIEPTQDLQQRKPSL--V-ASKIAG	117
Amphimedon	-----GRPAINPAMAR-----LQGRPPSKLTAPKSGLASVARSEQ	117
Ephydatia	VAG--KAMAERGFPVPTRRAPA-----ERGVSKLASPSKRVSVPSPLAQ	150
Aplysina	-----SKLVD	103
Hymenaphia	KSS--PSKLAGSP-----PSKLAAS----PRQSPLAQ	136
<i>Clytia</i>	SKQHITQE 122	

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta.

F. Alignment of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 protein sequences with those from a selection of ctenophores

<i>Clytia</i>	MST-----MATFKGPQ--ELPEAERFKQKFP-	25
<i>Xenopus</i>	MSGENQET-----KAQ--EESALEQKEIDDK--VVSPEKSEEIKLKARYPN	43
Mnemiopsis	MASCQEDQIPSN TAGSDVNASNTSNEVISEVASDSVPVNA PANAPLAQAIQEEEEKKAAAMYGN	63
Beroe	MASCQEDNVHSEPSPPVIENIPQEQSEVTVAEADVPCVKNSVPTPLAKAIADDEQKAAKYGN	63
Hormiphora	MASCQDTV TADTPAESAVPVIAA-----EAVAPDSSAPSPDTLAKAIEEDQKKA VSR YGN	55
<i>Clytia</i>	QG-APRQSDFLRKRLQGGKAKYFDSSGYNMAKSTHG--RN-----VPTGKAIPTPENL	76
<i>Xenopus</i>	LGPKPGGSDFLRKRLQ-KG-QKYFSSSYNMAKAKMKNKQLPTAADKTEVTGDHIEPTQDL	104
Mnemiopsis	--MKKKQSDVMRKRMMG-GGKQYFDSGDYNVGKSRPTAQM-----PQAINPEQPAPKELR	116
Beroe	--MKKKQTDVMRKRMMG-GGKQYFDSGDYNVGKQC--TPTV-----PQTISPEQPAPKELR	114
Hormiphora	--IKKKQTDIMRTRMMG-GGKQYFDSGDHALGRNRPNAPT-----PSTLEPA--SVDILR	106
<i>Clytia</i>	QRKISS-TK-QSNLIEGGTSPQSALPEEKAVTEGEQHKSKQHITQE	122
<i>Xenopus</i>	QRKPSL--VASKIAG	117
Mnemiopsis	NRKASIPNKTFSTRQS	132
Beroe	NRKISIPNKHLTRLS	129
Hormiphora	NRKPSIPNKIVTRLS	121

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta.

G. Alignment of *Clytia* and *Xenopus* ARPP19 protein sequences with those from a selection of sequences from Choanoflagellates

<i>Clytia</i>	MST-----MATFKGPQ-ELPEAERFKQKFP-QG-APRQSDFLRKRRLQG--	40
<i>Xenopus</i>	MSGENQETKAQEESALEQKEIDDK-VVSEPEKSEEIKLKARYPNLGPKPGGSDFLRKRRLQ---	59
Choanoeca	MA-----DAGLTPAQIMFKKKYGRLLPK---KKVMKGPL-GRV	34
Hartaetosiga	MDP-----MQQAQEAVLKAKAFGGMMG-K---KK--KGHL-SQF	31
Salpingoeca	MDP-----TIQAQEE-KMRKFGRAPR-----PRKGPL-GKL	29
<i>Clytia</i>	--KGGAKYFDSDYNYMAKSTHG--RN-----VPTGKAIPTPENLFPQRKISSTKQSNIEG	91
<i>Xenopus</i>	--KG-QKYFDSDYNYMAKAKMKNKQLPTAASDKTEVTGDHIPTFDLFPQRKPSLVA-SKLAG	117
Choanoeca	GG-GERTFFDSADHAMSAGISVD-----NGKVIPTPENIS-AKPHAKP-SGMTKG	82
Hartaetosiga	KNK-DRAYFDSDHALSTAGVKVD-----RTPGNIATPENIP-KKTHAKP-SEIVDH	81
Salpingoeca	SGR-ERKYFDSDHALSAGVKT-----QTGKVIATAQNIPT-RTQSKP-TGMVDH	77
<i>Clytia</i>	GTSPQASALPEEKAVTEGEQHKSKQHITQE	122
Choanoeca	AVVDEDAPAADESAAAPATDTPAAEPEEKPAQ	114
Hartaetosiga	TKEA---LAEDE	90
Salpingoeca	TQEVIEITDGKSGDEQETTK	96

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta.

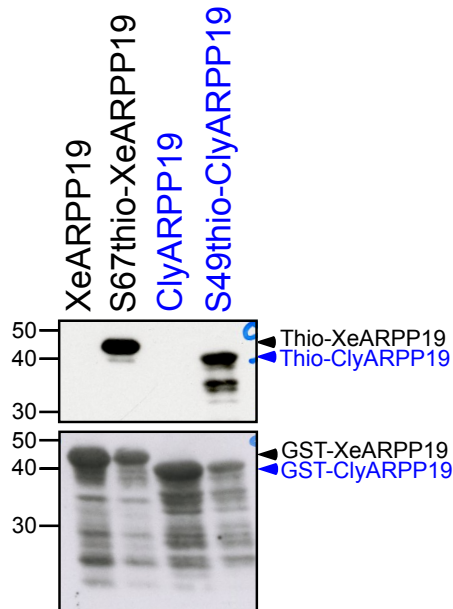
H. Fungi

<i>Clytia</i>	MST-----MATFKGPQ-ELPEAERFKQKFP-QG-A	27
<i>Xenopus</i>	MSGENQET-----KAQ--EESALEQKEIDDK-VVSEPEKSEEIKLKARYPNLGPK	47
Aspergillus	MNP-----HQQNKIDTSKMSPEQRLFRLYGKM---	28
<i>S. cerevisiae</i>	MSEDLSPSSRVLD-----SNPHGFTKEGVDLSKLSPEQLKLYKMYGKL---	44
Podila	MASPL-----SVA--TQPAFSPAQTLTEQEQKLRMYGKL---	33
Haplosporangium	MSSPLNPS-----HNSGGTA--TEHNFNPTPLTEQEQKLRMYGKL---	41
<i>S. pombe</i>	MV-----RTRKMWLS---TTI IAMSSS--NSEQKVDVAKLSPEEQKLRMYGKL---	44
Bysothecium	MNP-----HQANKVIDISKMSPEEAKLFRLYGKL---	28
Penicillium	MNP-----HQQNKVDINSLSPPEQRLRLRYGKM---	28
<i>Clytia</i>	PRQSDFLRKRRLQGGKAKYFDSDYNYMAKSTHG--RN-----VPTGKAIPTPENLFPQRKISSTKQSNIEG	77
<i>Xenopus</i>	PGGSDFLRKRRL-QKG-QKYFDSDYNYMAKAKMKNKQ--LPTAASDKTEVTGDHIPTFDLFPQRKPSLVA-SKLAG	105
Aspergillus	PTKKDLLQNKL--K-ERKYFDSDYALSKAGKASD-----VGVVNIQSQHPVPEKIP-H	78
<i>S. cerevisiae</i>	PSKDLLLRHKM---QDRQYFDSDYALSKAGKAGVKS-----DDVIVNNSNNLPTVTP-S	94
Podila	PQPKDLLGKLR--SPDRKYFDSDYALSKAGKIN-----IPIGLKHPSPVPEKIP-H	80
Haplosporangium	PTAKGLLQKQL--K-ERKYFDSDYALSKAGKTN-----APVGSQHPVPEKIP-H	87
<i>S. pombe</i>	PQRKDLLVQKL--QQGRKYFDSDYALNKGKASDSGI-----TCIGKEIPSPVPEKIP-H	95
Bysothecium	PNKDLLQNKL--K-ERKYFDSDYALSKAGKASDIGV-----TSIGREHPVPEKIP-H	78
Penicillium	PTKKDVLQNKL--K-ERKYFDSDYALSKAGKASDVGV-----TNIQSRHPVPEKIP-H	78
<i>Clytia</i>	RKISS--TKQSNIEGGTSPQASALPEEKAVTEGE-----Q----HKSKQHITQE	122
<i>Xenopus</i>	RKPSL--V-A-SKLAG	117
Aspergillus	LTATSPGANNPAAASN--GGSISAQGGQQIPGSI SGHPGSI GFQSRSPVKEASY-LQRETSADE	139
<i>S. cerevisiae</i>	GLRESIIRRRMSSSSGGDSISRQGS-----ISSGP-----PPRSPNK	125
Podila	TNPHQSSSGS-----ISPIRESPLLHQTEFSQTR	109
Haplosporangium	STPAPSTQLI--YH-----HHGSPPTKESSLIHESSESAPAS	121
<i>S. pombe</i>	RVVSAAGSPNKEPSLHTKRPSESSPSG-----A-----SSR-----RE-SVT-	130
Bysothecium	IAPPTQN-----GQQQNGHDKGL-----SGSPVKEH-TFLHRETSLNLR	115
Penicillium	LTSTSPGVNNSA---N-NGSVSSQGGQQIPGSI SGHPGSI GFQSRSPIKDGGSF LHRGSSLSSE	137
Aspergillus	TE-----EAEKKEDDSVSPPPARGGVPIRQ	164
Podila	--AQ	111
Haplosporangium	--HHHTIAAQPNV	132
<i>S. pombe</i>	---RHDLESNEN	139
Bysothecium	ETSAAELENEEPKEENKA	133
Penicillium	GEASSGLASGSVQGEQELSVSPPAAREGVPIRK	170

Conserved amino acids of the Gwl phosphorylation motif are highlighted in green, of the PKA site in yellow, and of other conserved sequences discussed in the text in blue and magenta.

Supplementary Fig. S3

Thiophosphorylation of ClyARPP19 at S49 and XeARPP19 at S67 by Gwl.

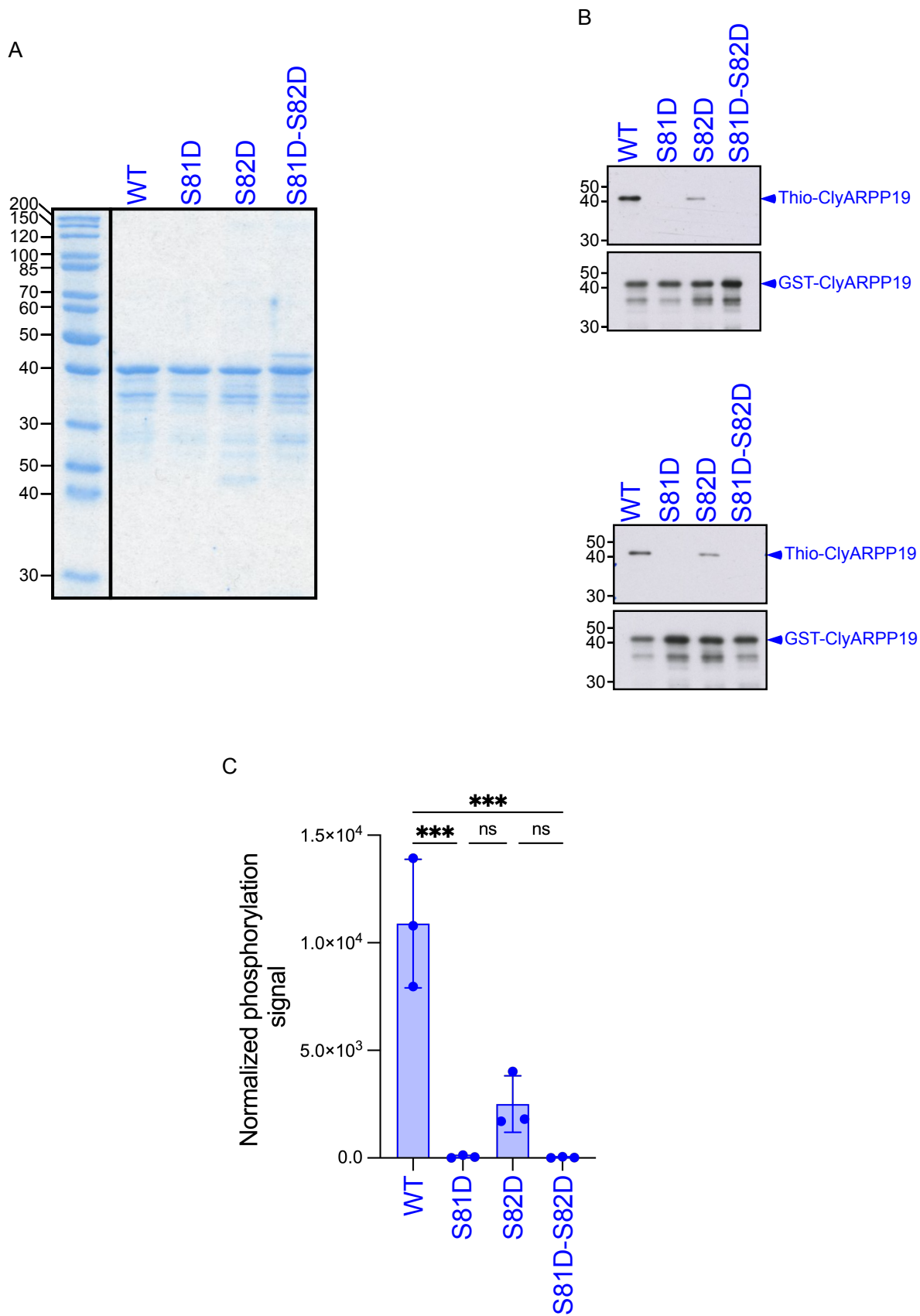


400 μ M GST-XeARPP19 or GST-ClyARPP19 were incubated (S67thio-XeARPP19 and S49thio-ClyARPP19) or not (XeARPP19 and ClyARPP19) in the presence of K71M-Gwl bound nickel beads and 1 mM γ S-ATP in kinase buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM 2-Mercaptoethanol) in a final volume of 60 μ L for 60 min at 30°C under stirring (750 rpm, Thermomixer, Eppendorf). γ S-ATP was removed by dialyzing the reaction mix against kinase buffer. After addition of Laemmli buffer¹ and heating for 1 minute at 90°C, the samples were incubated with 1 mM P-nitrobenzyl mesylate (PNBM) (Cayman Chemical) for 1 hour at room temperature. The level of alkylated thiophosphates incorporated by Gwl in ClyARPP19 and XeARPP19 was analyzed by western blot using an antibody directed against thiophosphate ester (1:60,000, Abcam ab92570). Total ClyARPP19 and XeARPP19 were detected by an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Note that XeARPP19 and ClyARPP19 exhibit different electrophoretic migration due to their slightly different molecular weights.

