

Analyse des propriétés d'un variant d'épissage de la cycline B et caractérisation d'un de ses partenaires

Nicolas Offner

▶ **To cite this version:**

Nicolas Offner. Analyse des propriétés d'un variant d'épissage de la cycline B et caractérisation d'un de ses partenaires. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. NNT : . tel-00005661

HAL Id: tel-00005661
https://pastel.hal.science/tel-00005661

Submitted on 5 Apr 2004

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.

Institut National Agronomique Paris-Grignon

Ecole doctorale :
ABIES, Agriculture Alimentation Biologie Environnement et Santé

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement par

Nicolas OFFNER

Le 06 décembre 2002

Analyse des propriétés d'un variant d'épissage de la cycline B et caractérisation d'un de ses partenaires.

Jury :

M Jean-Claude Labbé	Rapporteur
Me Joelle Sobczak	Rapporteur
M Marc Jullien	Examinateur
Me Marie-Noëlle Simon	Examinateur
M Gérard Peaucellier	Directeur de thèse



Marthasterias glacialis.

Principales abréviations utilisées.

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
APC :	Anaphase Promoting Complex
ARN :	Acide Ribonucléique
ATP :	Adénosine Tri Phosphate
BSA :	Bovin Serum Albumin
CAK:	CDK activating kinase
CB:	Cycline B
CDK:	Cyclin dependent kinase
CRS :	Cytoplasmic Retention Signal
DMSO :	Dimethyl Sulfoxyde
DO:	Densité Optique
DOC:	Deoxycholic acid
DTT:	Di Thio Thréitol
ECL:	Enhanced Chimio Luminescent
EDTA:	Ethylène Diamine Tetra-Acétique
EGTA:	Ethylène Glycol Tetra-Acétique
FITC:	Fluorescéine Isothiocyanate
GFP:	Green Fluorescent Protein
GVBD:	Germinal Vesicule Breakdown
GST:	Glutation S transferase
GuCl:	Chlorure de Guanidine
IPTG :	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranoside
LB:	milieu de Luria-Bertani
MAPK :	Mitogenic Activated Protein Kinase
MPF :	Maturation Promoting Factor
NES:	Nuclear Export Signal
NLS:	Nuclear Localization Signal
NMD:	nonsense-mediated mRNA decay
ORF:	Open reading Frame
PAGE:	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PLK:	Polo Like Kinase
PVDF :	Poly Vinyl Di Fluoride
PEG:	Poly Ethylene Glycol
RACE :	Rapid Amplification of cDNA ends
RT-PCR :	Reverse transcription PCR
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC :	Saline Sodium Citrate
TBS :	Tris Buffered Saline
UTR :	Untranslated region
VG :	Vesicule Germinative
YPD:	milieu Yeast Peptone Dextrose
YPG :	milieu Yeast Peptone Galactose

Sommaire

1 Introduction. 7
1.1 Le contrôle du cycle cellulaire. 7
1.1.1 Les phases du cycle cellulaire mitotique. 7
1.1.2 Le contrôle du cycle cellulaire par les couples CDK-cycline. 8
1.1.3 La régulation de la transition G2-M par le MPF. 10
1.1.4 Les points de contrôle du cycle cellulaire. 12
1.1.5 Le contrôle de la méiose. 13
1.2 La cycline B. 15
1.2.1 La découverte de la cycline B. 15
1.2.2 Les différentes cyclines B. 15
1.2.3 Implications de la cycline B dans les cancers. 16
1.2.4 Régulation de la liaison entre la cycline B et Cdc2. 16
1.2.5 Régulation de la localisation de la cycline B. 19
1.2.6 Régulation de l'abondance de la cycline B. 23
1.2.7 Le rôle de l'extrémité C-terminale de la cycline B. 27
1.3 Mise en place du sujet de la thèse. 29

2 Matériel et méthodes. 30
2.1 Méthodes de biologie moléculaire. 30
2.2 Méthodes de biologie cellulaire. 34
2.3 Méthodes de biochimie. 36
2.4 Méthodes spécifiques du modèle « levure ». 40
2.5 Méthodes de double hybride. 44

3 Résultats. 46
3.1 Clonage du variant de cycline B de M. glacialis. 46
3.1.1 Clonage de la cycline B. 46
3.1.2 Recherche de l'ADNc du variant de cycline B. 47
3.1.3 Expression des messagers de la cycline B et de son variant. 49
3.1.4 Recherche de la protéine variante endogène. 50
3.2 Rôle des résidus C-terminaux de Clb2 de levure. 51
3.2.1 Mutations de Clb2 utilisées. 51
3.2.2 Complémentation de la souche Clb2-TS. 52
3.2.3 Localisation des mutants. 52
3.2.4 Examen de l'effet sur le cycle cellulaire par cytométrie en flux. 54
3.2.5 Effet sur la polarisation de la croissance cellulaire. 56
3.2.6 Test de l'interaction avec Cdc28. 57
3.3 Recherche de partenaires de la cycline B variante. 58
3.3.1 Recherche de partenaires par criblage en double hybride. 58
3.3.2 Recherche de partenaires par double hybride dirigé. 60
3.3.3 La cycline B et RLIP76. 60
3.3.4 Recherche de partenaires en chromatographie d'affinité. 62
3.4 Identification de la P15. 64
3.4.1 Clonage de la P15. 64
3.4.2 Analyse de la séquence obtenue. 65
3.4.3 Amplification de la région codante de la P15. 66
3.4.4 Ces trois formes sont-elles des gènes différents ou des allèles ? 67
3.5 Caractérisation de la P15. 70

3.5.1 Abondance des P15 *in vivo*. 70
3.5.2 Présence d'un peptide signal. 71
3.5.3 Recherche d'une phosphorylation de la P15. 71
3.5.4 Vérification de l'interaction entre P15 et Cycline B. 72
3.5.5 Importance de Cdc2 dans l'interaction entre P15 et la cycline B. 74
3.5.6 Interaction entre P15 et Cdk5. 74
3.5.7 Comportement de la P15 *in vivo*. 75
3.6 Localisation intra-cellulaire de la P15. 77
3.6.1 Micro-injection d'ARNm. 77
3.6.2 Immuno-localisation de la P15. 78
3.7 Recherche de la fonction de la P15 in vivo. 80

4 Discussion. 82
4.1 Le variant d'épissage de la cycline B. 82
4.1.1 Conservation du variant d'épissage au cours de l'évolution. 82
4.1.2 Mode d'obtention du variant de cycline B. 83
4.1.3 Existence de variants d'épissage chez d'autres cyclines 84
4.1.4 Les résidus enlevés dans le variant d'épissage. 85
4.1.5 Position des ces résidus dans la cristallographie de la cycline A. 85
4.2 Rôle possible du variant. 87
4.2.1 Implication de ce variant dans le MPF. 87
4.2.2 Localisation différentielle du variant de la cycline B. 88
4.2.3 Expression du variant d'épissage de la cycline B. 90
4.2.4 Bilan comparatif. 91
4.3 La recherche de partenaires de la cycline B. 92
4.3.1 Recherche en double hybride. 92
4.3.2 Recherche en chromatographie d'affinité. 93
4.4 Cybip ou la P15. 94
4.4.1 Le clonage de la P15. 94
4.4.2 Les propriétés de la P15. 95
4.4.3 Un rôle possible pour la P15 / Cybip. 97

5 Bibliographie. 100

6 Annexes. 110

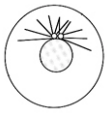
7 Cybip, a starfish cyclin B-binging protein, is imvolved in meiotic M phase exit. 110

1 Introduction.

1.1 Le contrôle du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire permet le partage égal entre les cellules filles du matériel génétique de la cellule mère. Afin d'assurer la progression harmonieuse de la division, des mécanismes de contrôle existent tout au long du cycle. Ces mécanismes ainsi que ceux directement liés à la progression du cycle cellulaire sont maintenant bien compris. Consacrant l'importance de ce domaine de recherche, le prix Nobel de médecine 2001 a été attribué à L.Hartwell, T.Hunt, P.Nurse pour leur travaux sur le contrôle du cycle cellulaire.

1.1.1 Les phases du cycle cellulaire mitotique.



- L'interphase consiste en une phase de duplication de l'ADN, la phase S encadrée par deux phases « Gap » G1 et G2 de croissance cellulaire.

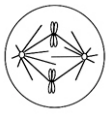
La phase de division en elle même (phase M) est subdivisée en plusieurs phases :



- La prophase est la phase de condensation de la chromatine, de la fragmentation de l'enveloppe nucléaire et du début de formation du fuseau de division.



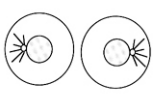
- Pendant la prométaphase, les chromosomes captent les microtubules du fuseau au niveau des kinétochores et commencent leur migration.



- La métaphase est la période pendant laquelle les chromosomes sont le plus condensés, ils sont alors alignés en plaque équatoriale.



- Lors de l'anaphase, les kinetochores se séparent et les chromatides migrent vers les pôles du fuseau.



- Pendant la télophase, les chromatides se regroupent aux pôles du fuseau, qui disparaît alors que l'enveloppe nucléaire se reforme. La cytodiérèse s'achève.

Des cycles cellulaires particuliers existent. La méiose permet d'obtenir des gamètes haploïdes à partir de cellules diploïdes. Pour cela deux phases M se succèdent sans réplication de l'ADN entre elles, la première division sépare les chromosomes homologues et la seconde division sépare les chromatides sœurs. Les cycles cellulaires d'embryogenèse précoce des métazoaires sont eux aussi particuliers, phases S et M s'y succèdent sans phase G intermédiaire. Pendant ces premiers cycles, qui sont plus ou moins nombreux selon les espèces, il n'y a pas de transcription, les synthèses protéiques se font par traduction de messagers d'origine maternelle.

1.1.2 Le contrôle du cycle cellulaire par les couples CDK-cycline.

Les études de génétique des levures ont permis d'identifier une kinase, appelée Cdc2, qui est indispensable au déroulement correct du cycle cellulaire (Hartwell, Culotti et al. 1974), (Nurse and Thuriaux 1980). Y.Masui avait mis en évidence un facteur cytoplasmique induisant la maturation méiotique des ovocytes (Masui and Markert, 1971). Par la suite ce facteur, appelé aussi MPF (Maturation Promoting Factor), a été identifié au dimère Cdc2-cycline B (Labbe, Capony et al. 1989). Cdc2 est la sous-unité catalytique du complexe, alors que la cycline B en est la sous-unité régulatrice. Les enzymes de la famille de Cdc2, qui ont une activité sérine-tréonine kinase, ont alors été appelées Cdk pour Cyclin Dependent Kinase.

Ultérieurement, plusieurs autres Cdk ont étés identifiées, notamment par PCR en utilisant des amorces dégénérées à partir de la séquence de Cdk1 (Meyerson, Enders et al. 1992). Actuellement, il apparaît que toutes les étapes clefs du cycle cellulaire sont contrôlées par des couples cycline-Cdk et que ce type de régulation du cycle cellulaire est conservé chez tous les eucaryotes (Nurse 1990).

Le cas des levures est particulier, en effet une unique Cdk contrôle la progression du cycle cellulaire (Cdc28 chez *S.cerevisiae*). Cette Cdk est associée à deux familles de cyclines, les cyclines de phase G1 (Cln) et celles de phase G2 (Clb), il y a respectivement 3 Cln et 6 Clb chez *S.cerevisiae*, Clb 1 et 2 étant les cyclines de la transition G2-M, pour revue voir (Andrews and Measday 1998).

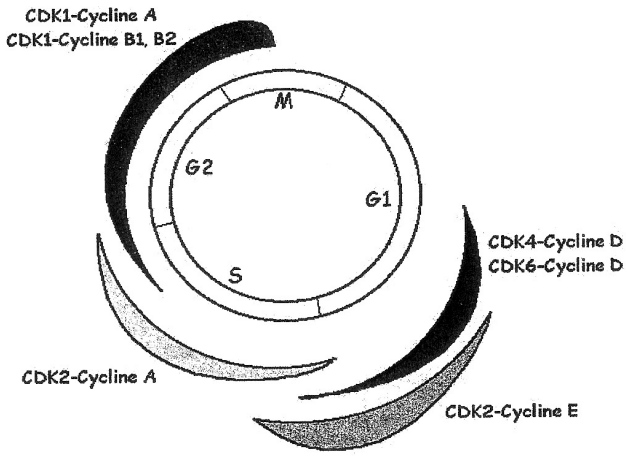


Figure 1 : contrôle du cycle cellulaire par les couples Cdk-cycline. Chaque couple contrôle une phase précise du cycle cellulaire.

Cdk	Cycline associée	Rôle	référence
Cdk1 (=Cdc2)	Cycline B Cycline A	Cycle cellulaire	(Labbe, Capony et al. 1989) (Draetta, Luca et al. 1989)
Cdk2	Cycline E Cycline A	Cycle cellulaire	(Dulic, Lees et al. 1992) (Tsai, Harlow et al. 1991)
Cdk3	-	Cycle cellulaire	(Braun, Holzl et al. 1998)
Cdk4	Cycline D	Cycle cellulaire	(Matsushime, Ewen et al. 1992)
Cdk5	-	Différenciation nerveuse	(Tang and Wang 1996)
Cdk6	Cycline D	Cycle cellulaire	(Meyerson and Harlow 1994)
Cdk7	Cycline H	CAK	(Fisher and Morgan 1994)
Cdk8	Cycline C	Régulation de la transcription	(Rickert, Seghezzi et al. 1996)
Cdk9	Cycline T Cycline K	Régulation de la transcription	(Wei, Garber et al. 1998) (Fu, Peng et al. 1999)
Cdk10	-	-	(Sergere, Thuret et al. 2000)
-	Cycline F	Localisation de la cycline B	(Bai, Richman et al. 1994)
-	Cycline G	Réparation de l'ADN	(Tamura, Kanaoka et al. 1993)
-	Cycline I	-	(Nakamura, Sanokawa et al. 1995)
-	Cycline J	-	(Kolonin and Finley 2000)
-	Cycline L	Régulation de l'épissage	(Dickinson, Edgar et al. 2002)

Figure 2 : Tableau récapitulatif des différentes Cdk et cyclines de métazoaires et de leur rôle.

1.1.3La régulation de la transition G2-M par le MPF.

La transition G2/M est contrôlée par le MPF, dimère Cdc2-cycline B dont l'activité est régulée de façon complexe (pour revue voir (Morgan 1995), (Smits and Medema 2001)). Le MPF a de nombreux substrats parmi lesquels l'histone H1, les lamines de la membrane nucléaire, ainsi que des protéines liées au microtubules (MAPs)…. (pour revue voir (Nigg 1991)). Le site consensus de phosphorylation par le MPF est K/R-S/T-P-X-K/R.