¹Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

Supplementary Fig. S4

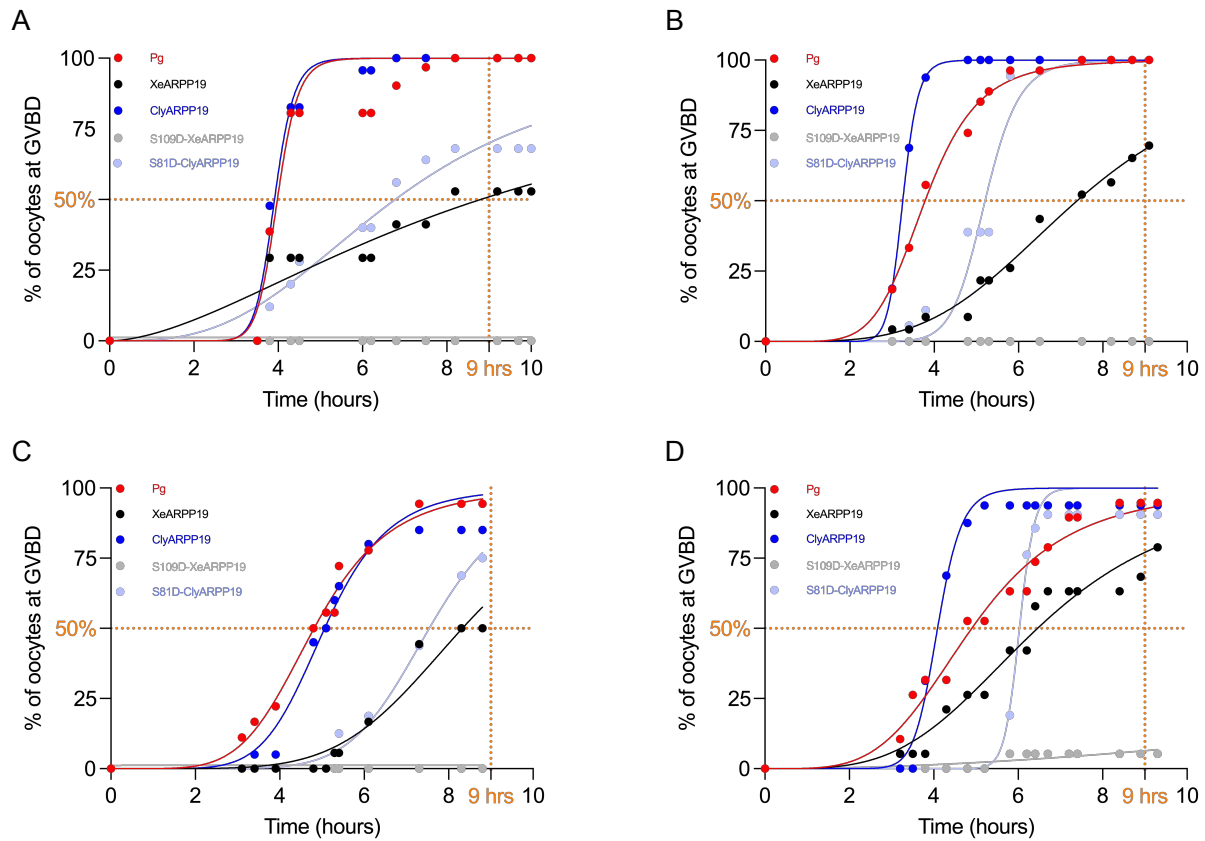
Identification of the serine phosphorylated by PKA in ClyARPP19



(A) Wild-type (WT) and three non-phosphorylatable mutants of ClyARPP19 (S81D, S82D, S81D-S82D) were produced to identify the serine phosphorylated by PKA. The purified proteins were loaded and electrophoresed on an acrylamide-SDS gel that was stained by Coomassie blue. **(B)** WT and ClyARPP19 mutants were in vitro thiophosphorylated by recombinant bovine PKA catalytic subunit in the presence of 1mM γ S-ATP for 2 hours. The thiophosphorylation was analyzed by western-blot with an anti-thiophosphate ester antibody (1:60,000, Abcam ab92570). The levels of ClyARPP19 proteins were detected with an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Two of the three replicates performed are presented here, the third one is presented in Fig. 4. **(C)** The thiophosphorylation level of the four ClyARPP19 forms was normalized by the total quantity of ARPP19 (GST signal). Quantification and statistical analysis of the in vitro kinase assay of the three replicates are represented. Ordinary one-way ANOVA: WT/S81D Pvalue=0.0001, WT/S81D-S82D Pvalue<0.0001, S82D/S81D Pvalue=0.3524 and S82D/S81D-S82D Pvalue=0.3420. Each dot represents an independent experiment.

Supplementary Fig. S5

Statistical analysis of GVBD time-courses of oocytes injected with ClyARPP19 and XeARPP19 phosphorylated by PKA



E

	Percentage of GVBD after 9 hours				
	Progesterone	XeARPP19	ClyARPP19	S109D-XeARPP19	S81D-ClyARPP19
EXP N°1	100	52,9	100	0	68
EXP N°2	100	69,6	100	0	100
EXP N°3	94,4	50	85	0	75
EXP N°4	94,7	78,9	93,8	5,3	90,5
Average	97,3	62,9	94,7	1,3	83,4
SD	3,1	13,8	7,1	2,7	14,5

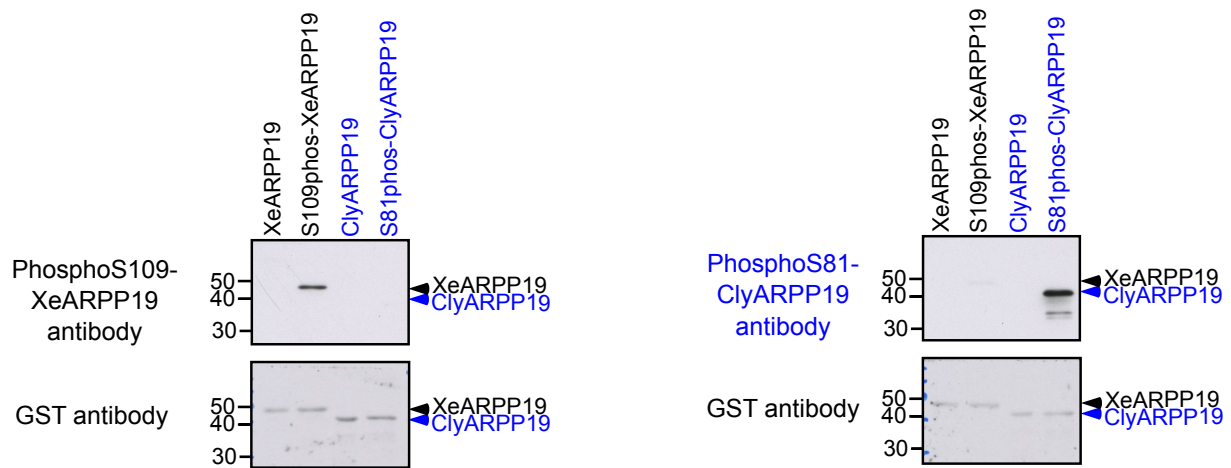
F

	Time at GVBD 50% (hours)				
	Progesterone	XeARPP19	ClyARPP19	S109D-XeARPP19	S81D-ClyARPP19
EXP N°1	3,980	8,799	3,912	NA	6,774
EXP N°2	3,783	7,391	3,254	NA	5,207
EXP N°3	4,818	8,325	5,063	NA	7,541
EXP N°4	4,9	6,458	4,089	NA	6,029
Average	4,369	7,743	4,080	NA	6,388
SD	0,569	1,037	0,748	NA	1,000

(A-D) Oocytes were injected or not (red) with 800 ng/oocyte of either XeARPP19 (black), or ClyARPP19 (dark blue), or S109D-XeARPP19 (grey) or S81D-ClyARPP19 (light blue) and then stimulated by progesterone (Pg). GVBD time-course was recorded. Four independent experiments are illustrated. For each experiment, curves were subjected to a non-linear regression (sigmoid) with the following constrains: bottom=0%, top=100%. The time at 50% of GVBD and the percentage of GVBD after 9 hours are indicated by orange dashed lines and reported respectively in **(E)** and **(F)**. SD: standard deviation.

Supplementary Fig. S6

Specificity of the phosphoS109-XeARPP19 and phosphoS81-ClyARPP19 antibodies

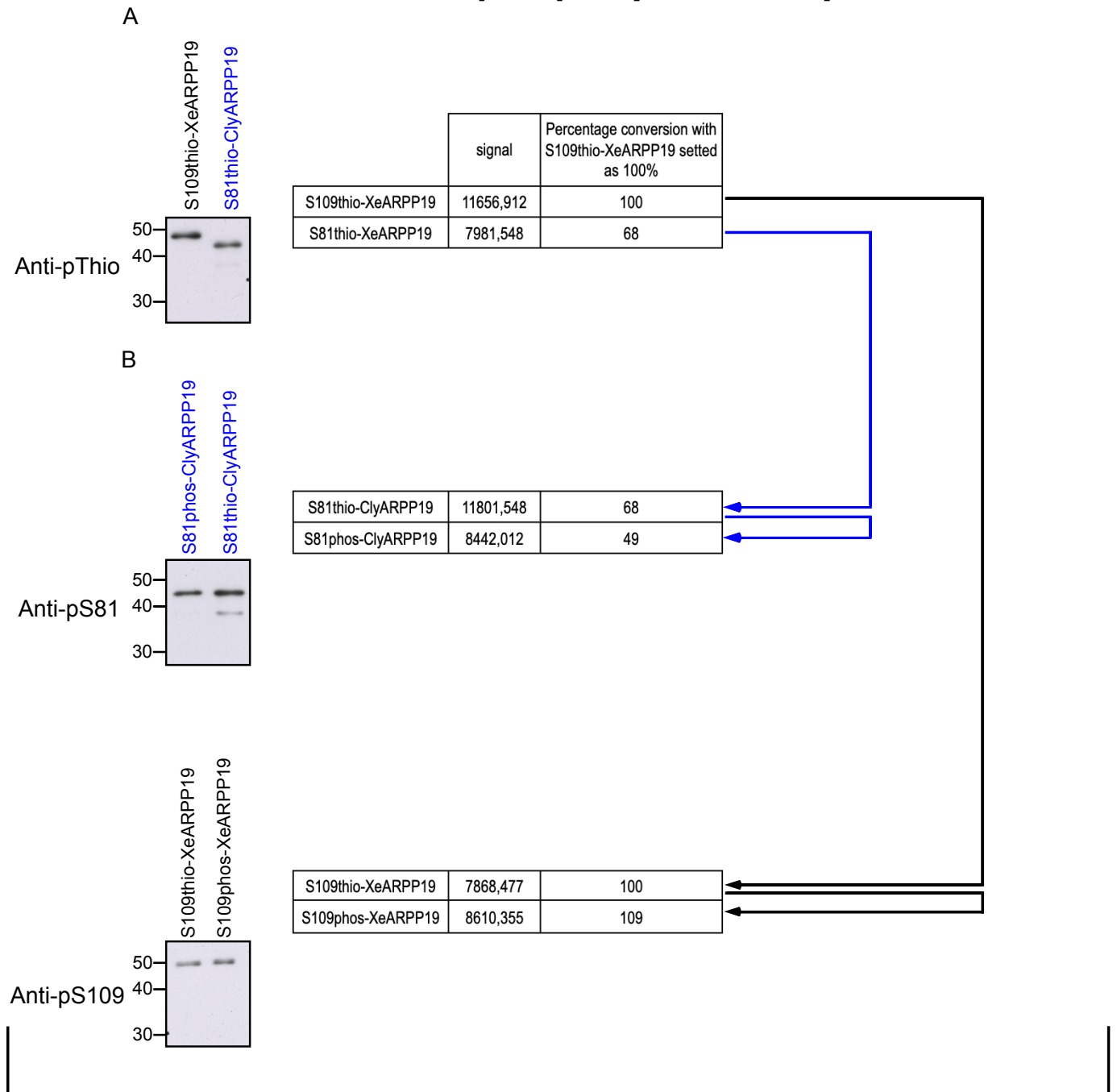


XeARPP19 and ClyARPP19 were in vitro thiophosphorylated or not by recombinant bovine PKA catalytic subunit in the presence of 1mM γ S-ATP for 2 hours. The phosphorylation was analyzed by western blot with antibodies raised against phosphoS109-XeARPP19¹ (left panel) or phosphoS81-ClyARPP19 (Covalab) (right panel). The total ARPP19 amount was detected by an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Note that XeARPP19 and ClyARPP19 exhibit different electrophoretic migration due to their slightly different molecular weights.

¹Dupre A, Daldello EM, Nairn AC, Jessus C, Haccard O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications* 5, 3318 (2014).

Supplementary Fig. S7

Calibration of phosphorylated S109-XeARPP19 and S81-ClyARPP19 amounts for dephosphorylation analysis



C

	Percentage
S81phos-ClyARPP19	49
S109phos-XeARPP19	109

x 2,2

To start the dephosphorylation assays at time 0 (**Fig. 6**) with an identical amount of phosphorylated S109-XeARPP19 and S81-ClyARPP19 proteins, XeARPP19 and ClyARPP19 were in vitro incubated with recombinant bovine PKA catalytic subunit for 2 hours, either with 1mM γ S-ATP (thiophosphorylation) or 200 μ M ATP (phosphorylation). (**A**) Thiophosphorylated S109-XeARPP19 and S81-ClyARPP19 were analysed by western blot with a same antibody for both proteins, the anti-thiophosphate ester antibody, anti-pThio (1:60,000, Abcam ab92570). The signal intensities obtained with this antibody were quantified using Image J software and converted in % of phosphorylation, 100% being affected to the highest signal. (**B**) Then, thiophosphorylated and phosphorylated proteins were western blotted using antibodies directed against the phosphorylated proteins, the anti-phosphoS81, anti-pS81, for ClyARPP19 (Covalab, Supp Fig. S6) and the anti-phosphoS109, anti-pS109, for XeARPP19¹. The respective levels of phosphorylated and thiophosphorylated proteins of each species were quantified using Image J software. Based on the % of thiophosphorylation determined in (**A**), the signals obtained for the phosphorylated forms were converted as a %. (**C**) The phosphorylation level of XeARPP19 and S81-ClyARPP19 differs by 2.2-fold. This ratio was taken in account for the dephosphorylation assay.

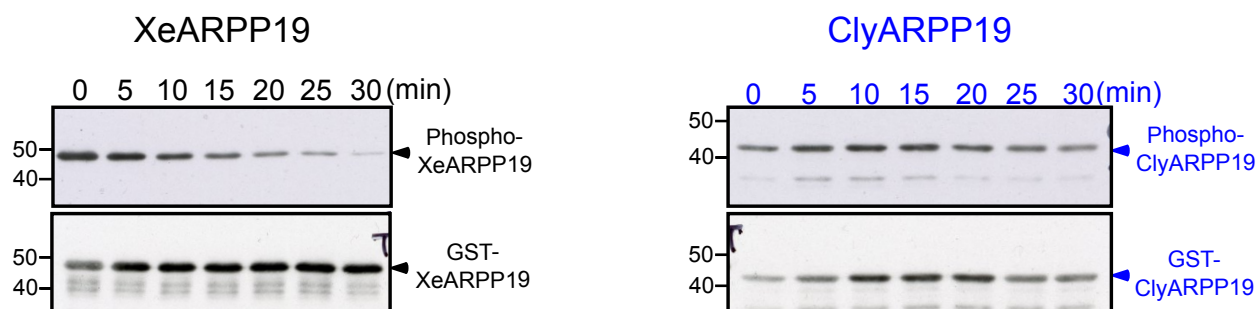
¹Dupre A, Daldello EM, Nairn AC, Jessup C, Haccard O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications* 5, 3318 (2014).