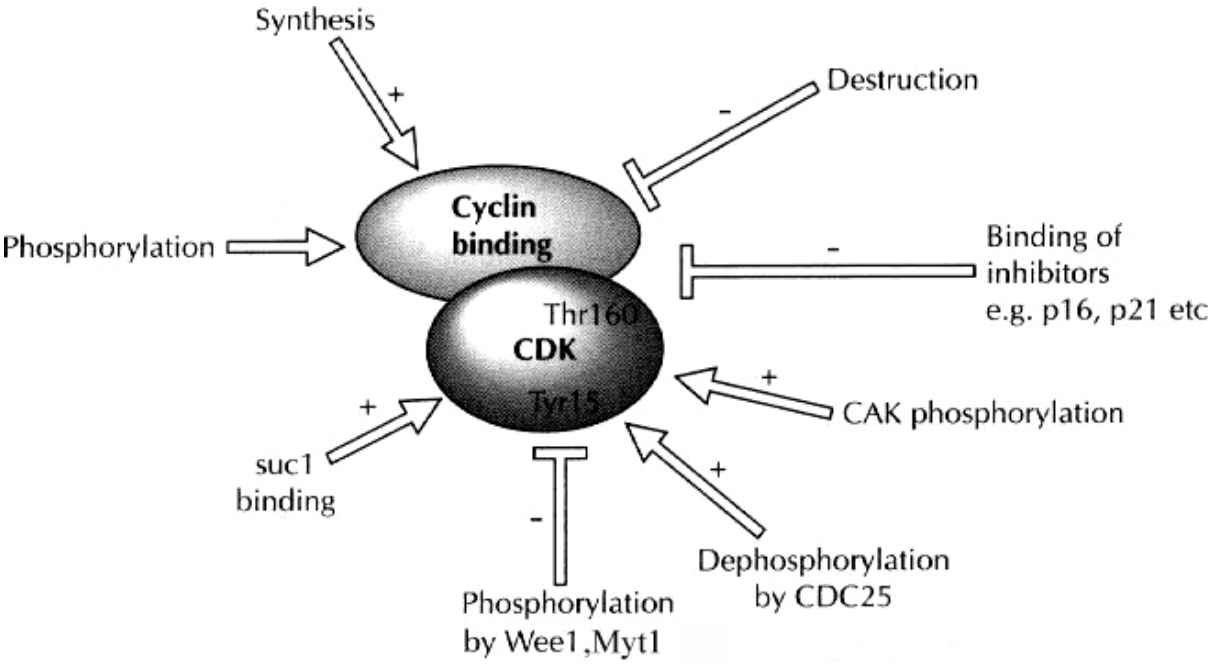


Figure 3 : les principales régulations portant sur le MPF (origine :(Lees 1995)).

L'association entre Cdc2 et la cycline B est le premier mode de régulation du MPF, Cdc2 monomérique n'ayant pas d'activité kinase. La liaison entre la cycline et sa Cdk modifie considérablement la conformation de cette dernière, comme l'a montré la cristallisation du complexe cycline A-Cdk2 (Jeffrey, Russo et al. 1995). Cette liaison se fait essentiellement au niveau du motif PSTAIRE, bien conservé et caractéristique des Cdk. Elle induit des changements au niveau du site catalytique et de fixation de l'ATP, ainsi qu'un changement de position de la boucle T qui bloque le site catalytique sur la kinase monomérique.

Récemment une protéine permettant l'activation de Cdc2 en l'absence de la cycline B et de phosphorylation de la thréonine 161 a été identifiée. Cette protéine appelée Ringo ou Speedy est indispensable au bon déroulement de la méiose chez le xénope (Ferby, Blazquez et al. 1999), (Karaiskou, Perez et al. 2001).

L'activité de Cdc2 est également régulée par phosphorylation. La phosphorylation de la thréonine 161, située sur la boucle T de Cdc2 est activatrice et réalisée par la CAK (Cdk activating kinase, complexe formé de : Cdk7-cyclinH-Mat1, (Fisher and Morgan 1994)). Cette phosphorylation semble liée à la liaison de Cdc2 à la cycline B. Pendant l'interphase la T161 est déphosphorylée par KAP (Cdk associated phosphatase, (Hannon, Casso et al. 1994)).

D'autres phosphorylations sont inhibitrices : en phase G2 le MPF est inactivé par la phosphorylation des thréonine 14 et tyrosine 15 situées au niveau du site de liaison à l'ATP de Cdc2. Les kinases Myt1 et Wee1 sont respectivement responsables de ces phosphorylations permettant ainsi l'accumulation de complexes Cdc2-cycline B inactifs (McGowan and Russell 1993), (Mueller, Coleman et al. 1995). Le MPF peut ensuite être activé par Cdc25 qui déphosphoryle la T14 et la Y15 (Russell and Nurse 1986), (Strausfeld, Labbe et al. 1991)). Toutes ces protéines sont régulées par phosphorylation, notemment par le MPF ce qui crée ainsi des boucles de rétrocontrôle positif.

Une autre cycline s'associe également à Cdc2 : la cycline A. L'abondance de cette cycline varie au cours du cycle cellulaire. Son rôle en association avec Cdk2 en phase S dans l'initiation de la réplication de l'ADN est bien établi (Desdouets, Sobczak-Thepot et al. 1995). Par contre son action associée à Cdc2 au cours de la phase M est mal connue (pour revue voir :(Yamb, Fung et al. 2002)).

Les dimères cycline-Cdk peuvent également être inhibés par de petites molécules, les CKI. Ils sont surtout connus pour inhiber les Cdk des phases G1 et S. Ces inhibiteurs sont impliqués dans certains points de contrôle ainsi p21 inhibe la phosphorylation de la thréonine 161 de Cdc2 et donc son activation en phase G2, en réponse au dommages subis par l'ADN (Smits, Klompmaker et al. 2000). Paradoxalement, dans certain cas, ces CKI peuvent être des activateurs des Cdk (Sugitomo, Martin et al. 2002).

P13Suc1 est une petite protéine, d'abord identifiée chez la levure comme pouvant sauver certaines mutations de Cdc2 (Brizuela, Draetta et al. 1987). Cette protéine appelée aussi Cks1 s'associe à Cdc2. Suc1 semble servir d'adaptateur entre la kinase et ses substrats ou régulateurs, elle facilite notamment la phosphorylation par le MPF de Cdc25, wee1 et Myt1, favorisant ainsi l'auto-amplification du MPF ((Patra, Wang et al. 1999). Suc1 a

également un rôle dans le contrôle de la dégradation de la cycline B (Patra, Wang et al. 1999), pour une revue sur les fonctions possibles de Suc1,voir (Pines 1996))

1.1.4Les points de contrôle du cycle cellulaire.

Afin d'assurer la bonne progression du cycle cellulaire, plusieurs points de contrôle existent, à leur niveau la cellule vérifie qu'elle peut passer correctement à l'étape suivante du cycle, sinon celui ci est bloqué. Cette notion de point de contrôle a été introduite par L.Hartwell (Hartwell and Weinert 1989).

Le premier point de contrôle se situe avant la phase S et vérifie que la cellule est capable d'effectuer la division. A la fin de la phase S la cellule vérifie, par un second point de contrôle, que la réplication est complète et que l'ADN n'est pas endommagé. Le dernier point de contrôle se trouve en métaphase et la cellule vérifie que le fuseau de division est correct et que les chromosomes sont bien alignés en plaque métaphasique. (pour revue : (Gardner and Burke 2000)).

Tous ces points de contrôle agissent sur l'activité des couples cyclines-Cdk, par des mécanismes variés : synthèse d'inhibiteurs (Smits, Klompmaker et al. 2000), phosphorylation des régulateurs des Cdk (Furnari, Rhind et al. 1997), blocage de la dégradation de la cycline B (Yudkovsky, Shteinberg et al. 2000), contrôle de sa localisation (Toyoshima, Moriguchi et al. 1998), action sur l'inhibiteur de l'anaphase Pds1 (Yamamoto, Guacci et al. 1996)…

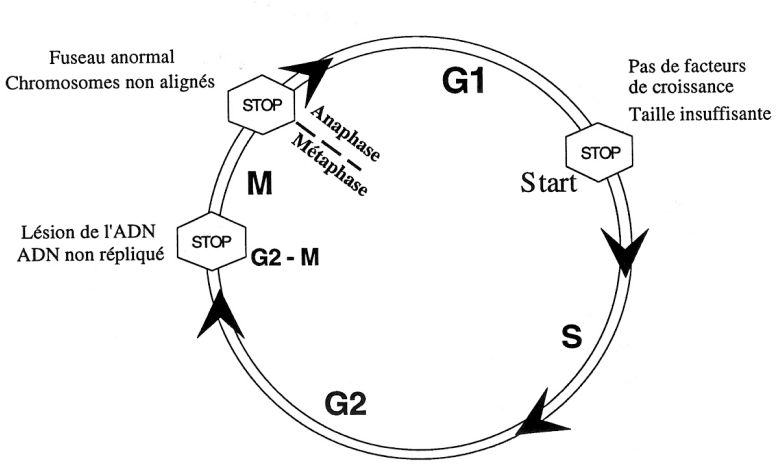


Figure 4 : les principaux points de contrôle du cycle cellulaire mitotique.

1.1.5Le contrôle de la méiose.

Chez l'étoile de mer, la maturation des ovocytes bloqués en prophase de méiose I (vésicule germinative), est induite par une hormone produite par les cellules folliculaires : la 1-methyl adénine (Kanatani, Shirai et al. 1969). La voie de transmission de ce signal induisant la maturation est schématisée en figure 5. Il semble que ce signal soit transmis par un récepteur à petite protéine G héterotrimérique encore non identifié (Chiba and Hoshi 1995). Ce signal entraîne l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K), (Sadler and Ruderman 1998) puis celle de la kinase Akt (PKB) qui inhibe par phosphorylation Myt1 (il est possible qu'Akt active également Cdc25). L'inhibition du pré-MPF présent dans l'ovocyte est ainsi levée (Okumura, Fukuhara et al. 2002). La kinase Akt a également un effet d'induction de la maturation dans les ovocytes de xénope (Andersen, Roth et al. 1998) dans ce cas le mécanisme d'acitvation du MPF par Akt n'est pas connu.

Chez le xénope, la protéine Ringo est synthétisée pendant la maturation des ovocytes et l'injection d'ARN antisens de Ringo bloque la maturation. Cette protéine pourrait donc être impliquée dans l'initiation de l'activation du MPF.

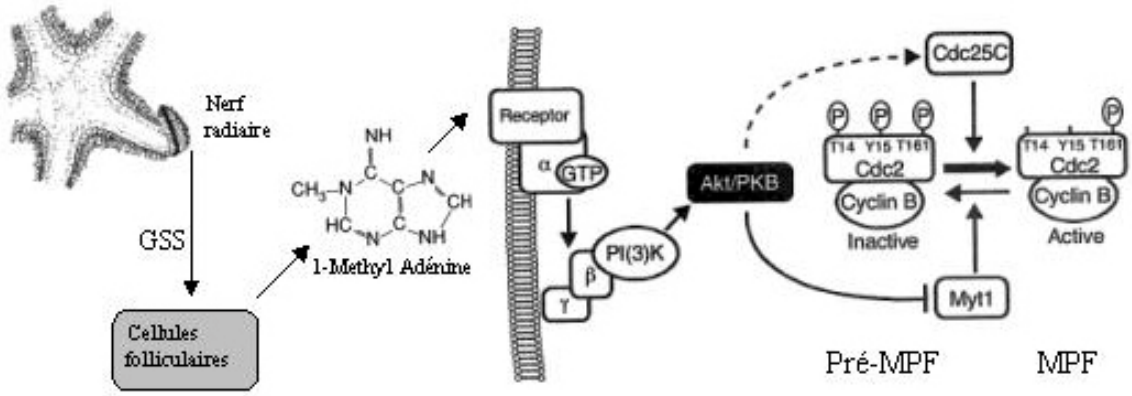


Figure 5 : mécanisme probable de l'activation du MPF par la 1-Methyl adénine chez l'étoile de mer, adapté de :(Okumura, Fukuhara et al. 2002). GSS : gonad stimulating substance, produite par le nerf radiaire.

Lors de la maturation méiotique seules quelques protéines sont synthétisées : parmi elles la cycline B et le proto-oncogène Mos. Mos est à l'origine de l'activation de la voie des MAPK, qui participe à la maturation méiotique des ovocytes d'étoile de mer (Abrieu, Doree

et al. 1997). L'utilisation de morpholinos dirigés contre Mos a permis d'étudier son rôle dans la méiose chez le xénope (Dupre, Jessus et al. 2002). Contrairement à ce qui avait été supposé Mos n'est pas indispensable à l'entrée en méiose, Myt1 pouvant être inhibée par d'autres voies que celle des MAPK.

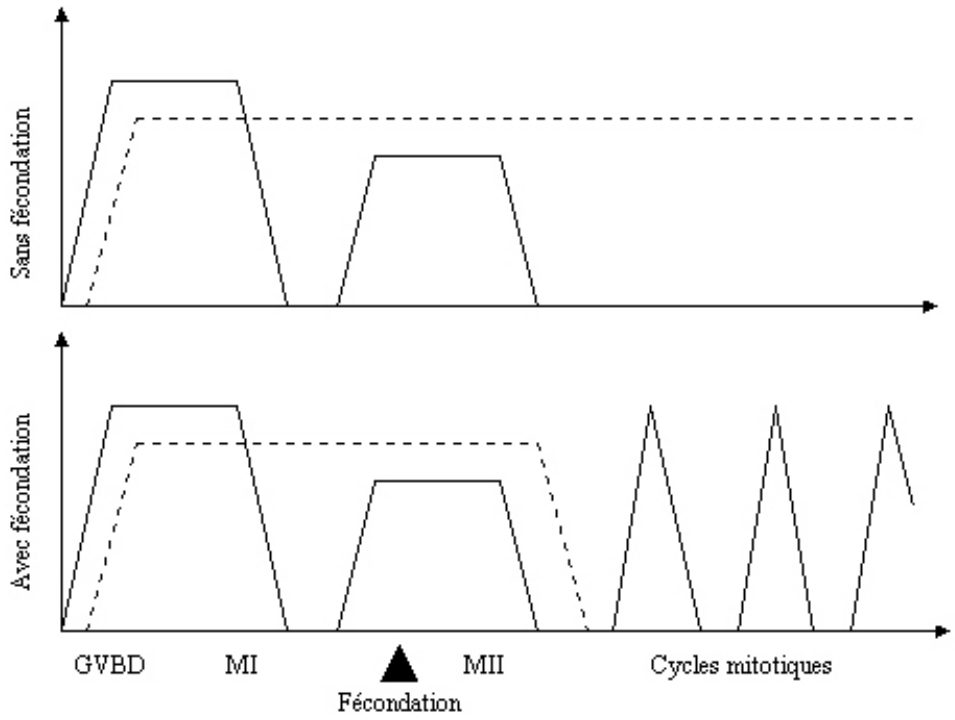


Figure 6 : Activités MPF (trait plein) et MAPK (pointillés) au cours de la maturation méiotique de l'étoile de mer. (GVBD : rupture de la membrane nucléaire, Germinal Vesicule Break Down. MI métaphase de méiose I, MII métaphase de méiose II).

Par contre Mos et donc l'activité MAPK, est indispensable à l'inhibition de la phase S *via* la réactivation rapide de Cdc2 entre les deux divisions de méiose (Furuno, Nishizawa et al. 1994), l'inhibition de Mos entraînant la reprise de cycles de type mitotiques après la méiose 1. La synthèse de cycline B est également indispensable à l'inhibition de la phase S chez l'étoile de mer (Picard, Galas et al. 1996). Il semble de plus que l'absence de Wee1 pendant la méiose soit importante pour son déroulement correct (Nakajo, Yoshitome et al. 2000).

A la sortie de méiose les ovocytes d'étoile de mer sont bloqués en interphase et ne continuent à cycler que s'il y a fécondation. Ce blocage permet d'éviter que l'ovocyte n'effectue un développement parthénogénétique et est lié au maintient de l'activité MAPK (Abrieu, Fisher et al. 1997). Pour revue voir (Nebreda and Ferby 2000), (Abrieu, Doree et al. 2001), (Karaiskou, Dupre et al. 2001).

1.2 La cycline B.

1.2.1 La découverte de la cycline B.

La cycline a d'abord été identifiée chez l'oursin comme une protéine dont l'abondance est liée au cycle cellulaire, avec un pic d'abondance avant chaque division (Evans, Rosenthal et al. 1983). Plusieurs exprériences ont montré que cette protéine est essentielle pour le déroulement du cycle cellulaire. L'injection d'ARN anti-sens de la cycline B bloque le cycle cellulaire (Minshull, Blow et al. 1989), alors que celle des ARNm codant cette protéine conduit à la maturation méiotique des ovocytes de xénope (Pines and Hunt 1987).

Le lien formel entre la cycline B et le MPF a été établi par la purification à homogénéité du MPF qui a permis de prouver que ce facteur est composé de deux sous-unités de façon stœchiométrique. L'une est catalytique : Cdc2 et l'autre est activatrice : la cycline B (Labbe, Capony et al. 1989). Pour un historique de cette découverte voir (Doree and Hunt 2002).