Supp Fig. S8

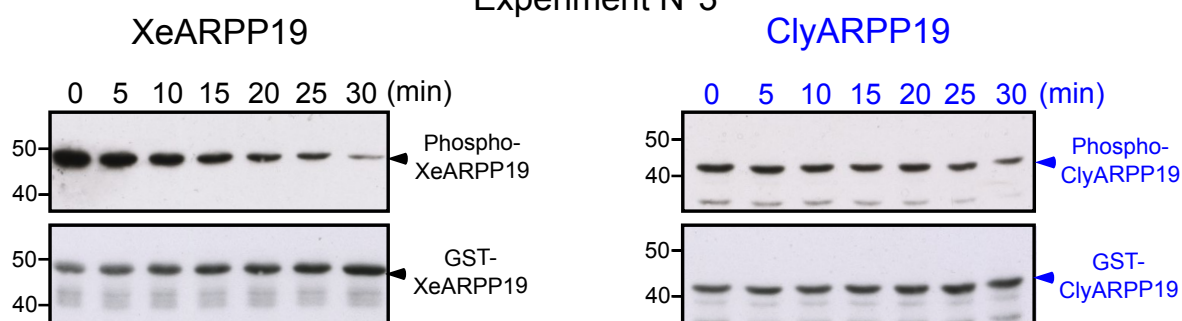
Statistical analysis of XeARPP19 and ClyARPP19 dephosphorylation by PP2A-B55δ

A

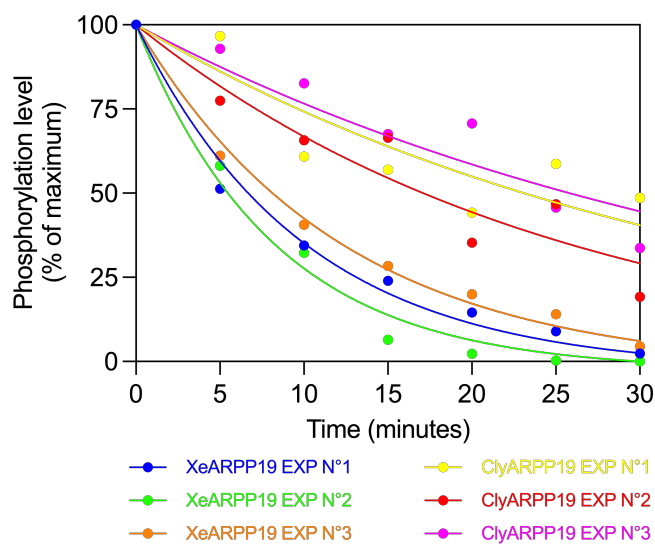
Experiment N°2



Experiment N°3



B



C

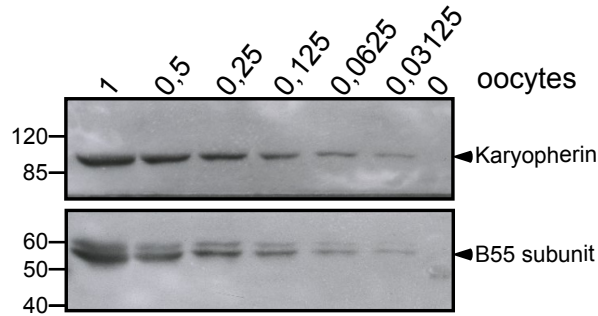
	Dephosphorylation half-time (minutes)				
	EXP N°1	EXP N°2	EXP N°3	Average	SD
XeARPP19	6,88	5,64	8,38	6,97	1,37
ClyARPP19	29,89	22,38	32,73	28,33	5,35

(A) *Xenopus* prophase oocyte extracts were incubated with hexokinase/glucose and PKI. They were supplemented with S109-phosphorylated XeARPP19 (left panels) or S81-phosphorylated ClyARPP19 (right panels). At indicated times, samples were collected and the phosphorylation level was followed by western blot using antibodies directed against phosphoS109-XeARPP19¹ or phosphoS81-ClyARPP19 (Covalab, Supp Fig. S6). The total ARPP19 amount was detected by an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Two independent experiments are presented. A third identical experiment is illustrated in Fig. 6B-D. **(B)** The levels of phosphorylated proteins of the three replicates in **(A)** and Fig. 6B were quantified by Image J software. For each replicate, the percentage of phosphorylation was plotted and a non-linear regression (exponential: One-phase decay) was applied (constraints: Y0=0%, plateau=same for each replicate). **(C)** Dephosphorylation half-time of XeARPP19 and ClyARPP19, averages and standards deviations (SD).

¹Dupre A, Daldello EM, Nairn AC, Jessup C, Haccard O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications* 5, 3318 (2014).

Supplementary Fig. S9

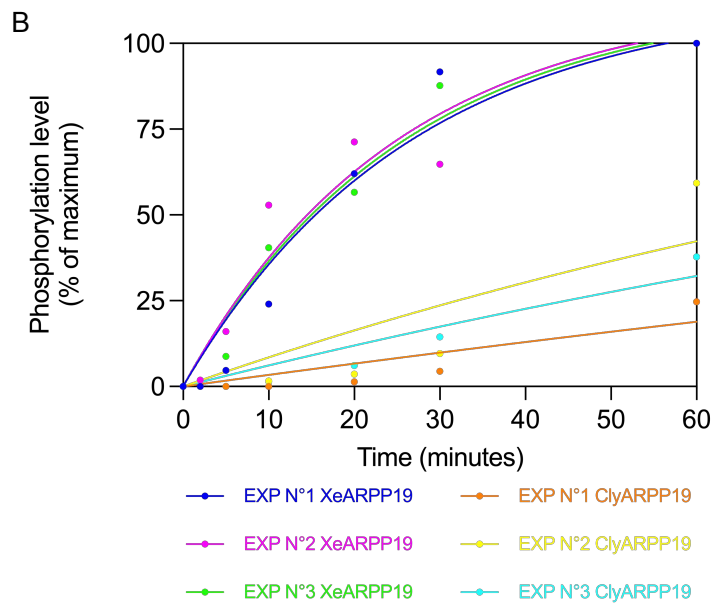
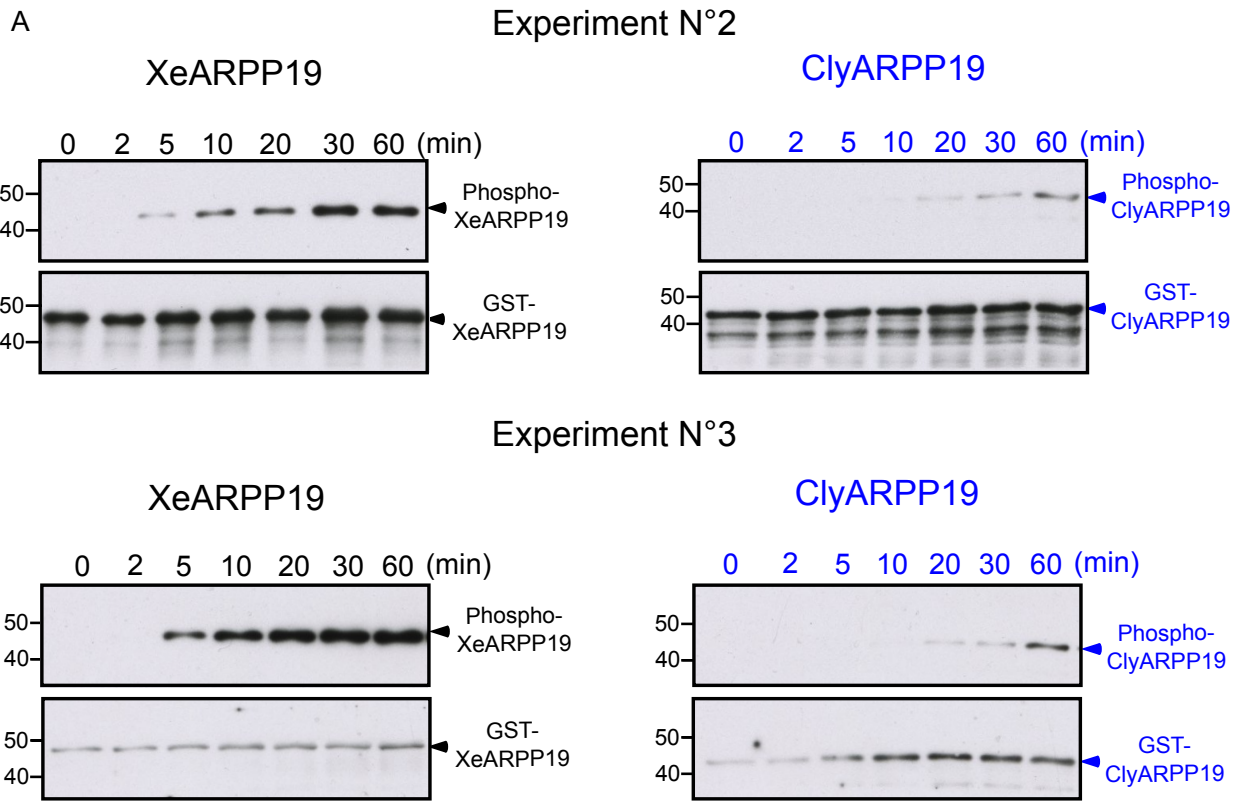
Specificity of the antibody directed against the B55 subunit of PP2A



Xenopus prophase-arrested oocyte extracts were gradually diluted as indicated by the equivalent amounts of oocytes loaded per lane and then submitted to western blot with a polyclonal rabbit antibody directed against Xenopus B55 δ (Covalab). Karyopherin was used as an internal control (anti-karyopherin antibody: 1:1,000, Santa-Cruz biotechnology sc-1863).

Supplementary Fig. S10

Statistical analysis of XeARPP19 and ClyARPP19 phosphorylation by recombinant PKA



C

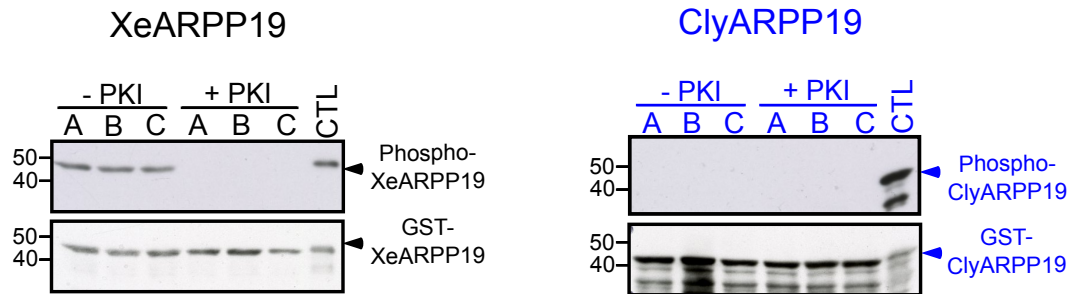
Phosphorylation half-time (minutes)					
	EXP N°1	EXP N°2	EXP N°3	Average	SD
XeARPP19	18,18	16,98	17,61	17,59	0,60
ClyARPP19	229,1	89,33	124,9	147,78	72,64

(A) XeARPP19 (left panels) or ClyARPP19 (right panels) were incubated with purified bovine PKA in the presence of 1mM γ S-ATP. Samples were collected at various times as indicated. The phosphorylation of ARPP19 proteins was assessed by western blot with an anti-thiophosphate ester antibody (1:60,000, Abcam ab92570). The total ARPP19 amount was detected by an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Two independent experiments are presented. A third identical experiment is illustrated in Fig. 8. **(B)** The levels of phosphorylated proteins of the three replicates in **(A)** and Fig. 9 were quantified by Image J software. For each replicate, the percentage of phosphorylation was plotted and a non-linear regression (exponential: One-phase association) was applied (constraints: $Y_0=100\%$, plateau=same for each replicate). **(C)** Phosphorylation half-time of XeARPP19 and ClyARPP19, averages and standards deviations (SD).

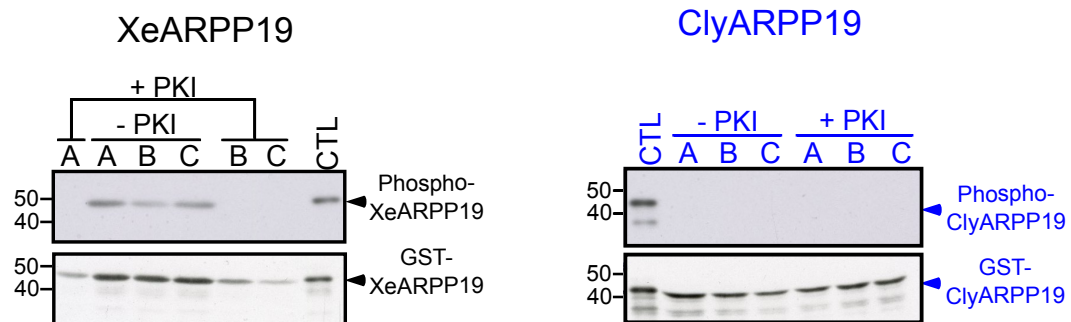
Supplementary Fig. S11

Replicates of the in vivo PKA phosphorylation experiments of XeARPP19 and ClyARPP19

Experiment N°2



Experiment N°3

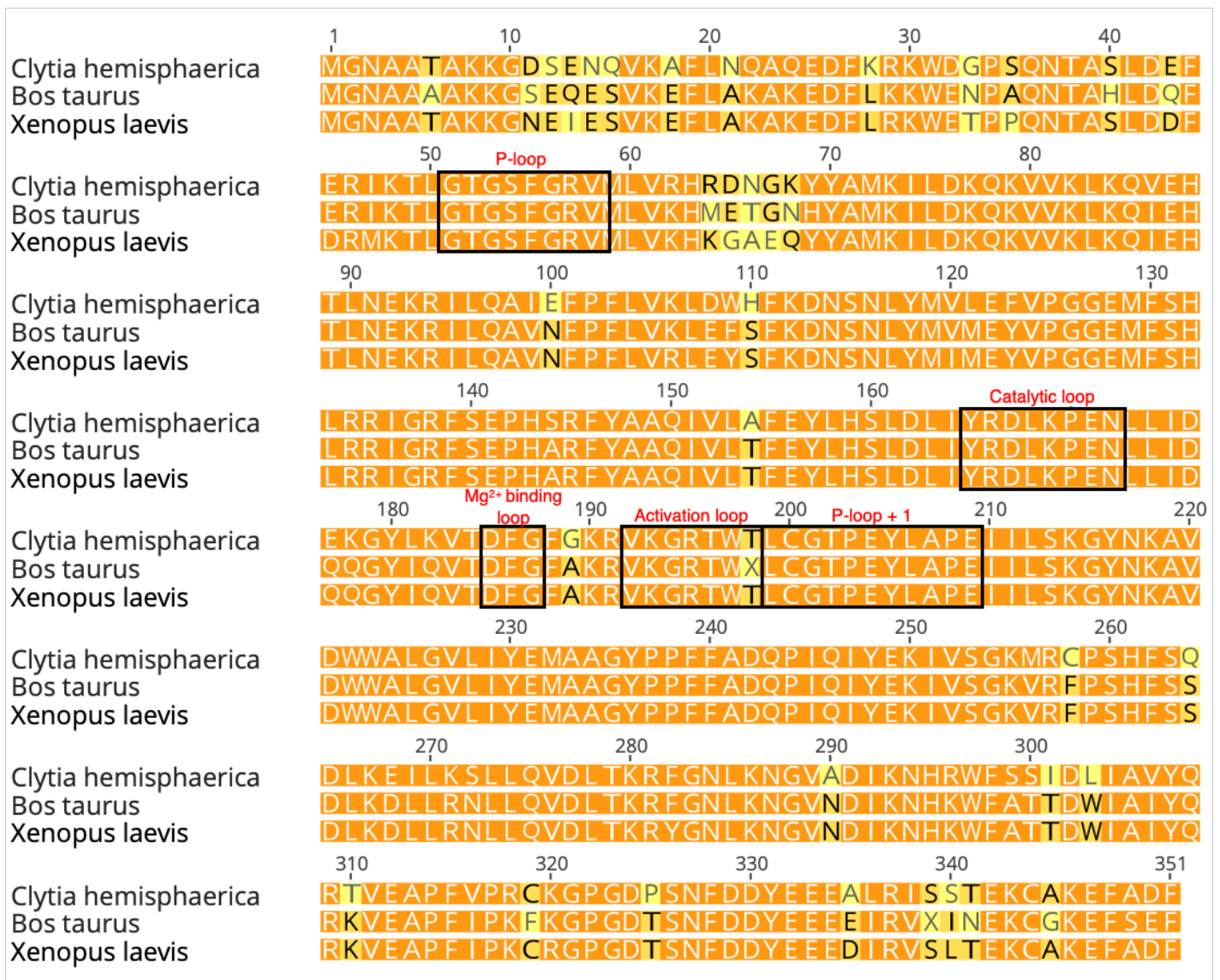


XeARPP19 or ClyARPP19 were injected into *Xenopus* oocytes previously injected or not with PKI. 30 min after ARPP19 injection, injected ARPP19 proteins were recovered by GST pull-down and their phosphorylation was monitored by western blot using antibodies against phosphoS109-XeARPP19¹ or phosphoS81-ClyARPP19 (Covalab, Supp Fig. S6). The total ARPP19 amount was detected with an anti-GST antibody (1:5,000, Sigma A-7340). Three groups of 5 oocytes (A, B and C) were analyzed in both conditions. An in vitro phosphorylated form of ARPP19 was used as a positive control of phosphorylation (CTL). Two replicates from 3 independent experiments are shown. The third experiment is illustrated in **Fig. 9A**.

¹Dupre A, Daldello EM, Nairn AC, Jessus C, Haccard O. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes. *Nature communications* 5, 3318 (2014).

Supplementary Fig. S12

Sequence alignment of *Xenopus*, *Clytia* and bovine PKA catalytic subunit



Sequence alignment of the sequences of the α-catalytic subunit of PKA of *Clytia hemisphaerica*, *Xenopus laevis* and *Bos taurus*, obtained with Geneious 2023.0 (Dotmatic). Colors represent the % of identity: dark orange: 100% identity; light orange: 100-80% identity; yellow: 80-60% identity; white: below 60% identity. The catalytic loop, the activation loop, the Mg²⁺-binding loop and the two P-loops are framed.