1.2.2 Les différentes cyclines B.

Chez les vertébrés deux types de cycline B coexistent suite à une duplication du gène et leurs propriétés diffèrent. En effet chez la souris le « knock-out » de la cycline B1 est léthal alors que celui de la cycline B2 induit seulement un retard de croissance des souris (Brandeis, Rosewell et al. 1998). Chez l'humain, la cycline B1 est localisée sur l'appareil mitotique alors que la cycline B2 est restreinte à l'appareil de Golgi (Jackman, Firth et al. 1995). Cette différence de localisation induit un ciblage vers des substrats différents du MPF, donc un rôle différent pour les cyclines B1 et B2. Ce ciblage peut être inversé si l'on échange la zone N-terminale des deux cyclines (Draviam, Orrechia et al. 2001). Le cas est différent chez la grenouille où la cycline B2 a un rôle important dans la mise en place du fuseau de division (Kotani, Yoshida et al. 2001), (Yoshitome, Furuno et al. 1998). Chez le xénope, c'est la cycline B2 associée à Cdc2 qui forme le pré-MPF.

Une troisième cycline B existe, identifiée de la drosophile à l'homme (Gallant and Nigg 1994), sa séquence présente chez les mamifères une grande insertion dans la partie N-terminale, par rapport aux autres cyclines. Cette cycline B3 serait peut-être impliquée dans le développement de la lignée germinale, comme en témoigne la restriction de son expression au testicule chez l'home (Lozano, Perret et al. 2002).

1.2.3 Implications de la cycline B dans les cancers.

Contrairement aux cyclines D ou E, les cyclines mitotiques ne sont pas des oncogènes avérés. Par contre il a été montré l'intégration du virus de l'hépatite B dans le gène de la cycline A dans des tumeurs du foie induites par ce virus (Wang, Chenivesse et al. 1990). La dérégulation de l'expression de la cycline B1 dans les tumeurs est fréquente, elle y est généralement surexprimée ou exprimée par anticipation (Keyomarsi and Pardee 1993). Cette dérégulation pourrait jouer un rôle dans la survie de la tumeur et le maintien de l'état de prolifération. Cette dérégulation pourrait être utilisée comme pronostic de certains cancers (Takeno, Noguchi et al. 2002).

1.2.4 Régulation de la liaison entre la cycline B et Cdc2.

La liaison cycline-Cdk a été d'abord étudiée dans le complexe entre la cycline A et Cdk2, les résultats ont ensuite été élargis aux autre complexes cycline-Cdk. Des expériences de mutagénèse, de délétions de parties de la cycline A ainsi que des analyse d'homologies de séquences ont permis de définir un domaine d'une centaine d'acides aminés appelé Cyclin Box, qui est indispensable pour la liaison de la cycline aux Cdk (Kobayashi, Stewart et al. 1992), (Nugent, Alfa et al. 1991).

La cristallisation de la cycline A ainsi que de son complexe avec Cdk2 apporte de nombreux enseignements sur leur interaction. La structure cristalline de la cycline A montre son organisation en deux groupes de 5 α-hélices hydrophobes, séparées par de courtes

séquences, le tout encadré par deux α-hélices terminales (Brown, Noble et al. 1995). Un tel motif de 5 α-hélices se trouve dans d'autres molécules que les cyclines : pRB, TFIIB, ce motif appelé Cyclin-Box-Fold serait impliqué dans les interactions entre protéines (Noble, Endicott et al. 1997). L'association entre la cycline A et Cdk2 implique le premier de ces motifs et induit d'importants changements de conformation de Cdk2 mais pas de la cycline (Radzio-Andzelm, Lew et al. 1995).

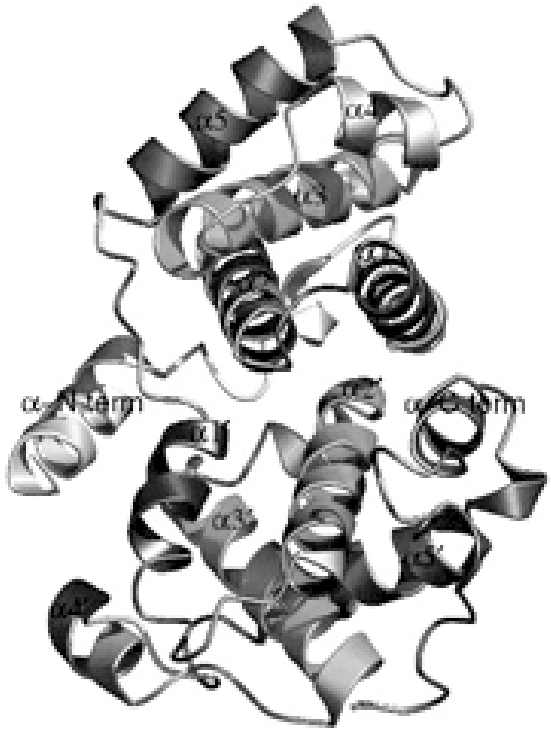


Figure 7 : Structure cristalline de la cycline A délétée de 171 résidus N-terninaux, origine : (Brown, Noble et al. 1995).

L'association entre Cdc2 et la cycline B est favorisée par la phosphorylation de la thréonine 161. En effet Cdc2 traduit *in-vitro* et donc non phosphorylé se lie peu à la cycline B. lorsque ce Cdc2 est phosphorylé par incubation avec un extrait d'œuf de xénope, son affinité pour la cycline B augmente fortement. Une mutation de la thréonine 161 abolit cette augmentation (Ducommun, Brambilla et al. 1991).

La dissociation du complexe cycline B-Cdc2 est liée à la machinerie de dégradation de la cycline B. l'ubiquitination de la cycline B n'est pas suffisante pour dissocier le complexe. La reconnaissance de la cycline B par le protéasome induit la séparation du complexe, avant que la cycline ne soit dégradée, peut être par le dépliement de la cycline lié à l'activité chaperone du protéasome (Nishiyama, Tachibana et al. 2000).

Le début de la Cyclin Box comporte un motif impliqué dans le contrôle de la phosphorylation de Cdc2. Ce motif, appelé P-Box, est nécessaire aux déphosphorylations activatrices de Cdc2 par Cdc25. Si l'on peut trouver Cdc25 associé au complexe cycline B-Cdc2 (Jessus and Beach 1992), il n'est pas sûr qu'il y ait une interaction directe avec la cycline. Une cycline B mutante au niveau de la P-Box bloque le cycle cellulaire en empêchant la déphosphorylation de Cdc2 par Cdc25, Cdc25 restant alors sous sa forme inactive (Zheng and Ruderman 1993).

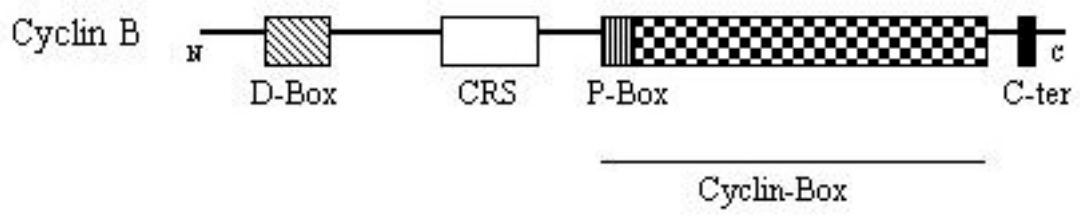


Figure 8 : Position schématique de la Cyclin Box et des principaux domaines sur la cycline B d'étoile de mer (D-Box : boite de dégradation, CRS :signal de localisation cytoplasmique, P-Box : boite nécessaire à l'action de Cdc25).

1.2.5Régulation de la localisation de la cycline B.

Description de la localisation de la cycline B dans les ovocytes d'étoile de mer.

La localisation intracellulaire de la cycline B varie au cours du cycle cellulaire, ses différentes localisations sont montrées en figure 9. Pendant la phase G2, elle est exclusivement cytoplasmique. Lors de la maturation des ovocytes, la cycline B se localise progressivement dans la vésicule germinative et une partie de la cycline s'associe aux chromosomes et aux asters. Après la rupture de l'enveloppe nucléaire la cycline est associée avec l'ensemble du fuseau et des chromosomes (Ookata, Hisanaga et al. 1992),(Ookata, Hisanaga et al. 1993).