Supplementary Table S1. Detailed data of injection experiments in *Clytia* oocytes.

The following recombinant GST-fused proteins diluted in PBS were injected into *Clytia* prophase-arrested oocytes: wild-type (WT) CiyARPP19, wild-type (WT) XeARPP19, S49A-mutated CiyARPP19, S67A-mutated XeARPP19, SS81-82DD-double mutated CiyARPP19, S109D-mutated XeARPP19, Gwl-thiophosphorylated CiyARPP19 (GwlThio-CiyARPP19), Gwl-thiophosphorylated XeARPP19 (GwlThio-XeARPP19), PKA-thiophosphorylated CiyARPP19 (PKAThio-CiyARPP19) and PKA-thiophosphorylated XeARPP19 (PKAThio-XeARPP19). Okadaic acid (OA) or control buffer (PBS at various dilutions) were also injected.

Within one to two hours after injection, some oocytes underwent GVBD (4th column). In some experiments, oocytes were observed closely or filmed during this period and the occurrence of strong contractions was noted, in some cases resulting in lysis (5th column). In experiments where oocytes were not continuously observed during this period, only lysis was scored and any earlier contractions were not recorded (6th column). In experiments where maturation (scored as GVBD) was induced using MIH, any oocytes showing previous GVBD or contractions/lysis were excluded. MIH treatment was 10^{-7} M WPRP-amide in all experiments, except one in which 10^{-8} M WPRP-amide was used and led to 100% maturation.

Not monitored: oocytes not continuously observed, any earlier contractions were not recorded although they may have occurred.
 # Some non-injected oocytes also lysed in this experiment.

Injected solution	Date	Concentration	Phenotypes before MIH			Phenotypes after MIH	
			GVBD	Contractions (in some cases followed by lysis)	Lysis	GVBD	Other phenotypes
WT CiyARPP19	07-08-15	2mg/ml	0/21	Not monitored	2/21	19/19	-
WT CiyARPP19	21-05-15	2mg/ml	3/49	Not monitored	4/49	45/49	4 lysis
WT CiyARPP19	04-10-22	4mg/ml	Not monitored	Not monitored	5/10	5/5	-
WT CiyARPP19	05-10-22	3mg/ml	2/30	Not monitored	8/30	20/20	-
WT CiyARPP19	24-01-23	3mg/ml	0/30	Not monitored	2/30	18/18	-
WT CiyARPP19	27-01-22	4mg/ml	2/40	Not monitored	14/40	1/1	-
WT XeARPP19	30-06-15	2mg/ml	1/31	Not monitored	3/31	27/27	-
WT XeARPP19	22-09-22	4mg/ml	0/20	Not monitored	20/20		
WT XeARPP19	27-09-22	4mg/ml				26/26	
WT XeARPP19	27-09-22	4mg/ml				5/5	-
WT XeARPP19	05-10-22	3mg/ml	0/32	Not monitored	17/32	15/15	-
WT XeARPP19	27-01-22	4mg/ml	2/40 after 1h	Not monitored	5/40	6/6	-
WT XeARPP19	27-01-22	3mg/ml	1/40 after 1 h	Not monitored	6/40	1/1	-
WT XeARPP19	31-01-22	4mg/ml	0		0	10/10	1 contraction; 1 lysis; 1 multiple pb

S49A-CiyARPP19	21-05-15	2mg/ml	0/25		0/25	26/26	-
S49A-CiyARPP19	05-10-22	3mg/ml	1/30	Not monitored	8/30	17/17	-
S49A-CiyARPP19	14-10-22	2mg/ml	8/43	Not monitored	4/43	23/24	-
S67A-XeARPP19	30-06-15	2mg/ml	0/14	Not monitored	2/14	17/21	4 lysis
S67A-XeARPP19	11-10-22	3mg/ml		Not monitored	21/30	18/18	-
S67A-XeARPP19	11-10-22b	3mg/ml	0/23		8/23		-
S67A-XeARPP19	13-10-22	3mg/ml	5/21	Not monitored	9/21	7/7	-
S67A-XeARPP19	14-10-22	2mg/ml	10/26	Not monitored	2/26	22/23	-
81-82DD-CiyARPP19	22-05-15	2mg/ml	0/18	Not monitored	1/18	27/28	-
81-82DD-CiyARPP19	05-10-22	3mg/ml	0/30	Not monitored	13/30	17/17	-
81-82DD-CiyARPP19	11-10-22	3mg/ml		Not monitored	30/30		-
81-82DD-CiyARPP19	11-10-22b	3mg/ml		Not monitored	20/23	19/20	-
81-82DD-CiyARPP19	14-10-22	2mg/ml	12/36	Not monitored	2/36	22/22	-
S109D-XeARPP19	19-05-15	2mg/ml	0/25		2/25	23/25	
S109D-XeARPP19	22-09-22	4mg/ml	0/20	Not monitored	20/20		
S109D-XeARPP19	27-09-22	4mg/ml				14/15	3 lysis; 1 contraction/fission
S109D-XeARPP19	14-10-22	2mg/ml	9/38	Not monitored	4/38	23/23	-
GwIthio-CiyARPP19	28-03-23	4mg/ml	0/9	2/9	1/9		
GwIthio-CiyARPP19	28-03-23b	4mg/ml	0/13	3/13	1/13		
GwIthio-CiyARPP19	04-04-23	4mg/ml	0/13	1/13	0/13		
GwIthio-CiyARPP19	04-04-23b	4mg/ml	0/13	1/13	0/13	10/11	1 exploded
GwIthio-XeARPP19	21-03-23	4mg/ml	0/11	1/11	2/11	6/7	1 lysis
GwIthio-XeARPP19	23-03-23	4mg/ml	1/20	2/20	1/20	6/6	some minor contractions
GwIthio-XeARPP19	28-03-23	4mg/ml	1/12	2/9		-	
GwIthio-XeARPP19	07-04-23	4mg/ml	0/12	1 or 2/12			
GwIthio-XeARPP19	07-04-23b	4mg/ml	0/12	3/12	4/12#		
PKATHio-CiyARPP19	29-04-22	2mg/ml	3/34	Not monitored	0/34	31/31	-
PKATHio-CiyARPP19	03-05-22	4mg/ml	6/32	Not monitored	3/32	23/23	0/23
PKATHio-XeARPP19	29-04-22	2mg/ml	6/27	Not monitored	0/27	21/21	-
PKATHio-XeARPP19	03-05-22	4mg/ml	0/30	Not monitored	0/32	30/32	0/32
PBS	21-05-15	Undiluted	1/13	Not monitored	1/13	12/12	-

PBS	22-05-15	Undiluted	0/14		0/14	23/24	
PBS	30-06-15	Undiluted	0	0	0	100%	-
PBS	29-04-22	Undiluted	0/28	Not monitored	0/28	28/28	-
PBS	03-05-22	Undiluted	1/30	Not monitored	1/30	28/28	-
PBS	22-09-22	Undiluted	Not monitored	Not monitored	10/20		
PBS	27-09-22	Undiluted			-	16/18	-
PBS	05-10-22	Undiluted	0/30	Not monitored	15/30	15/15	
PBS	13-10-22	1/3	3/23	Not monitored	0/23	20/20	
PBS	14-10-22	1/5	10/46	Not monitored	6/46	30/30	
PBS	04-04-23	Undiluted	0/12		11/12		
PBS	04-04-23	1/2	0/13	0/13	0/13		
Okadaic Acid	16-05-23	2µM in 50% PBS	0/14	14/14 minor contractions then lysis			

3. Conclusions

Dans ce travail, nous avons en premier lieu réalisé une étude phylogénétique afin de suivre la conservation, au sein de l'arbre du vivant, des deux sites de phosphorylations d'ARPP19 : les sites Gwl et PKA. Notons qu'il a été rapporté qu'ARPP19 était susceptible d'être phosphorylé par Cdk1 chez l'étoile de mer (Okumura *et al.*, 2014) et le Xénope (Mochida, 2014). Néanmoins, la mutation du site Cdk1 d'ARPP19 de Xénope, la S28, n'affecte pas la maturation méiotique, qu'elle corresponde à un résidu non-phosphorylable (S28A) ou phospho-mimétique (S28D), pas plus que l'injection d'une forme thiophosphorylée par Cdk1 sur tous les sites potentiels de cette kinase (outre la S28, le résidu T99 situé dans une séquence PT₉₉P en est un) (Dupré, Haccard and Jessus, 2017). Les mutations de la S28 n'affectent pas non plus les propriétés d'ARPP19 quand la protéine est phosphorylée sur S67 ou S109 (Dupré, Haccard and Jessus, 2017). C'est pourquoi, nous ne nous sommes pas intéressés à ce site.

Au contraire du site PKA, le site Gwl est fortement conservé chez l'ensemble des eucaryotes. Cette conservation est suffisamment importante pour que la phosphorylation de ce site par Gwl confère aussi à ARPP19 de *Clytia* (ClyARPP19) la capacité d'inhiber PP2A-B55, ce qui a été vérifié expérimentalement dans l'article. On peut raisonnablement assumer que la phosphorylation par Gwl de ce résidu et la propriété qui en résulte, l'inhibition de PP2A-B55, ainsi que ses inférences dans la division cellulaire ont émergé avec le monde eucaryote et sont conservées chez tous depuis. Par ailleurs, nos résultats révèlent que chez *Clytia*, cette inhibition n'est pas suffisante pour induire la maturation, contrairement à ce qui est observé chez le Xénope. Il y a là un point intéressant à explorer dans le futur : PP2A n'occupe pas une position incontournable dans le mécanisme d'activation du MPF dans l'ovocyte de *Clytia*.

En revanche, la conservation du site PKA est plus restreinte que celle du site Gwl : il n'est retrouvé que chez les métazoaires. Bien que ce site soit présent dans ClyARPP19, il n'est phosphorylé ni dans l'ovocyte de Xénope ni dans l'ovocyte de *Clytia*. Les cinétiques de phosphorylation de ClyARPP19 par PKA et de déphosphorylation par PP2A-B55 montrent qu'*in vitro*, ClyARPP19 est un mauvais substrat de chacune de ces deux enzymes. Ceci rend compte de l'absence d'effet négatif d'ARPP19 sur la reprise la méiose de l'ovocyte de *Clytia* : la protéine échappe à la phosphorylation par PKA.

Chez le Xénope, le mécanisme par lequel la phosphorylation de la S109 bloque la voie d'activation du MPF n'est pas éclairci (néanmoins, voir la partie suivante de mes résultats). L'idée est que cette forme phosphorylée d'ARPP19 doit interagir avec des effecteurs qui

inhibent, directement ou indirectement, l'activation du MPF. Nous avons voulu savoir si ClyARPP19, dont nous pouvons forcer la phosphorylation sur S81, était capable d'interagir avec ces effecteurs, et si ces derniers étaient présents ou non dans l'ovocyte de *Clytia*. Pour cela, nous avons injecté dans les ovocytes une forme artificiellement phosphorylée de ClyARPP19 (mutant phosphomimétique S81D). Chez *Clytia*, ce mutant n'empêche pas l'activation du MPF. Il en va de même si l'on injecte le mutant correspondant du Xénope, ARPP19 S109D. En revanche, chez le Xénope, ClyARPP19 S81D provoque un retard de l'activation du MPF. À noter que la forme équivalente d'ARPP19 chez le Xénope, S109D, provoque une inhibition totale de l'activation du MPF. Ces résultats indiquent que (i) ClyARPP19 est capable de reconnaître les effecteurs inhibant l'activation du MPF présents dans l'ovocyte de Xénope, quoique moins efficacement que la protéine de Xénope ; (ii) ces mêmes effecteurs, *i.e.* les mécanismes impliqués dans l'inhibition du MPF par ARPP19 sous sa forme phosphorylée par PKA, ne sont pas présents dans l'ovocyte de *Clytia*.

Ces résultats mettent en évidence l'existence dans l'ovocyte de *Clytia* de deux niveaux de sécurité qui empêchent ARPP19 de bloquer de manière inopportune la reprise de la méiose : (1) ClyARPP19 n'est pas phosphorylé par PKA dans l'ovocyte ; (2) s'il advenait qu'il le soit, il n'aurait pas pour autant la capacité d'empêcher l'activation du MPF. En revanche, la présence d'ARPP19 dans l'ovocyte de *Clytia* est probablement requise pour son rôle dans l'inhibition de PP2A lorsqu'il est phosphorylé sur le site S49 par Gwl. Même si cette inhibition n'est pas suffisante chez *Clytia* pour activer le MPF, il ne fait nul doute qu'elle est requise pour permettre au MPF de phosphoryler les substrats indispensables à la réalisation des événements de division cellulaire. On constate en effet que l'injection d'ARPP19 thiophosphorylé sur S49, c'est-à-dire sous sa forme inhibitrice de PP2A, ou celle d'acide okadaïque, perturbe grandement les divisions méiotiques de l'ovocyte de *Clytia*.

Une des questions qui reste en suspens porte sur l'origine de la différence d'affinité d'ARPP19 de Xénope et de *Clytia* vis-à-vis des enzymes PKA et PP2A-B55 : le site PKA présent dans ClyARPP19 est-il trop divergent de celui de XeARPP19, bien que seulement deux acides aminés soient différents, pour être reconnu par PKA et PP2A-B55 ? Pour répondre à cette question, une expérience préliminaire a été réalisée en mutant le site PKA de ClyARPP19 pour le rendre identique à celui de XeARPP19 (**Fig. 22**). Deux protéines ont ainsi été générées : XeARPP19(PKA^{Cly}) et ClyARPP19(PKA^{Xe}). Nous avons mesuré leur cinétique de phosphorylation par PKA *in vitro* afin de voir si l'échange du site PKA explique à lui seul la différence d'affinité

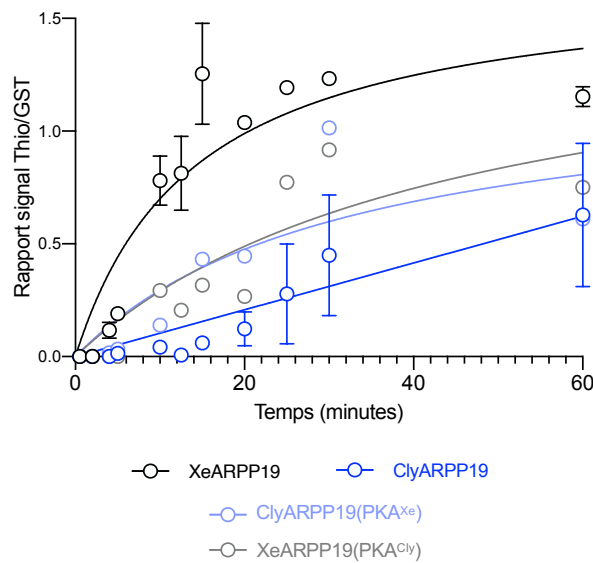
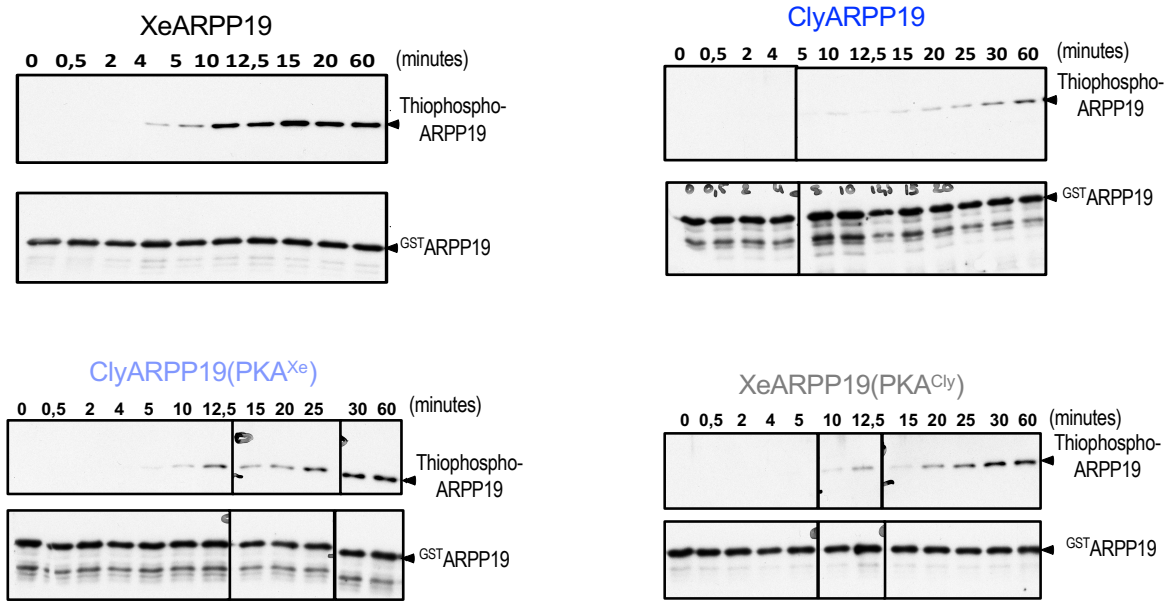


Figure 22 : Échange des sites PKA entre XeARPP19 et ClyARPP19 : Cinétique de phosphorylation de la S109 par PKA.