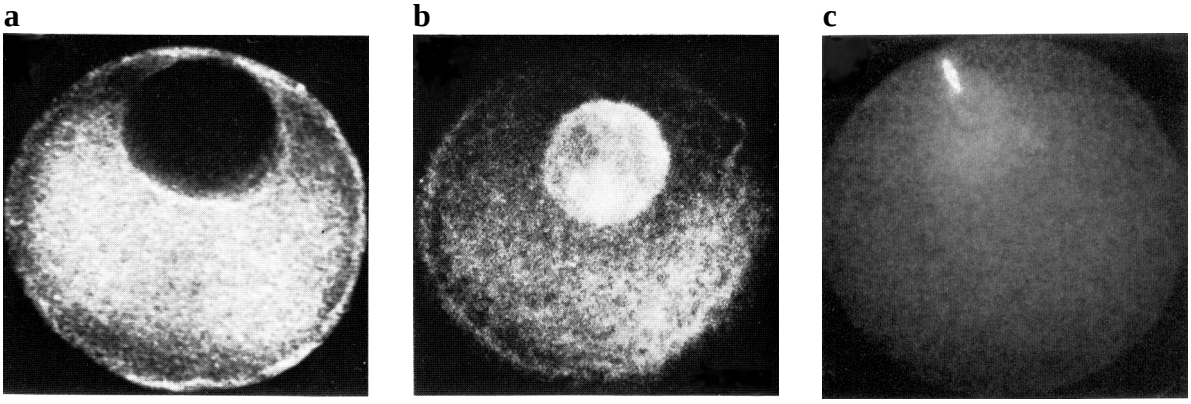


Figure 9 : Localisation de la cycline B lors de la maturation des ovocytes d'étoile de mer. **a** : ovocyte bloqué en phase G2 (vésicule germinative). **b** : ovocyte en fin de prophase. **c** : ovocyte en métaphase de méiose I. (**a** et **b** : origine (Ookata, Hisanaga et al. 1992), **c** : origine (Ookata, Hisanaga et al. 1993)).

Les mécanismes classiques de transport nucléaire.

L'ensemble du trafic nucléo-cytoplasmique passe par les pores nucléaires. Si les petites molécules peuvent diffuser à travers ces pores, la plupart des protéines les traversent par un mécanisme actif faisant intervenir des protéines de transport. Ces protéines, de la famille des importines, reconnaissent des signaux d'importation (NLS) ou d'exportation (NES). Ces transports sont contrôlés par la GTPase Ran via le gradient Ran-GTP / Ran-GDP, qui existe entre le cytoplasme et le noyau. Ainsi une protéine comportant un NLS est

reconnue par l'importine-α qui associée à l'importine-β transporte le complexe dans le noyau. Dans le noyau Ran-GTP dissocie le complexe, libérant la protéine transportée. Les deux importines sont alors recyclées vers le cytoplasme associées à Ran, cytoplasme où Ran-GTP est hydrolysé en Ran-GDP et les importines libérées (pour revue : (Quimby and Corbett 2001), (Kuersten, Ohno et al. 2001)).

Contrôle des transferts nucléaires de Cycline B.

Afin d'examiner les causes de la différence de localisation entre les cyclines A et B1 humaines, Pines et Hunter ont réalisé des chimères entre ces deux cyclines. Ces expériences ont permis de mettre en évidence un motif conditionnant la rétention cytoplasmique de la cycline B, appelé CRS (Pines and Hunter 1994). Ce CRS se trouve dans le N-terminal de la cycline B. Des expériences d'injection de fusion cycline B-GFP dans des noyaux de cellules interphasiques ont montré que la cycline B est exportée du noyau, cette exportation est liée à la présence dans le CRS d'un signal d'exportation nucléaire : NES (Hagting, Karlsson et al. 1998).

Cette exportation du noyau est inhibée par la leptomycine B, un inhibiteur d'un facteur d'exportation nucléaire connu appelé CRM1. L'interaction directe entre le CRS de la cycline B et CRM1 a été confirmée par GST-pull down (Yang, Bardes et al. 1998).

Lors de la prophase une relocalisation de la cycline B vers le noyau s'opère. Pour déterminer comment se fait cette importation de la cycline B vers le noyau, Kong & al ont réalisé un criblage en double-hybride chez l'humain, en utilisant comme appât le CRS de la cycline B muté au niveau des sérines, pour qu'il mime un CRS phosphorylé (Kong, Barnes et al. 2000). Ce criblage a permis de montrer une interaction avec la cycline F, qui possède un signal de localisation nucléaire (NLS) actif, de plus la cycline F s'accumule dans la cellule en phase G2 (Bai, Richman et al. 1994) et co-localise avec la cycline B. La cycline F est dégradée en phase M par une voie différente de la cycline B et qui implique des séquences PEST C-terminales (Fung, Siu et al. 2002). Il semble donc que la cycline B est importée dans le noyau associée à la cycline F, profitant ainsi de son NLS. Actuellement la cycline F d'étoile de mer n'est pas connue.

Un mode d'importation vers le noyau constitutif et ne dépendant pas du CRS a été mis en évidence par l'association de la cycline B avec la partie N-terminale de l'importine-β. Cette interaction diffère du mode d'action classique de cette molécule connue pour former un dimère avec l'importine-α, qui n'est paradoxalement pas impliquée dans le transport de la

cycline B. Ce mode de transport est curieusement indépendant de la GTPase Ran (Moore, Yang et al. 1999), (Takizawa, Weis et al. 1999).

L'état de phosphorylation du CRS de la cycline B contrôle son changement de localisation à la transition G2/M. En effet le CRS phosphorylé ne lie pas CRM1 (Yang, Song et al. 2001), la cycline B n'est alors plus exportée du noyau. En prophase, une cycline B non phosphorylée entre moins vite dans le noyau qu'une cycline B phosphorylée (Hagting, Jackman et al. 1999). Cette phosphorylation des résidus sérine du CRS à la transition G2/M, est due en partie à la Polo-like-Kinase (PLK)(Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2001), ainsi qu'au MPF. Cette phosphorylation de la cycline B semble aussi avoir un rôle dans l'activation de Cdc25 et donc dans l'initiation de l'activation du MPF (Peter, Le Peuch et al. 2002). La PLK est elle même régulée par phosphorylation, elle est activée par la protéine kinase A (PKA) chez le xénope, mais est également phosphorylée par le MPF (Kelm, Wind et al. 2002). Les différents mécanismes de transfert de la cycline B entre le noyau et le cytoplasme sont schématisés en figure 10.

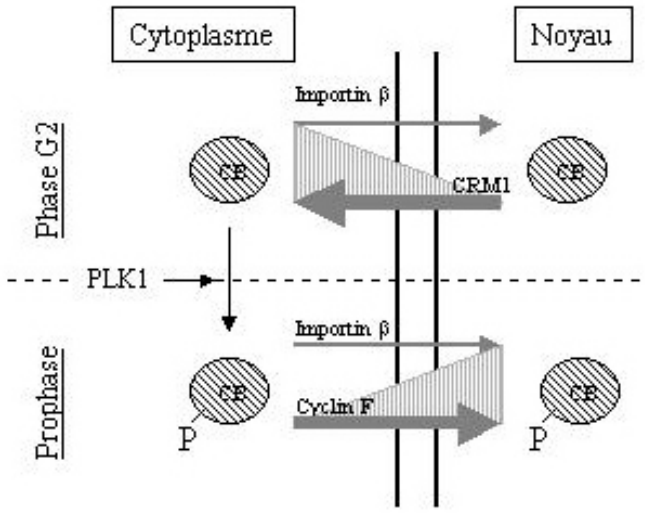


Figure 10 : Schémas de principe du contrôle de la localisation nucléaire de la cycline B (PLK : polo like kinase).

Localisation de la cycline B au niveau du fuseau de division.