XeARPP19, ClyARPP19 et les mutants XeARPP19(PKA^{Cly}) et ClyARPP19(PKA^{Xe}) correspondant à l'échange des sites PKA, ont été incubés *in vitro* en présence de PKA recombinante et d'ATPγS. Des aliquots de la réaction de thio-phosphorylation ont été prélevés à différents temps comme indiqué, puis analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre les protéines thio-phosphorylées. Les quantifications des résultats des western blots (rapport signal Thio-phosphorylation/GST) sont représentées sur le graphe.

entre XeARPP19 et ClyARPP19. Même si le niveau de phosphorylation de XeARPP19(PKA^{Cly}) est plus bas que celui de la protéine sauvage de Xénope, il reste plus élevé que celui de ClyARPP19. De façon similaire, ClyARPP19(PKA^{Xe}) présente une cinétique de phosphorylation par PKA plus rapide que celle de ClyARPP19, sans pour autant atteindre le niveau beaucoup plus élevé de XeARPP19 (**Fig. 22**). Cette expérience montre que « l'échange » des sites PKA entre ClyARPP19 et XeARPP19 n'explique qu'en partie seulement le fait que le niveau de phosphorylation en S109 soit inférieur pour ClyARPP19. Ceci pointe l'implication d'autres séquences d'ARPP19 dans la capacité d'ARPP19 à être ou ne pas être phosphorylé en S109. Ceci m'a amené à me pencher sur l'identification de motifs divergents entre ClyARPP19 et XeARPP19 et à échanger ces motifs entre les deux protéines pour analyser ensuite la capacité de ces chimères à être phosphorylées en S109. Au final, ces chimères se sont révélées intéressantes dans l'étude de la régulation de l'autre site de phosphorylation d'ARPP19, la S67. Ceci fait l'objet de la partie suivante de mes résultats.

V. Bibliographie

Agostinho, A. *et al.* (2016) 'High density of REC8 constrains sister chromatid axes and prevents illegitimate synaptonemal complex formation', *EMBO reports*, 17(6), pp. 901–913. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201642030>.

Álvarez-Fernández, M. *et al.* (2013) 'Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), pp. 17374–17379. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1310745110>.

Amiel, A. *et al.* (2009) 'Conserved Functions for Mos in Eumetazoan Oocyte Maturation Revealed by Studies in a Cnidarian', *Current Biology*, 19(4), pp. 305–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.054>.

Andrade, E.C. *et al.* (2017) 'ARPP-16 Is a Striatal-Enriched Inhibitor of Protein Phosphatase 2A Regulated by Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinase 3 (Mast 3 Kinase)', *The Journal of Neuroscience*, 37(10), pp. 2709–2722. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4559-15.2017>.

Archambault, V. *et al.* (2007) 'Mutations in *Drosophila* Greatwall/Scant reveal its roles in mitosis and meiosis and interdependence with Polo kinase', *PLoS genetics*, 3(11), p. e200. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030200>.

Archambault, V. *et al.* (2022) 'Dephosphorylation in nuclear reassembly after mitosis', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, p. 1012768. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1012768>.

Baert, F. *et al.* (2003) 'Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), pp. 49714–49720. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M308067200>.

Barton, N.R. and Goldstein, L.S. (1996) 'Going mobile: microtubule motors and chromosome segregation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(5), pp. 1735–1742. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1735>.

Basant, A. and Glotzer, M. (2018) 'Spatiotemporal Regulation of RhoA during Cytokinesis', *Current biology: CB*, 28(9), pp. R570–R580. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.045>.

Bayaa, M. *et al.* (2000) 'The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), pp. 12607–12612. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.220302597>.

Beach, D., Durkacz, B. and Nurse, P. (1982) 'Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast', *Nature*, 300(5894), pp. 706–709. Available at: <https://doi.org/10.1038/300706a0>.

- Bennabi, I., Terret, M.-E. and Verlhac, M.-H. (2016) 'Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes', *The Journal of Cell Biology*, 215(5), pp. 611–619. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201607062>.
- Bernis, C. *et al.* (2007) 'Pin1 stabilizes Emi1 during G2 phase by preventing its association with SCF β trcp', *EMBO reports*, 8(1), pp. 91–98. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400853>.
- Blake-Hodek, K.A. *et al.* (2012) 'Determinants for Activation of the Atypical AGC Kinase Greatwall during M Phase Entry', *Molecular and Cellular Biology*, 32(8), pp. 1337–1353. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.06525-11>.
- Boddy, M.N. *et al.* (2001) 'Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase', *Cell*, 107(4), pp. 537–548. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00536-0).
- Booher, R.N., Holman, P.S. and Fattaey, A. (1997) 'Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35), pp. 22300–22306. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22300>.
- Bouftas, N. *et al.* (2022) 'Cyclin B3 implements timely vertebrate oocyte arrest for fertilization', *Developmental Cell*, 57(19), pp. 2305-2320.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.09.005>.
- Boyer, J. *et al.* (1986) 'Progesterone and CAMP-Dependent Protein Kinase Regulate in Viva the Level of Phosphorylation of Two Proteins (Ad,20,000 and Ad,.32,000) in Xenopus Oocytes', 113, p. 9.
- Bravo, R. *et al.* (1978) 'Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(3), pp. 1242–1246. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1242>.
- Brostrom, C.O. *et al.* (1971) 'Interaction of the Subunits of Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase of Muscle', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(10), pp. 2444–2447. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2444>.
- Brostrom, M.A. *et al.* (1970) 'A cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase from cardiac muscle', *Advances in Enzyme Regulation*, 8, pp. 191–203. Available at: [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(70\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0065-2571(70)90017-8).
- Brunet, S. *et al.* (2008) 'Meiotic Regulation of TPX2 Protein Levels Governs Cell Cycle Progression in Mouse Oocytes', *PLOS ONE*, 3(10), p. e3338. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003338>.
- Burke, B. (2012) 'It Takes KASH to Hitch to the SUN', *Cell*, 149(5), pp. 961–963. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.004>.

Busa, W.B. and Nuccitelli, R. (1985) 'An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*', *The Journal of Cell Biology*, 100(4), pp. 1325–1329. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.100.4.1325>.

C, J., D, H. and R, O. (1986) 'Distribution of microtubules during the breakdown of the nuclear envelope of the *Xenopus* oocyte: an immunocytochemical study', *Biology of the cell*, 56(2). Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1986.tb00448.x>.

Carazo-Salas, R.E. *et al.* (1999) 'Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation', *Nature*, 400(6740), pp. 178–181. Available at: <https://doi.org/10.1038/22133>.

Castilho, P.V. *et al.* (2009) 'The M Phase Kinase Greatwall (Gwl) Promotes Inactivation of PP2A/B55 δ , a Phosphatase Directed Against CDK Phosphosites', *Molecular Biology of the Cell*, 20(22), pp. 4777–4789. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0643>.

Castro, A. *et al.* (2001) 'Cyclin B/cdc2 Induces c-Mos Stability by Direct Phosphorylation in *Xenopus* Oocytes', *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), pp. 2660–2671.

Castro, A. and Lorca, T. (2018) 'Greatwall kinase at a glance', *Journal of Cell Science*, 131(20), p. jcs222364. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.222364>.

Chambon, J.-P. *et al.* (2013) 'The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II', *Current biology: CB*, 23(6), pp. 485–490. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.004>.

Charbonneau, M., Bonnac, G. and Boujard, D. (1990) 'Patterns of protein synthesis during *Xenopus* oocyte maturation differ according to the type of stimulation', *Cell Differentiation and Development*, 31(3), pp. 197–206. Available at: [https://doi.org/10.1016/0922-3371\(90\)90132-G](https://doi.org/10.1016/0922-3371(90)90132-G).

Cheeseman, I.M. *et al.* (2006) 'The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore', *Cell*, 127(5), pp. 983–997. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.039>.

Chen, X.-B. *et al.* (2001) 'Human Mus81-Associated Endonuclease Cleaves Holliday Junctions In Vitro', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 1117–1127. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00375-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00375-6).

Chesnel, F. *et al.* (1997) 'Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes', *Developmental Biology*, 188(1), pp. 122–133. Available at: <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8631>.

Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1989) 'How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system?', *Trends in Biochemical Sciences*, 14(12), pp. 483–488. Available at: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90180-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90180-1).

Ciehanover, A., Hod, Y. and Hershko, A. (1978) 'A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 81(4), pp. 1100–1105. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(78\)91249-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(78)91249-4).

Cohen, P., Holmes, C.F. and Tsukitani, Y. (1990) 'Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation', *Trends in Biochemical Sciences*, 15(3), pp. 98–102. Available at: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90192-e](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90192-e).

Colas, P. and Guerrier, P. (1995) 'The oocyte metaphase arrest', *Progress in Cell Cycle Research*, 1, pp. 299–308. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1809-9_24.

Colledge, W.H. *et al.* (1994) 'Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs', *Nature*, 370(6484), pp. 65–68. Available at: <https://doi.org/10.1038/370065a0>.

Conduit, P.T., Wainman, A. and Raff, J.W. (2015) 'Centrosome function and assembly in animal cells', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(10), pp. 611–624. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm4062>.

Culotti, J. and Hartwell, L.H. (1971) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast: III. Seven genes controlling nuclear division', *Experimental Cell Research*, 67(2), pp. 389–401. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90424-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90424-1).

Cundell, M.J. *et al.* (2013) 'The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation', *Molecular Cell*, 52(3), pp. 393–405. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.005>.

Cundell, M.J. *et al.* (2016) 'A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit', *The Journal of Cell Biology*, 214(5), pp. 539–554. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201606033>.

Cyert, M.S. and Kirschner, M.W. (1988) 'Regulation of MPF activity in vitro', *Cell*, 53(2), pp. 185–195. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90380-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90380-7).

Daldello, E.M. *et al.* (2015) 'Control of Cdc6 accumulation by Cdk1 and MAPK is essential for completion of oocyte meiotic divisions in *Xenopus*', *Journal of Cell Science*, 128(14), pp. 2482–2496. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.166553>.

De Smedt, V. *et al.* (2002) 'Thr-161 Phosphorylation of Monomeric Cdc2: REGULATION BY PROTEIN PHOSPHATASE 2C IN XENOPUS OOCYTES*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 28592–28600. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202742200>.

Deguchi, R., Takeda, N. and Stricker, S.A. (2011) 'Comparative biology of cAMP-induced germinal vesicle breakdown in marine invertebrate oocytes', *Molecular Reproduction and Development*, 78(10–11), pp. 708–725. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.21346>.

Della Monica, R. *et al.* (2015) 'Fcp1 phosphatase controls Greatwall kinase to promote PP2A-

B55 activation and mitotic progression', *eLife*, 4, p. e10399. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.10399>.

Deng, J. *et al.* (2008) 'The *Xenopus laevis* isoform of G protein-coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in *X. laevis* oocytes', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(8), pp. 1853–1865. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2008-0124>.

Devault, A. *et al.* (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), pp. 5027–5036. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00185.x>.

Dorée, M., Peaucellier, G. and Picard, A. (1983) 'Activity of the maturation-promoting factor and the extent of protein phosphorylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes', *Developmental Biology*, 99(2), pp. 489–501. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90298-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90298-1).

Draetta, G. *et al.* (1988) 'Regulation of the vertebrate cell cycle by the cdc2 protein kinase', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 53 Pt 1, pp. 195–201. Available at: <https://doi.org/10.1101/sqb.1988.053.01.025>.

Draetta, G. and Beach, D. (1989) 'The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle', *Journal of Cell Science*, 1989(Supplement_12), pp. 21–27. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.1989.Supplement_12.3.

Drury, K.C. and Schorderet-Slatkine, S. (1975) 'Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*', *Cell*, 4(3), pp. 269–274. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90175-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90175-0).

Duckworth, B.C., Weaver, J.S. and Ruderman, J.V. (2002) 'G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), pp. 16794–16799. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.222661299>.

Ducommun, B. *et al.* (1991) 'cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin.', *The EMBO Journal*, 10(11), pp. 3311–3319. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04895.x>.

Dulubova, I. *et al.* (2001) 'ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins', *Journal of Neurochemistry*, 77(1), pp. 229–238. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00191.x>.

Dumont, J. *et al.* (2007) 'A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes', *The Journal of Cell Biology*, 176(3), pp. 295–305. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200605199>.

Dumont, J. and Verlhac, M.-H. (2013) 'Using FRET to Study RanGTP Gradients in Live Mouse Oocytes', in H.A. Homer (ed.) *Mammalian Oocyte Regulation: Methods and Protocols*.

Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 107–120. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-191-2_7.

Dumont, J.N. (1972) 'Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals', *Journal of Morphology*, 136(2), pp. 153–179. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>.

Dunphy, W.G. *et al.* (1988) 'The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis', *Cell*, 54(3), pp. 423–431. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90205-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90205-X).

Dupré, A. *et al.* (2002) 'Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes', *The EMBO Journal*, 21(15), pp. 4026–4036. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf400>.

Dupré, A. *et al.* (2013) 'The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes', *Journal of Cell Science*, 126(17), pp. 3916–3926. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.126599>.

Dupré, A. *et al.* (2013) 'The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes', *Journal of Cell Science*, 126(17), pp. 3916–3926. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.126599>.

Dupré, A. *et al.* (2014a) 'Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes', *Nature Communications*, 5(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms4318>.

Dupré, A. *et al.* (2014b) 'Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in *Xenopus* oocytes', *Nature Communications*, 5(1), p. 3318. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms4318>.

Dupré, A., Haccard, O. and Jessus, C. (2010) 'Mos in the Oocyte: How to Use MAPK Independently of Growth Factors and Transcription to Control Meiotic Divisions', *Journal of Signal Transduction*, 2011, p. e350412. Available at: <https://doi.org/10.1155/2011/350412>.

Dupré, A., Haccard, O. and Jessus, C. (2011) 'Mos in the Oocyte: How to Use MAPK Independently of Growth Factors and Transcription to Control Meiotic Divisions', *Journal of Signal Transduction*, 2011, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1155/2011/350412>.

Dupré, A. and Jessus, C. (2017) 'ARPP19 Phosphorylations by PKA and Greatwall: The Yin and the Yang of the Cell Decision to Divide', in C. Prigent (ed.) *Protein Phosphorylation*. InTech. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.71332>.

Dupré, A.-I., Haccard, O. and Jessus, C. (2017) 'The greatwall kinase is dominant over PKA in controlling the antagonistic function of ARPP19 in *Xenopus* oocytes', *Cell Cycle*, 16(15), pp. 1440–1452. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1338985>.

El Yakoubi, W. *et al.* (2017) 'Mps1 kinase-dependent Sgo2 centromere localisation mediates

cohesin protection in mouse oocyte meiosis I', *Nature Communications*, 8(1), p. 694. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00774-3>.

El-Etr, M., Schorderet-Slatkine, S. and Baulieu, E.-E. (1979) 'Meiotic Maturation in *Xenopus laevis* Oocytes Initiated by Insulin', *Science*, 205(4413), pp. 1397–1399. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.472755>.

Evans, T. *et al.* (1983) 'Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33(2), pp. 389–396. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8).

Evaul, K. *et al.* (2007) 'Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(1), pp. 186–196. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2006-0301>.