Après la rupture de l'enveloppe nucléaire, on observe la cycline B au niveau des chromosomes, des fibres du fuseau et des centrosomes (Ookata, Hisanaga et al. 1993). Cette interaction avec les microtubules est liée aux MAPs (microtubules associated proteins), une interaction directe a été montrée entre la cycline B et MAP4 (Ookata, Hisanaga et al. 1995). De plus la phosphorylation de MAP4 par le MPF modifie son activité de stabilisation des

microtubules (Chang, Gruber et al. 2001). D'autres MAPs jouent un rôle ; chez le xénope l'interaction entre la cycline B et XMAP215 a été montrée (Charrasse, Lorca et al. 2000) et MAP2 a été montré interagissant avec Cdc2 (Fellous, Kubelka et al. 1994).

Cette régulation de la localisation de la cycline B est essentielle, elle permet au MPF d'être actif à l'endroit où il doit phosphoryler ses substrats. En effet l'expression d'une cycline B dont la localisation est altérée modifie dramatiquement le cycle cellulaire (Li, Meyer et al. 1997). La balance entre les flux entrant et sortant de cycline B du noyau est donc finement contrôlée. (pour revue voir (Takizawa and Morgan 2000),(Yang and Kornbluth 1999)).

1.2.6Régulation de l'abondance de la cycline B.

Lors de sa découverte, la cycline a été définie comme une protéine dont l'abondance est régulée au cours du cycle cellulaire (Evans, Rosenthal et al. 1983). Elle est synthétisée à partir de la phase S, et est dégradée à chaque phase M. La cycline B est la sous-unité régulatrice du MPF, sa présence est indispensable à son activité. Dans la cellule, l'autre sous-unité, Cdc2 est présente de façon constante quelle que soit la phase du cycle cellulaire (Riabowol, Draetta et al. 1989). La période pendant laquelle la cycline est présente contrôle donc la période pendant laquelle le MPF peut être actif (Murray and Kirschner 1989).

Régulation de la synthèse de la cycline B dans les ovocytes.

Dans les ovocytes ainsi que pendant les premiers cycles d'embryogenèse, il n'y a pas de transcription, les protéines sont synthétisées à partir d'un stock d'ARN maternels. La régulation de la synthèse de cycline B est donc une régulation traductionelle. Cette régulation a été essentiellement étudiée dans les ovocytes de xénope. Murray et Kirshner ont montré l'importance de la traduction de la cycline B. Un traitement à la Rnase d'extraits d'œufs de xénope bloque le cycle cellulaire, l'addition d'inhibiteur de Rnase et de messager de cycline B dans ces extraits restaure le cycle cellulaire (Murray, Solomon et al. 1989).

Au niveau de la partie 3' non traduite de l'ARNm de la cycline B se trouvent plusieurs séquences régulatrices :

- Le CPE (cytoplasmic polyadenylation element : dont la séquence consensus est UUUUUAU), est reconnu par la protéine CPEB (CPE binding protein) (Stebbins-Boaz, Hake et al. 1996).
- L'hexa-nucléotide (AAUAAA) est lui reconnu par le CPSF (cytoplasmic polyadenylation specific factor).

Dans les ovocytes immatures, CPEB est lié à la Maskin qui séquestre le facteur d'initiation de la traduction EIF4E, empêchant son association à EIF4G. ce qui entraîne la répression de la traduction des ARN messagers de la cycline B (Stebbins-Boaz, Cao et al. 1999), (Cao and Richter 2002).

Lors de la maturation, CPEB est phosphorylée par Aurora (appelée aussi Eg2), (Mendez, Hake et al. 2000), (Groisman, Jung et al. 2002). Cette phosphorylation induit le recrutement des protéines responsables de l'élongation de la queue poly A de l'ARNm, ainsi que la libération d'EIF4E par la Maskin, ce qui autorise la fixation de la sous unité 40s du ribosome et donc l'initiation de la traduction du messager de la cycline B (pour revue voir (Mendez and Richter 2001)). Ce processus est schématisé en figure 11.

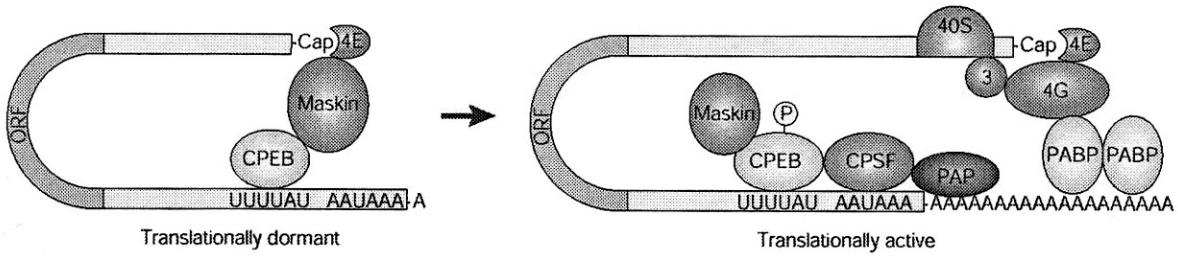


Figure 11 : Principe de régulation de la traduction des ARM messagers de la cycline B lors de la maturation méiotique du xénope. (PAP : poly A polymérase, PABP : poly A binding protein, CPSF : facteur spécifique de polyadenylation cytoplasmique, CPEB : protéine de liaison au CPE, 4E et4G: facteurs d'initiation de la traduction Eif4E et Eif4G). Origine : (Mendez and Richter 2001).

Un autre facteur interagissant avec le messager de cycline B est Pumilio, qui a été montré comme se liant également à CPEB chez le xénope (Nakahata, Katsu et al. 2001). Pumilio est connu par ailleur pour intervenir dans la spécification de l'abdomen chez la drosophile, il agirait en réprimant la traduction des ARNm de cycline B dans la lignée germinale (Asaoka-Taguchi, Yamada et al. 1999).

Les travaux de I.Groisman ont montré que cette régulation des ARN messagers de la cycline B est localisée dans la cellule. En effet, CPEB, la Maskin et les ARNm de cycline B1 colocalisent au niveau du fuseau mitotique. De plus l'injection d'anticorps anti-CPEB perturbe la formation du fuseau mitotique (Groisman, Huang et al. 2000). Ces observations permettent de faire le lien entre contrôle de la traduction et de la localisation de la cycline B. Il a également été montré un rôle de l'α-tubuline tyrosinée sur la synthèse de cycline B. En effet chez l'étoile de mer et le xénope, l'injection d'un anticorps spécifique de la queue tyrosinée de l'α-tubuline bloque le cycle cellulaire en interphase par une inhibition de la synthèse de cycline B (Vee, Lafanechere et al. 2001).

Régulation de la destruction de la cycline B.

La cycline B est dégradée de façon très précise tant au niveau temporel qu'au niveau spatial. En utilisant une fusion entre la cycline B1 humaine et la GFP, P.Clute et J.Pines ont montré que la dégradation de la cycline B commence en prométaphase, dès que le dernier chromosome s'est aligné sur la plaque métaphasique (Clute and Pines 1999). Ils ont aussi montré que cette destruction commence au niveau des chromosomes, continue vers les pôles du fuseau pour finir dans le cytoplasme. Au moment de l'anaphase la majeure partie de la cycline B est détruite. Des résultats similaires ont été obtenus chez la drosophile (Huang and Raff 1999).

Le mécanisme de cette dégradation est maintenant bien compris (pour revue : (Hershko 1999)). Des études de délétion et de mutagénèse du N-terminal de la cycline B ont permis de définir une zone indispensable à sa dégradation correcte (Glotzer, Murray et al. 1991). Cette zone est bien conservée parmi les cyclines B et est située dans les premiers 70 acides aminés et est appelée boite de destruction ou D-box.



Figure 12 : Séquence consensus de la boite de destruction

Juste avant sa destruction, La cycline est poly-ubiquitinée (Glotzer, Murray et al. 1991) au niveau de résidus lysine adjacents à la boite de destruction, l'ubiquitine est une protéine d'environ 7 kDa qui se lie de façon covalente aux résidus lysine. La cycline B poly-ubiquitinée est ensuite reconnue par le protéasome 26S qui dégrade alors la protéine (Tokumoto, Yamashita et al. 1997). L'enzyme qui catalyse la réaction de conjugaison de l'ubiquitine sur la cycline B est un complexe multi-protéique appelé anaphase promoting complex ou cyclosome (APC/C) (King, Peters et al. 1995).Cette réaction est liée à la présence sur la cycline B de la boite de dégradation (Yamano, Tsurumi et al. 1998).