Fabritius, A.S., Ellefson, M.L. and McNally, F.J. (2011) 'Nuclear and Spindle Positioning during Oocyte Meiosis', *Current opinion in cell biology*, 23(1), pp. 78–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.008>.

Faivre, J. *et al.* (2001) 'Membrane-anchored cyclin A2 triggers Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte', *FEBS letters*, 506(3), pp. 243–248. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02920-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02920-9).

Fantes, P. (1979) 'Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast', *Nature*, 279(5712), pp. 428–430. Available at: <https://doi.org/10.1038/279428a0>.

Fekairi, S. *et al.* (2009) 'Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases', *Cell*, 138(1), pp. 78–89. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.029>.

Felix, M.A. *et al.* (1989) 'Temporal regulation of cdc2 mitotic kinase activity and cyclin degradation in cell-free extracts of *Xenopus* eggs', *Journal of Cell Science. Supplement*, 12, pp. 99–116. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.1989.supplement_12.9.

Ferby, I. *et al.* (1999) 'A novel p34cdc2-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes', *Genes & Development*, 13(16), pp. 2177–2189.

Ferrigno, P., Langan, T.A. and Cohen, P. (1993) 'Protein phosphatase 2A1 is the major enzyme in vertebrate cell extracts that dephosphorylates several physiological substrates for cyclin-dependent protein kinases.', *Molecular Biology of the Cell*, 4(7), pp. 669–677. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.4.7.669>.

Fesquet, D. *et al.* (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), pp. 3111–3121. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05980.x>.

Fisher, D. *et al.* (1998) 'Germinal vesicle material is dispensable for oscillations in cdc2 and MAP kinase activities, cyclin B degradation and synthesis during meiosis in *Xenopus* oocytes', *Biology of the Cell*, 90(6–7), pp. 497–508. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1998.tb01059.x>.

Fisher, D.L. *et al.* (1999) 'Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes', *Development (Cambridge, England)*, 126(20), pp. 4537–4546. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.126.20.4537>.

Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1994) 'A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase', *Cell*, 78(4), pp. 713–724. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90535-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90535-5).

Fleig, U.N. and Gould, K.L. (1991) 'Regulation of cdc2 activity in *Schizosaccharomyces pombe*: the role of phosphorylation', *Seminars in cell biology*, 2(4), pp. 195–204.

Frank-Vaillant, M. *et al.* (1999) 'Two Distinct Mechanisms Control the Accumulation of Cyclin B1 and Mos in *Xenopus* Oocytes in Response to Progesterone', *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), pp. 3279–3288. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3279>.

Freeman, R.S. *et al.* (1989) 'Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of *Xenopus* oocytes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), pp. 5805–5809.

Furuno, N. *et al.* (1994) 'Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes.', *The EMBO Journal*, 13(10), pp. 2399–2410.

Furuno, N., Kawasaki, A. and Sagata, N. (2003) 'Expression of cell-cycle regulators during *Xenopus* oogenesis', *Gene Expression Patterns*, 3(2), pp. 165–168. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00037-1).

Gaffré, M. *et al.* (2011) 'A critical balance between Cyclin B synthesis and Myt1 activity controls meiosis entry in *Xenopus* oocytes', *Development*, 138(17), pp. 3735–3744. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.063974>.

Gallo, C.J. *et al.* (1995) 'Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes.', *Journal of Cell Biology*, 130(2), pp. 275–284. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.130.2.275>.

Gard, D.L. (1992) 'Microtubule organization during maturation of *Xenopus* oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles', *Developmental Biology*, 151(2), pp. 516–530. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90190-r](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90190-r).

Gautier, J. *et al.* (1988) 'Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+', *Cell*, 54(3), pp. 433–439. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90206-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90206-1).

- Gautier, J. *et al.* (1991) 'cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2', *Cell*, 67(1), pp. 197–211. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90583-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90583-k).
- Gerace, L. and Blobel, G. (1980) 'The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis', *Cell*, 19(1), pp. 277–287. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90409-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90409-2).
- Gerhart, J. *et al.* (1985) 'M-phase promoting factors from eggs of *Xenopus laevis*', *Cytobios*, 43(174S), pp. 335–347.
- Gerhart, J., Wu, M. and Kirschner, M. (1984) 'Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs.', *Journal of Cell Biology*, 98(4), pp. 1247–1255. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.98.4.1247>.
- Gharbi-Ayachi, A. *et al.* (2010) 'The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A', *Science*, 330(6011), pp. 1673–1677. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1197048>.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) 'Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway', *Nature*, 349(6305), pp. 132–138. Available at: <https://doi.org/10.1038/349132a0>.
- Goris, J. *et al.* (1989) 'Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes', *FEBS letters*, 245(1–2), pp. 91–94. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80198-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80198-x).
- Gould, K.L. *et al.* (1990) 'Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase', *Science (New York, N.Y.)*, 250(4987), pp. 1573–1576. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1703321>.
- Gross, S.D. *et al.* (1999) 'Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk', *Science (New York, N.Y.)*, 286(5443), pp. 1365–1367. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1365>.
- Gross, S.D. *et al.* (2000) 'The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90Rsk', *Current Biology*, 10(8), pp. 430–438. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00425-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00425-5).
- Gruss, O.J. *et al.* (2001) 'Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity', *Cell*, 104(1), pp. 83–93. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00193-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00193-3).
- Gruss, O.J. *et al.* (2002) 'Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells', *Nature Cell Biology*, 4(11), pp. 871–879. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb870>.
- Gruss, O.J. (2018) 'Animal Female Meiosis: The Challenges of Eliminating Centrosomes', *Cells*, 7(7), p. 73. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells7070073>.

Gutierrez, G.J. *et al.* (2006) 'Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation', *Nature Cell Biology*, 8(10), pp. 1084–1094. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1472>.

Haas, D. *et al.* (2005) 'The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(8), pp. 2035–2046. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2004-0531>.

Haase, J. *et al.* (2017) 'Distinct Roles of the Chromosomal Passenger Complex in the Detection of and Response to Errors in Kinetochore-Microtubule Attachment', *Developmental Cell*, 42(6), pp. 640–654.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.022>.

Haccard, O. *et al.* (1993) 'Induction of Metaphase Arrest in Cleaving *Xenopus* Embryos by MAP Kinase', *Science*, 262(5137), pp. 1262–1265. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.8235656>.

Haccard, O. *et al.* (2012) 'Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 362(1), pp. 110–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.019>.

Haccard, O. and Jessus, C. (2006a) 'Oocyte Maturation, Mos and Cyclins—A Matter of Synthesis: Two Functionally Redundant Ways to Induce Meiotic Maturation', *Cell Cycle*, 5(11), pp. 1152–1159. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.5.11.2800>.

Haccard, O. and Jessus, C. (2006b) 'Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis', *EMBO reports*, 7(3), pp. 321–325. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400611>.

Hached, K. *et al.* (2019) 'Arpp19 et ENSA, deux inhibiteurs de la phosphatase PP2A-B55 contrôlent de manière différentielle le cycle cellulaire', *médecine/sciences*, 35(6–7), pp. 504–506. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2019104>.

Hansen, D.V., Tung, J.J. and Jackson, P.K. (2006) 'CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytosolic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), pp. 608–613. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0509549102>.

Hara, M. *et al.* (2012) 'Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor', *Nature Communications*, 3, p. 1059. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms2062>.

Hartwell, L.H. (1971a) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation', *Journal of Molecular Biology*, 59(1), pp. 183–194. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90420-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90420-7).

Hartwell, L.H. (1971b) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling

bud emergence and cytokinesis', *Experimental Cell Research*, 69(2), pp. 265–276. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90223-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90223-0).

Hartwell, L.H. *et al.* (1973) 'Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants', *Genetics*, 74(2), pp. 267–286. Available at: <https://doi.org/10.1093/genetics/74.2.267>.

Hartwell, L.H. *et al.* (1974) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast', *Science (New York, N.Y.)*, 183(4120), pp. 46–51. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.183.4120.46>.

Hartwell, L.H. (1991) 'Twenty-five years of cell cycle genetics', *Genetics*, 129(4), pp. 975–980. Available at: <https://doi.org/10.1093/genetics/129.4.975>.

Hartwell, L.H., Culotti, J. and Reid, B. (1970) 'Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66(2), pp. 352–359. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.66.2.352>.

Hashimoto, N. *et al.* (1994) 'Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice', *Nature*, 370(6484), pp. 68–71. Available at: <https://doi.org/10.1038/370068a0>.

Heald, R. and McKeon, F. (1990) 'Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis', *Cell*, 61(4), pp. 579–589. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90470-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90470-Y).

Heim, A., Konietzny, A. and Mayer, T.U. (2015) 'Protein phosphatase 1 is essential for Greatwall inactivation at mitotic exit', *EMBO reports*, 16(11), pp. 1501–1510. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201540876>.

Heim, A., Tischer, T. and Mayer, T.U. (2018) 'Calcineurin promotes APC/C activation at meiotic exit by acting on both XErp1 and Cdc20', *EMBO reports*, 19(12), p. e46433. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201846433>.

Hill, R.S. and Macgregor, H.C. (1980) 'The development of lampbrush chromosome-type transcription in the early diplotene oocytes of *Xenopus laevis*: an electron-microscope analysis', *Journal of Cell Science*, 44(1), pp. 87–101. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.44.1.87>.

Hirt, H. *et al.* (1991) 'Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), pp. 1636–1640. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1636>.

Hochegger, H. *et al.* (2001) 'New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation', *Development*, 128(19), pp. 3795–3807. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.128.19.3795>.

Hoffmann, I., Clarke, P.R. and Draetta, G. (1995) 'The cdc25 Phosphatase: Biochemistry and Regulation in the Eukaryotic Cell Cycle', in E.E. Bittar and M. Whitaker (eds) *Advances in*

Molecular and Cell Biology. Elsevier, pp. 151–164. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60010-7](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60010-7).

Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (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), pp. 4302–4310. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06750.x>.

Hooke, R. (1635-1703) A. du texte (1665) *Micrographia or Some physiological descriptions of minutes bodies made by magnifying glasses : with observations and inquiries thereupon ([Reprod.]) / by R. Hooke,...* Available at: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k98770v> (Accessed: 11 May 2023).

Horiuchi, A. *et al.* (1990) 'Purification and cDNA cloning of ARPP-16, a cAMP-regulated phosphoprotein enriched in basal ganglia, and of a related phosphoprotein, ARPP-19', *The Journal of Biological Chemistry*, 265(16), pp. 9476–9484.

Houliston, E. *et al.* (2022) 'Past, present and future of Clytia hemisphaerica as a laboratory jellyfish', *Current Topics in Developmental Biology*, 147, pp. 121–151. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2021.12.014>.

Huchon, D. *et al.* (1981) 'The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation: A 4-step scheme for meiotic maturation', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 22(2), pp. 211–222. Available at: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(81\)90092-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(81)90092-7).

Huchon, D. *et al.* (1993) 'Control of metaphase I formation in *Xenopus* oocyte: Effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis', *Biology of the Cell*, 77(2), pp. 133–141. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(05\)80181-9](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(05)80181-9).

Inoue, D. *et al.* (2007) 'A direct link of the Mos–MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs', *Nature*, 446(7139), pp. 1100–1104. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05688>.

Ishiguro, K. *et al.* (2014) 'Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes', *Genes & Development*, 28(6), pp. 594–607. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.237313.113>.

Ishiguro, K. and Watanabe, Y. (2016) 'The cohesin REC8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex assembly', *EMBO reports*, 17(6), pp. 783–784. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201642544>.

Izumi, T., Walker, D.H. and Maller, J.L. (1992) 'Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity.', *Molecular Biology of the Cell*, 3(8), pp. 927–939. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.3.8.927>.

Janicot, M., Flores-Riveros, J.R. and Lane, M.D. (1991) 'The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in *Xenopus laevis*

oocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 266(15), pp. 9382–9391.

Janssens, V., Longin, S. and Goris, J. (2008) 'PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail)', *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), pp. 113–121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.004>.

Jeffrey, P.D. *et al.* (1995) 'Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex', *Nature*, 376(6538), pp. 313–320. Available at: <https://doi.org/10.1038/376313a0>.

Jessus, C. *et al.* (1988) 'Specific inhibition of endogenous beta-tubulin synthesis in *Xenopus* oocytes by anti-messenger oligodeoxynucleotides', *Nucleic Acids Research*, 16(5), pp. 2225–2233. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/16.5.2225>.

Jessus, C. *et al.* (1991) 'Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte: Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP', *Development*, 111(3), pp. 813–820. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.111.3.813>.

Jessus, C. and Beach, D. (1992) 'Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B', *Cell*, 68(2), pp. 323–332. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90473-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90473-p).

Jessus, C., Ducommun, B. and Beach, D. (1990) 'Direct activation of cdc2 with phosphatase: identification of p13^{sucl}-sensitive and insensitive steps', *FEBS Letters*, 266(1–2), pp. 4–8. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)90002-C](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)90002-C).

Jessus, C. and Haccard, O. (2007) 'Calcium's double punch', *Nature*, 449(7160), pp. 297–298. Available at: <https://doi.org/10.1038/449297a>.

Jessus, C., Munro, C. and Houlston, E. (2020) 'Managing the Oocyte Meiotic Arrest—Lessons from Frogs and Jellyfish', *Cells*, 9(5), p. 1150. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9051150>.

Jessus, C. and Ozon, R. (1995) 'Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis', *Progress in Cell Cycle Research*, 1, pp. 215–228. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1809-9_17.

Ji, Z. *et al.* (2017) 'A sequential multi-target Mps1 phosphorylation cascade promotes spindle checkpoint signaling', *eLife*, 6, p. e22513. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.22513>.

Jin, P., Hardy, S. and Morgan, D.O. (1998) 'Nuclear Localization of Cyclin B1 Controls Mitotic Entry After DNA Damage', *The Journal of Cell Biology*, 141(4), pp. 875–885.

Jinno, S. *et al.* (1994) 'Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle', *The EMBO journal*, 13(7), pp. 1549–1556. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06417.x>.

Johnson, R.T. and Rao, P.N. (1970) 'Mammalian Cell Fusion : Induction of Premature

Chromosome Condensation in Interphase Nuclei', *Nature*, 226(5247), pp. 717–722. Available at: <https://doi.org/10.1038/226717a0>.

Jordana, X., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1982) 'Differential inhibition by progesterone of the adenylate cyclase of oocytes and follicle cells of *Xenopus laevis*', *FEBS Letters*, 143(1), pp. 124–128. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80287-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80287-1).

Josefsberg Ben-Yehoshua, L. *et al.* (2007) 'The Role of *Xenopus* Membrane Progesterone Receptor β in Mediating the Effect of Progesterone on Oocyte Maturation', *Molecular Endocrinology*, 21(3), pp. 664–673. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2006-0256>.

Karaiskou, A. *et al.* (1999) 'Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification', *Journal of Cell Science*, 112(21), pp. 3747–3756. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.112.21.3747>.

Karaiskou, A. *et al.* (2001) 'Differential Regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and Cyclins', *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 36028–36034. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104722200>.

Karaiskou, A. *et al.* (2004a) 'Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes', *Development (Cambridge, England)*, 131(7), pp. 1543–1552. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.01050>.

Karaiskou, A. *et al.* (2004b) 'Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes', *Development*, 131(7), pp. 1543–1552. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.01050>.

Karasu, M.E. *et al.* (2019) 'Cyclin B3 promotes anaphase I onset in oocyte meiosis', *The Journal of Cell Biology*, 218(4), pp. 1265–1281. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201808091>.

Karess, R. (2005) 'Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint', *Trends in Cell Biology*, 15(7), pp. 386–392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.003>.

Keating, L., Touati, S.A. and Wassmann, K. (2020) 'A PP2A-B56—Centered View on Metaphase-to-Anaphase Transition in Mouse Oocyte Meiosis I', *Cells*, 9(2), p. 390. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9020390>.

King, R.W. *et al.* (1995) 'A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B', *Cell*, 81(2), pp. 279–288. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90338-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90338-0).

Kishimoto, T. (2015) 'Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF', *Chromosoma*, 124(4), pp. 417–428. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0508-y>.

Kitajima, T.S. *et al.* (2006) 'Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin', *Nature*, 441(7089), pp. 46–52. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04663>.

Kiyokawa, H. and Ray, D. (2008) 'In vivo roles of CDC25 phosphatases: Biological insight into the anti-cancer therapeutic targets', *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 8(8), pp. 832–836.

Kline-Smith, S.L. and Walczak, C.E. (2004) 'Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation: Refocusing on Microtubule Dynamics', *Molecular Cell*, 15(3), pp. 317–327. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.012>.

Kobayashi, H. *et al.* (1991) 'On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*', *The Journal of Cell Biology*, 114(4), pp. 755–765. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.114.4.755>.

Kolatorova, L. *et al.* (2022) 'Progesterone: A Steroid with Wide Range of Effects in Physiology as Well as Human Medicine', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), p. 7989. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23147989>.

Kumm, E.J. *et al.* (2020) 'The Cell Cycle Checkpoint System MAST(L)-ENSA/ARPP19-PP2A is Targeted by cAMP/PKA and cGMP/PKG in Anucleate Human Platelets', *Cells*, 9(2), p. 472. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9020472>.

Labbé, J.C. *et al.* (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), pp. 3053–3058. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08456.x>.

Labbé, J.C. *et al.* (2021) 'The study of the determinants controlling Arpp19 phosphatase-inhibitory activity reveals an Arpp19/PP2A-B55 feedback loop', *Nature Communications*, 12(1), p. 3565. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23657-0>.

Lacroix, B., Lorca, T. and Castro, A. (2022) 'Structural, enzymatic and spatiotemporal regulation of PP2A-B55 phosphatase in the control of mitosis', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, p. 967909. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.967909>.

Lambert, C.C. (2008) 'Signaling pathways in ascidian oocyte maturation: the role of cyclic AMP and follicle cells in germinal vesicle breakdown', *Development, Growth & Differentiation*, 50(3), pp. 181–188. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.00983.x>.

Laurell, E. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry', *Cell*, 144(4), pp. 539–550. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.012>.

Leclère, L. *et al.* (2019) 'The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle', *Nature Ecology & Evolution*, 3(5), pp. 801–810. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0833-2>.

Lee, J. *et al.* (2008) 'Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells', *Nature Cell Biology*, 10(1), pp. 42–52. Available at:

<https://doi.org/10.1038/ncb1667>.

Lee, J. and Hirano, T. (2011) 'RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis', *Journal of Cell Biology*, 192(2), pp. 263–276. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201008005>.

Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) 'Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*', *Nature*, 327(6117), pp. 31–35. Available at: <https://doi.org/10.1038/327031a0>.

Lee, M.S. *et al.* (1992) '*cdc25+* encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34^{cdc2}', *Molecular Biology of the Cell*, 3(1), pp. 73–84. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.3.1.73>.

Lee, T.H. *et al.* (1991) 'INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A', *Cell*, 64(2), pp. 415–423. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90649-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90649-j).

Lei, M. and Tye, B.K. (2001) 'Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex', *Journal of Cell Science*, 114(Pt 8), pp. 1447–1454. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.114.8.1447>.

Lemaître, J.-M., Bocquet, S. and Méchali, M. (2002) 'Competence to replicate in the unfertilized egg is conferred by Cdc6 during meiotic maturation', *Nature*, 419(6908), pp. 718–722. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01046>.

Lemonnier, T. *et al.* (2021) 'The M-phase regulatory phosphatase PP2A-B55 δ opposes protein kinase A on Arpp19 to initiate meiotic division', *Nature Communications*, 12(1), p. 1837. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22124-0>.

Lemonnier, T., Dupré, A. and Jessus, C. (2020) 'The G2-to-M transition from a phosphatase perspective: a new vision of the meiotic division', *Cell Division*, 15(1), p. 9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13008-020-00065-2>.

Lenormand, J.-L. *et al.* (1999) 'Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition', *The EMBO Journal*, 18(7), pp. 1869–1877. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1869>.

Levine, J.E. (2015) 'Chapter 26 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat', in T.M. Plant and A.J. Zeleznik (eds) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, pp. 1199–1257. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0>.

Li, Y.-H. *et al.* (2013) 'Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes1', *Biology of Reproduction*, 89(3), pp. 53, 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109850>.

Linder, M.I. *et al.* (2017) 'Mitotic Disassembly of Nuclear Pore Complexes Involves CDK1- and PLK1-Mediated Phosphorylation of Key Interconnecting Nucleoporins', *Developmental Cell*, 43(2), pp. 141-156.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.020>.

- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. and Medema, R.H. (2009) 'The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network', *Journal of Cell Biology*, 185(2), pp. 193–202. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200812045>.
- Liu, F. *et al.* (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), pp. 571–583.
- Liu, J. and Maller, J.L. (2005) 'Calcium Elevation at Fertilization Coordinates Phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to Release Metaphase Arrest by Cytostatic Factor', *Current Biology*, 15(16), pp. 1458–1468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.030>.
- Llano, E. *et al.* (2008) 'Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice', *Genes & Development*, 22(17), pp. 2400–2413. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.475308>.
- Lohka, M.J., Hayes, M.K. and Maller, J.L. (1988) 'Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), pp. 3009–3013. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.3009>.
- Lohka, M.J., Kyes, J.L. and Maller, J.L. (1987) 'Metaphase protein phosphorylation in *Xenopus laevis* eggs', *Molecular and Cellular Biology*, 7(2), pp. 760–768. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.760-768.1987>.
- Lorca, T. *et al.* (1993) 'Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs', *Nature*, 366(6452), pp. 270–273. Available at: <https://doi.org/10.1038/366270a0>.
- Lundgren, K. *et al.* (1991) 'mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2', *Cell*, 64(6), pp. 1111–1122. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90266-2).
- Lutz, L.B. *et al.* (2001) 'Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp. 13728–13733. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.241471598>.
- Lutz, L.B. *et al.* (2003) 'Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(6), pp. 1106–1116. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2003-0032>.
- Ma, S. *et al.* (2016) 'Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1', *Journal of Cell Science*, 129(7), pp. 1329–1339. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.178855>.
- Maller, J., Wu, M. and Gerhart, J.C. (1977) 'Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes', *Developmental Biology*, 58(2), pp. 295–312. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90093-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90093-8).

- Maller, J.L. (2001) *The elusive progesterone receptor in Xenopus oocytes*. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.8>.
- Maller, J.L., Butcher, F.R. and Krebs, E.G. (1979) 'Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus oocytes*', *The Journal of Biological Chemistry*, 254(3), pp. 579–582.
- Maller, J.L. and Krebs, E.G. (1977) 'Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus oocytes*. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.', *Journal of Biological Chemistry*, 252(5), pp. 1712–1718.
- Maller, J.L. and Krebs, E.G. (1980) 'Regulation of Oocyte Maturation', in B.L. Horecker and E.R. Stadtman (eds) *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, pp. 271–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152816-4.50012-1>.
- Manandhar, G., Schatten, H. and Sutovsky, P. (2005) 'Centrosome reduction during gametogenesis and its significance', *Biology of Reproduction*, 72(1), pp. 2–13. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031245>.
- Margolis, S.S. *et al.* (2003) 'PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation', *The EMBO Journal*, 22(21), pp. 5734–5745. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg545>.
- Margolis, S.S. *et al.* (2006) 'A Role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated Positive Feedback Activation of Cdc25', *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), pp. 1779–1789. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0751>.
- Masui, Y. (1967) 'Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*', *Journal of Experimental Zoology*, 166(3), pp. 365–375. Available at: <https://doi.org/10.1002/jez.1401660309>.
- Masui, Y. (2001) 'From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF)', *Differentiation*, 69(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.690101.x>.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971a) 'Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes', *Journal of Experimental Zoology*, 177(2), pp. 129–145. Available at: <https://doi.org/10.1002/jez.1401770202>.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971b) 'Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes', *Journal of Experimental Zoology*, 177(2), pp. 129–145. Available at: <https://doi.org/10.1002/jez.1401770202>.
- Maton, G. *et al.* (2003) 'Cdc2-cyclin B triggers H3 kinase activation of Aurora-A in *Xenopus oocytes*', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp. 21439–21449. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M300811200>.

Maton, G. *et al.* (2005) 'Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in *Xenopus* oocytes: a crucial role of phosphatase 2A', *Journal of Cell Science*, 118(11), pp. 2485–2494. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.02370>.

Matos, J. and West, S.C. (2014) 'Holliday junction resolution: Regulation in space and time', *DNA Repair*, 19, pp. 176–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.013>.

Mayer-Jaekel, R.E. *et al.* (1993) 'The 55 kd regulatory subunit of *Drosophila* protein phosphatase 2A is required for anaphase', *Cell*, 72(4), pp. 621–633. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90080-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90080-A).

Mayer-Jaekel, R.E. *et al.* (1994) 'Drosophila mutants in the 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A show strongly reduced ability to dephosphorylate substrates of p34cdc2', *Journal of Cell Science*, 107(9), pp. 2609–2616. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.107.9.2609>.

McDougall, A. (2012) 'Cell-Cycle Control in Oocytes and During Early Embryonic Cleavage Cycles in Ascidians', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 235–264. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394308-8.00006-6>.

McVey, S.L., Cosby, J.K. and Nannas, N.J. (2021) 'Aurora B Tension Sensing Mechanisms in the Kinetochore Ensure Accurate Chromosome Segregation', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), p. 8818. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22168818>.

Meijer, L. *et al.* (1989) 'Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase', *The EMBO journal*, 8(8), pp. 2275–2282. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08353.x>.

Meneau, F. *et al.* (2020) 'Translational Control of *Xenopus* Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era', *Cells*, 9(6), p. 1502. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9061502>.

Minshull, J. *et al.* (1990) 'The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle.', *The EMBO Journal*, 9(9), pp. 2865–2875. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07476.x>.

Minshull, J. *et al.* (1996) 'Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast', *Current Biology*, 6(12), pp. 1609–1620. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70784-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70784-7).

Minshull, J., Blow, J.J. and Hunt, T. (1989) 'Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis', *Cell*, 56(6), pp. 947–956. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90628-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90628-4).

Miot, M. (2019) 'Conférence Jacques Monod 2019, communication affichée'.

Mishima, M., Kaitna, S. and Glotzer, M. (2002) 'Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity', *Developmental Cell*, 2(1), pp. 41–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/s1534->

5807(01)00110-1.

Mochida, S. *et al.* (2009) 'Regulated activity of PP2A-B55 δ is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts', *The EMBO Journal*, 28(18), pp. 2777–2785. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.238>.

Mochida, S. *et al.* (2010) 'Greatwall Phosphorylates an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A That Is Essential for Mitosis', *Science*, 330(6011), pp. 1670–1673. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1195689>.

Mochida, S. (2014) 'Regulation of α -endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A, by multisite phosphorylation', *The FEBS Journal*, 281(4), pp. 1159–1169. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.12685>.

Mochida, S. and Hunt, T. (2007) 'Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase', *Nature*, 449(7160), pp. 336–340. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06121>.

Mueller, P.R. *et al.* (1995) 'Myt1: A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Both Threonine-14 and Tyrosine-15', *Science*, 270(5233), pp. 86–90. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.270.5233.86>.

Mulner, O. *et al.* (1979) 'Cyclic AMP synthesis in *Xenopus laevis* oocytes inhibition by progesterone', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 582(1), pp. 179–184. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(79\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(79)90301-5).

Mulner, O. *et al.* (1985) 'Pertussis toxin facilitates the progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocyte. Possible role of protein phosphorylation', *FEBS letters*, 181(2), pp. 397–402. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80300-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80300-8).

Mulner, O., Bellé, R. and Ozon, R. (1983) 'cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the *Xenopus* oocyte: evidence for an intracellular feedback mechanism', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 31(1), pp. 151–160. Available at: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(83\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(83)90038-2).

Mulner, O., Cartaud, A. and Ozon, R. (1980) 'Cyclic AMP phosphodiesterase activities in *Xenopus laevis* oocytes', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 16(1), pp. 31–39. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1980.tb01055.x>.

Murakami, M.S. and Vande Woude, G.F. (1998) 'Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *Mos*', *Development (Cambridge, England)*, 125(2), pp. 237–248. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.125.2.237>.

Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1989) 'Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle', *Nature*, 339(6222), pp. 275–280. Available at: <https://doi.org/10.1038/339275a0>.

Murray, A.W., Solomon, M.J. and Kirschner, M.W. (1989) 'The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity', *Nature*, 339(6222), pp.

280–286. Available at: <https://doi.org/10.1038/339280a0>.

Musante, V. *et al.* (2017) 'Reciprocal regulation of ARPP-16 by PKA and MAST3 kinases provides a cAMP-regulated switch in protein phosphatase 2A inhibition', *eLife*, 6, p. e24998. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.24998>.

Nader, N. *et al.* (2014) 'Role for endocytosis of a constitutively active GPCR (GPR185) in releasing vertebrate oocyte meiotic arrest', *Developmental Biology*, 395(2), pp. 355–366. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.036>.

Nakajima, H. *et al.* (2008) 'Myt1 protein kinase is essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit', *The Journal of Cell Biology*, 181(1), pp. 89–103. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200708176>.

Nakajo, N. *et al.* (2000) 'Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes', *Genes & Development*, 14(3), pp. 328–338. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.14.3.328>.

Nasmyth, K. and Nurse, P. (1981) 'Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*', *Molecular and General Genetics MGG*, 182(1), pp. 119–124. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00422777>.

Nebreda, A.R., Gannon, J.V. and Hunt, T. (1995) 'Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes', *The EMBO journal*, 14(22), pp. 5597–5607. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00247.x>.

Nikalayevich, E. *et al.* (2022) 'Aurora B/C-dependent phosphorylation promotes Rec8 cleavage in mammalian oocytes', *Current Biology*, 32(10), pp. 2281–2290.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.041>.

Nishiyama, T. *et al.* (2007) 'Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*', *Nature*, 449(7160), pp. 341–345. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06136>.

Nishiyama, T., Ohsumi, K. and Kishimoto, T. (2007) 'Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytoskeletal factor arrest in *Xenopus laevis* eggs', *Nature*, 446(7139), pp. 1096–1099. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05696>.

Norbury, C., Blow, J. and Nurse, P. (1991) 'Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates.', *The EMBO Journal*, 10(11), pp. 3321–3329. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04896.x>.

Nurse, P. (1975) 'Genetic control of cell size at cell division in yeast', *Nature*, 256(5518), pp. 547–551. Available at: <https://doi.org/10.1038/256547a0>.

Nurse, P. and Thuriaux, P. (1977) 'Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast', *Experimental Cell Research*, 107(2), pp. 365–375. Available at:

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90358-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90358-5).

Nurse, P. and Thuriaux, P. (1980) 'REGULATORY GENES CONTROLLING MITOSIS IN THE FISSION YEAST SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE', *Genetics*, 96(3), pp. 627–637. Available at: <https://doi.org/10.1093/genetics/96.3.627>.

Obsilova, V. and Obsil, T. (2022) 'Structural insights into the functional roles of 14-3-3 proteins', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.1016071> (Accessed: 20 July 2023).

Okumura, E. *et al.* (2014) 'Cyclin B–Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase–independent mechanism', *Journal of Cell Biology*, 204(6), pp. 881–889. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201307160>.

Olate, J. *et al.* (1984) 'Oocyte adenylyl cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin', *FEBS letters*, 175(1), pp. 25–30. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80562-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80562-1).

Parker, L.L. *et al.* (1991) 'Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner.', *The EMBO Journal*, 10(5), pp. 1255–1263. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08067.x>.

Parker, L.L. and Piwnica-Worms, H. (1992) 'Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase', *Science (New York, N.Y.)*, 257(5078), pp. 1955–1957. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1384126>.

Peco, E. *et al.* (2012) 'The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production', *Development (Cambridge, England)*, 139(6), pp. 1095–1104. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.068569>.

Pesenti, M.E. *et al.* (2022) 'Structure of the human inner kinetochore CCAN complex and its significance for human centromere organization', *Molecular Cell*, 82(11), pp. 2113–2131.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.027>.

Peter, M. *et al.* (2001) 'The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes', *Nature Cell Biology*, 3(1), pp. 83–87. Available at: <https://doi.org/10.1038/35050607>.

Peter, M. *et al.* (2002) 'A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK', *Development*, 129(9), pp. 2129–2139. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.129.9.2129>.

Picard, A. *et al.* (1985) 'Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation-promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes', *Developmental Biology*, 109(2), pp. 311–320. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90458-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90458-0).

Picard, A. *et al.* (1987) 'Antipain microinjection prevents progesterone to inhibit adenylyl cyclase in *Xenopus* oocytes', *Cell Biology International Reports*, 11(2), pp. 81–88. Available at:

[https://doi.org/10.1016/0309-1651\(87\)90107-x](https://doi.org/10.1016/0309-1651(87)90107-x).

Pondaven, P., Meijer, L. and Beach, D. (1990) 'Activation of M-phase-specific histone H1 kinase by modification of the phosphorylation of its p34cdc2 and cyclin components', *Genes & Development*, 4(1), pp. 9–17. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.4.1.9>.

Poon, R.Y. *et al.* (1993) 'The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2.', *The EMBO Journal*, 12(8), pp. 3123–3132.

Propst, F. *et al.* (1987) 'c-mos proto-oncogene RNA transcripts in mouse tissues: structural features, developmental regulation, and localization in specific cell types', *Molecular and Cellular Biology*, 7(5), pp. 1629–1637. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.7.5.1629-1637.1987>.

Qian, Y.-W. *et al.* (1998) 'Activated Polo-Like Kinase Plx1 Is Required at Multiple Points during Mitosis in *Xenopus laevis*', *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), pp. 4262–4271. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.18.7.4262>.

Qian, Y.-W. *et al.* (2001) 'The Polo-like Kinase Plx1 Is Required for Activation of the Phosphatase Cdc25C and Cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* Oocytes', *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), pp. 1791–1799.

Qian, Y.-W., Erikson, E. and Maller, J.L. (1999) 'Mitotic Effects of a Constitutively Active Mutant of the *Xenopus* Polo-Like Kinase Plx1', *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), pp. 8625–8632. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.19.12.8625>.

Queralt, E. *et al.* (2006) 'Downregulation of PP2A^{Cdc55} Phosphatase by Separase Initiates Mitotic Exit in Budding Yeast', *Cell*, 125(4), pp. 719–732. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.038>.

Quiroga Artigas, G. *et al.* (2020) 'A G protein-coupled receptor mediates neuropeptide-induced oocyte maturation in the jellyfish *Clytia*', *PLOS Biology*. Edited by M.F. Wolfner, 18(3), p. e3000614. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000614>.

Rago, F., Gascoigne, K.E. and Cheeseman, I.M. (2015) 'Distinct Organization and Regulation of the Outer Kinetochore KMN Network Downstream of CENP-C and CENP-T', *Current Biology*, 25(5), pp. 671–677. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.059>.

Rass, U. *et al.* (2010) 'Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein', *Genes & Development*, 24(14), pp. 1559–1569. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.585310>.

Rattani, A. *et al.* (2013) 'Sgo2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes', *eLife*, 2, p. e01133. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.01133>.

Rauh, N.R. *et al.* (2005) 'Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor

XErp1 for degradation', *Nature*, 437(7061), pp. 1048–1052. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04093>.

Rechsteiner, M. (1987) 'Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis', *Annual Review of Cell Biology*, 3, pp. 1–30. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.000245>.

Renaudin, J.P. *et al.* (1994) 'Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), pp. 7375–7379. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7375>.

Rezig, I.M. *et al.* (2023) 'The role of anillin/Mid1p during medial division and cytokinesis: from fission yeast to cancer cells', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 22(6), pp. 633–644. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2147655>.

Rime, H. *et al.* (1991) 'MPF is activated in growing immature *Xenopus* oocytes in the absence of detectable tyrosine dephosphorylation of p34cdc2', *Experimental Cell Research*, 196(2), pp. 241–245. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90257-U](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90257-U).

Rime, H. *et al.* (1994) 'Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I', *Biology of the Cell*, 82(1), pp. 11–22. Available at: [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0248-4900(94)90061-2).

Rime, H., Haccard, O. and Ozon, R. (1992) 'Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic Amp-dependent protein kinase in *Xenopus* oocytes', *Developmental Biology*, 151(1), pp. 105–110. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90217-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90217-5).

Rime, H., Jessus, C. and Ozon, R. (1995) 'Tyrosine Phosphorylation of p34cdc2 Is Regulated by Protein Phosphatase 2A in Growing Immature *Xenopus* Oocytes', *Experimental Cell Research*, 219(1), pp. 29–38. Available at: <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1201>.

Ríos-Cardona, D. *et al.* (2008) 'A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes', *Developmental Biology*, 317(1), pp. 380–388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.047>.

Rogacheva, M.V. *et al.* (2014) 'Mlh1-Mlh3, a Meiotic Crossover and DNA Mismatch Repair Factor, Is a Msh2-Msh3-stimulated Endonuclease*', *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), pp. 5664–5673. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534644>.

Rogers, S. *et al.* (2016) 'PP1 initiates the dephosphorylation of MASTL, triggering mitotic exit and bistability in human cells', *Journal of Cell Science*, 129(7), pp. 1340–1354. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.179754>.

Ruiz, E.J., Hunt, T. and Nebreda, A.R. (2008) 'Meiotic inactivation of *Xenopus* Myt1 by CDK/XRINGO, but not CDK/cyclin, via site-specific phosphorylation', *Molecular Cell*, 32(2), pp. 210–220. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.029>.

Ruiz, E.J., Vilar, M. and Nebreda, A.R. (2010) 'A Two-Step Inactivation Mechanism of Myt1 Ensures CDK1/Cyclin B Activation and Meiosis I Entry', *Current Biology*, 20(8), pp. 717–723. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.050>.

Russell, P. and Nurse, P. (1986) 'cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast', *Cell*, 45(1), pp. 145–153. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90546-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90546-5).

Russell, P. and Nurse, P. (no date) 'cdc25+ Functions as an Inducer in the Mitotic Control of Fission Yeast'.

Sadler, S.E., Bower, M.A. and Maller, J.L. (1985) 'Studies of a plasma membrane steroid receptor in *Xenopus* oocytes using the synthetic progestin RU 486', *Journal of Steroid Biochemistry*, 22(3), pp. 419–426. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90448-0](https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90448-0).

Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1981) 'Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein.', *Journal of Biological Chemistry*, 256(12), pp. 6368–6373. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69173-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69173-8).

Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1983) 'The development of competence for meiotic maturation during oogenesis in *Xenopus laevis*', *Developmental Biology*, 98(1), pp. 165–172. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90345-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90345-7).

Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1985) 'Inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase by progesterone: a novel mechanism of action', *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, 19, pp. 179–194.

Sagata, N. *et al.* (1988) 'Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes', *Nature*, 335(6190), pp. 519–525. Available at: <https://doi.org/10.1038/335519a0>.

Sagata, N. *et al.* (1989) 'The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs', *Nature*, 342(6249), pp. 512–518. Available at: <https://doi.org/10.1038/342512a0>.

Sagata, N. (1997) 'What does mos do in oocytes and somatic cells?', *BioEssays*, 19(1), pp. 13–21. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.950190105>.

Sasai, K. *et al.* (2016) 'Aurora-C Interactions with Survivin and INCENP Reveal Shared and Distinct Features Compared with Aurora-B Chromosome Passenger Protein Complex', *PLOS ONE*. Edited by D. Cimini, 11(6), p. e0157305. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157305>.

Schmerler, S. and Wessel, G.M. (2011) 'Polar bodies—more a lack of understanding than a lack of respect', *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), pp. 3–8. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.21266>.

- Schmidt, A. *et al.* (2005) 'Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity', *Genes & Development*, 19(4), pp. 502–513. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.320705>.
- Schorderet-Slatkine, S. *et al.* (1978) 'Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes: a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level', *Cell*, 15(4), pp. 1269–1275. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90052-1).
- Schorderet-Slatkine, S. and Drury, K.C. (1973) 'Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a "maturation promoting factor" in enucleated oocytes', *Cell Differentiation*, 2(4), pp. 247–254. Available at: [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(73\)90013-4](https://doi.org/10.1016/0045-6039(73)90013-4).
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. and Baulieu, E.E. (1982) 'Cyclic AMP-mediated control of meiosis: effects of progesterone, cholera toxin, and membrane-active drugs in *Xenopus laevis* oocytes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(3), pp. 850–854. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.79.3.850>.
- Shoji, S. *et al.* (2014) 'The zinc-binding region (ZBR) fragment of Emi2 can inhibit APC/C by targeting its association with the coactivator Cdc20 and UBE2C-mediated ubiquitylation', *FEBS Open Bio*, 4, pp. 689–703. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.06.010>.
- Silió, V., McAinsh, A.D. and Millar, J.B. (2015) 'KNL1-Bubs and RZZ Provide Two Separable Pathways for Checkpoint Activation at Human Kinetochores', *Developmental Cell*, 35(5), pp. 600–613. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.012>.
- Silvestre, F. *et al.* (2011) 'Role of cyclic AMP in the maturation of *Ciona intestinalis* oocytes', *Zygote (Cambridge, England)*, 19(4), pp. 365–371. Available at: <https://doi.org/10.1017/S096719941000047X>.
- Simanis, V. and Nurse, P. (1986) 'The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation', *Cell*, 45(2), pp. 261–268. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90390-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90390-9).
- Simpson-Lavy, K.J. *et al.* (2010) 'Fifteen years of APC/cyclosome: a short and impressive biography', *Biochemical Society Transactions*, 38(1), pp. 78–82. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST0380078>.
- Solomon, M.J. *et al.* (1990) 'Cyclin activation of p34cdc2', *Cell*, 63(5), pp. 1013–1024. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90504-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90504-8).
- Solomon, M.J., Harper, J.W. and Shuttleworth, J. (1993) 'CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15', *The EMBO journal*, 12(8), pp. 3133–3142. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05982.x>.
- Stetina, J.R.V. and Orr-Weaver, T.L. (2011) 'Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), p. a005553. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005553>.

- Strausfeld, U. *et al.* (1991) 'Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein', *Nature*, 351(6323), pp. 242–245. Available at: <https://doi.org/10.1038/351242a0>.
- Sudakin, V. *et al.* (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), pp. 185–197. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.6.2.185>.
- Sudakin, V., Chan, G.K. and Yen, T.J. (2001) 'Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2', *The Journal of Cell Biology*, 154(5), pp. 925–936. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200102093>.
- Sun, Q.-Y. and Schatten, H. (2006) 'Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization', *Reproduction (Cambridge, England)*, 131(2), pp. 193–205. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00847>.
- Tachibana, K. *et al.* (2000) 'c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), pp. 14301–14306. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14301>.
- Tachibana-Konwalski, K. *et al.* (2013) 'Spindle Assembly Checkpoint of Oocytes Depends on a Kinetochore Structure Determined by Cohesin in Meiosis I', *Current Biology*, 23(24), pp. 2534–2539. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.052>.
- Taieb, F.E. *et al.* (2001) 'Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes', *Current biology: CB*, 11(7), pp. 508–513. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00145-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00145-2).
- Taylor, M.A. and Smith, L.D. (1987) 'Induction of maturation in small *Xenopus laevis* oocytes', *Developmental Biology*, 121(1), pp. 111–118. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90144-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90144-8).
- Thuret, J.Y. *et al.* (1996) 'Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase', *Cell*, 86(4), pp. 565–576. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80130-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80130-0).
- Thuriaux, P., Nurse, P. and Carter, B. (1978) 'Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*', *Molecular & general genetics: MGG*, 161(2), pp. 215–220. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00274190>.
- Tian, J. (2000) *Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation*. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.250492197>.
- Van Beneden, E. (1846-1910) A. du texte (1883) *Recherches sur la maturation de l'oeuf, la fécondation et la division cellulaire / par Édouard Van Beneden,...* Available at: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k97385454> (Accessed: 14 July 2023).

Vigneron, S. *et al.* (2009) 'Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A', *The EMBO Journal*, 28(18), pp. 2786–2793. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.228>.

Vigneron, S. *et al.* (2011) 'Characterization of the mechanisms controlling Greatwall activity', *Molecular and Cellular Biology*, 31(11), pp. 2262–2275. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00753-10>.

Villeneuve, J. *et al.* (2013) 'MEK1 inactivates Myt1 to regulate Golgi membrane fragmentation and mitotic entry in mammalian cells', *The EMBO journal*, 32(1), pp. 72–85. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.329>.

Voets, E. and Wolthuis, R.M.F. (2010) 'MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(17), pp. 3591–3601. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12832>.

Voronina, E. and Wessel, G.M. (2003) 'The Regulation of Oocyte Maturation', in *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 53–110. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(03\)58003-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(03)58003-6).

Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968) 'An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle', *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), pp. 3763–3765. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)34204-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)34204-8).

Wang, J. (2004) 'Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in Xenopus oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate', *Journal of Cell Science*, 117(21), pp. 5107–5116. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.01383>.

Wang, P. *et al.* (2013) 'Cell cycle regulation of Greatwall kinase nuclear localization facilitates mitotic progression', *Journal of Cell Biology*, 202(2), pp. 277–293. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201211141>.

Wasserman, W.J. and Masui, Y. (1974) 'A Study on Gonadotropin Action in the Induction of Oocyte Maturation in *Xenopus laevis*', *Biology of Reproduction*, 11(2), pp. 133–144. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod11.2.133>.

Wasserman, W.J. and Masui, Y. (1975) 'Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes', *Experimental Cell Research*, 91(2), pp. 381–388. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(75\)90118-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(75)90118-4).

Wasserman, W.J., Richter, J.D. and Smith, L.D. (1982) 'Protein synthesis during maturation promoting factor- and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes', *Developmental Biology*, 89(1), pp. 152–158. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90303-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90303-7).

Wasserman, W.J. and Smith, L.D. (1978) 'The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown.', *Journal of Cell Biology*, 78(1), p. R15. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.78.1.R15>.

Wassmann, K. (2022) 'Separase Control and Cohesin Cleavage in Oocytes: Should I Stay or

Should I Go?', *Cells*, 11(21), p. 3399. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11213399>.

Watanabe, Y. (2012) *Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis* / *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Available at: <https://www.nature.com/articles/nrm3349> (Accessed: 15 July 2023).

Weir, J.R. *et al.* (2016) 'Insights from biochemical reconstitution into the architecture of human kinetochores', *Nature*, 537(7619), pp. 249–253. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19333>.

Welburn, J.P.I. *et al.* (2010) 'Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface', *Molecular cell*, 38(3), pp. 383–392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.034>.

Whitmire, E., Khan, B. and Coué, M. (2002) 'Cdc6 synthesis regulates replication competence in *Xenopus* oocytes', *Nature*, 419(6908), pp. 722–725. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01032>.

Williams, B.C. *et al.* (2014) 'Greatwall-phosphorylated Endosulfine is both an inhibitor and a substrate of PP2A-B55 heterotrimers', *eLife*, 3, p. e01695. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.01695>.

Wu, Q. *et al.* (2007) 'A Role for Cdc2- and PP2A-Mediated Regulation of Emi2 in the Maintenance of CSF Arrest', *Current Biology*, 17(3), pp. 213–224. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.045>.

Yamamoto, T.M. *et al.* (2011) 'Regulation of Greatwall kinase during *Xenopus* oocyte maturation', *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), pp. 2157–2164. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0008>.

Yamamoto, T.M. *et al.* (2014) 'Regulation of Greatwall kinase by protein stabilization and nuclear localization', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(22), pp. 3565–3575. Available at: <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.962942>.

Yan, K. *et al.* (2019) 'Structure of the inner kinetochore CCAN complex assembled onto a centromeric nucleosome', *Nature*, 574(7777), pp. 278–282. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1609-1>.

Yang, J. *et al.* (1999) 'Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import.', *The EMBO Journal*, 18(8), pp. 2174–2183. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2174>.

Younglai, E., Godeau, F. and Baulieu, E.-E. (1981) 'Modifications in oocyte protein synthesis induced by progesterone in *Xenopus laevis*', *FEBS Letters*, 127(2), pp. 237–240. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80213-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80213-X).

Yu, J. *et al.* (2004) 'Greatwall kinase : a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*', *Journal of Cell Biology*, 164(4), pp. 487–

492. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200310059>.

Yu, J. *et al.* (2006) 'Greatwall Kinase Participates in the Cdc2 Autoregulatory Loop in Xenopus Egg Extracts', *Molecular Cell*, 22(1), pp. 83–91. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.022>.

Zhao, Y. *et al.* (2008) 'Roles of Greatwall Kinase in the Regulation of Cdc25 Phosphatase', *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), pp. 1317–1327. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-11-1099>.

Zhu, Y. *et al.* (2003) 'Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), pp. 2231–2236. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0336132100>.