Les différentes protéines dont la dégradation est liée à l'APC ne sont pas toutes détruites au même moment. Cela est dû à l'activation de l'APC par une sous unité qui

reconnaît le type de boite de destruction présente sur le substrat. Deux sous-unités de ce type sont connues Fizzy (Cdc20) (Dawson, Roth et al. 1995), qui reconnaît la boite de dégradation de la cycline B, et Fizzy related (cdh1) qui reconnaît la KEN box (Pfleger and Kirschner 2000). L'activité de l'APC est également régulée par phosphorylation, la forme active étant hyper-phosphorylée. Cette réaction serait contrôlée par le MPF (Rudner and Murray 2000), ainsi que par la Polo-like-kinase (PLK), (Golan, Yudkovsky et al. 2002). De plus des expériences de déplétion de SucI dans des extraits de xénope ont montré que cette protéine est importante pour l'activation de l'APC. Suc1 augmente la phosphorylation de Cdc27, une sous unité de l'APC, par le MPF (Patra and Dunphy 1998). Ces régulations sont schématisées en figure 13.

La cycline B est ubiquitinée par l'APC activé par Fizzy mais aussi par Fizzy related. L'expression ce ces régulateurs est localisée dans l'espace et le temps (Yamaguchi, Okayama et al. 2000). Leur action permet d'expliquer la régulation fine de la destruction de la cycline B (Raff, Jeffers et al. 2002),(Zur and Brandeis 2002).

La voie de destruction de la cycline B est la cible d'un point de contrôle appelé point de contrôle du fuseau, qui bloque le cycle en métaphase tant que le fuseau de division n'est pas correctement mis en place. Lorsque le point de contrôle est activé, la protéine Mad2 se lie à l'APC et empêche son activation, bloquant alors la dégradation de la cycline B (Li, Meyer et al. 1997), pour revue voir :(Gardner and Burke 2000),(Amon 1999).

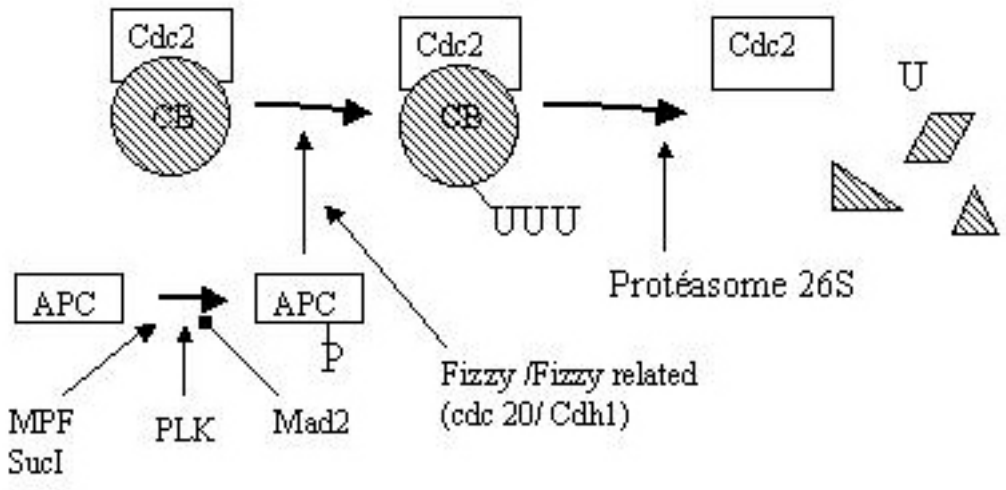


Figure 13 : schémas du processus de dégradation de la cycline B. (U : ubiquitine, APC : anaphase promoting complex, PLK : Polo like kinase,)

1.2.7Le rôle de l'extrémité C-terminale de la cycline B.

Importance des résidus C-terminaux.

Si l'on aligne les séquences protéiques des cycline A et B, un certain nombre de régions conservées apparaissent, la plus évidente étant la cyclin-Box. Une étude de ces séquences a montré l'existence d'autres motifs conservés (Nugent, Alfa et al. 1991), notamment au niveau du C-terminal où une zone d'une quinzaine d'acide aminés est bien conservée. Sur la cycline A, cette zone correspondant à une hélice alpha située après la cyclin Box est appelée hélice α C-term (Brown, Noble et al. 1995).

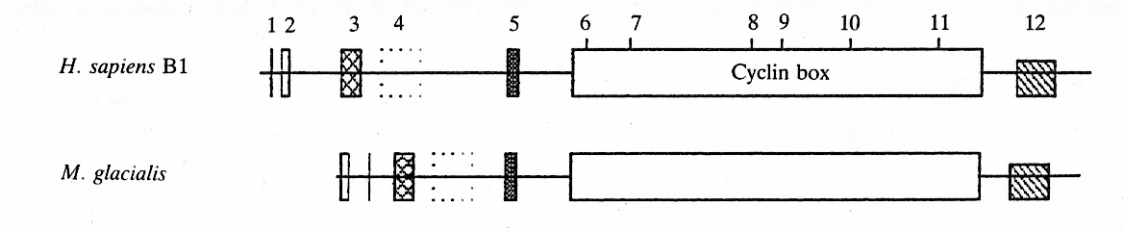


Figure 14 : Motifs conservés sur les cyclines B humaines et d'étoile de mer. Le motif numéro 12 correspond à l'hélice α C-term (adapté de (Nugent, Alfa et al. 1991)).

La fonction de ce domaine conservé n'a que peu été étudiée. De courtes délétions (de 14 et 24 acides aminés) du C-terminal de la cycline A abolissent la liaison de Cdk2 ou Cdc2 à la cycline A (Kobayashi, Stewart et al. 1992). Cette région joue donc un rôle important dans le contrôle de la formation du complexe cycline A-Cdk2, contrairement à la région N-terminale dont la délétion (même de 161 acides aminés) n'a pas d'influence sur la formation du complexe ou sur l'activité kinase associée. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus en cristallographie qui montrent que le C-terminal n'est pas impliqué dans la liaison cycline A-Cdk2.

De la même façon, une délétion C-terminale de 14 acides aminés sur la cycline B2 de xénope empêche sa liaison à Cdc2 (van der Velden and Lohka 1994). Cette délétion altère également la stabilité de la cycline B, de façon indépendante du cycle cellulaire.

Le variant de cycline B.

Au laboratoire Arago, un variant naturel de la cycline B différant de la forme connue jusque là par sa région C-terminale a été découvert chez l'oursin *Sphaerechinus granularis* par Philippe Schatt et Jean-Claude Lozano (Lozano, Schatt et al. 1998). Ce variant, auquel il manque l'hélice α C-term, est obtenu par épissage différentiel au niveau du dernier intron du gène de la cycline B.

La présence de ce variant de cycline B a été montrée par immuno-localisation dans les ovocytes immatures mais aussi après fécondation dans les micromères ainsi que dans les premières cellules différenciées de l'embryon. La microinjection du variant ralentit la maturation méiotique des ovocytes d'étoile de mer, contrairement à la microinjection de cycline B. Il semble donc que le variant de la cycline B puisse avoir une importance particulière dans le contrôle de la méiose.

Un certain nombre de résultats montrent que la protéine variante s'associe plus faiblement à Cdc2 que la cycline « mormale ». En effet, La protéine variante microinjectée dans les ovocytes, est moins bien fixée sur billes de p13-Suc1 que la protéine normale. Une autre indication dans ce sens est que le variant de la cycline B d'oursin ne complémente pas la délétion des cyclines de G1 de la levure *S.cerevisiae*, contrairement à la cycline B. Notre hypothèse est donc que ce variant correspond à une cycline plus courte n'interagissant que peu avec Cdc2 et n'intervenant donc pas dans le MPF.

1.3 Mise en place du sujet de la thèse.

Notre premier objectif était d'examiner l'existence du variant de cycline B dans d'autres organismes que l'oursin, afin de déterminer si cette existence est ou non anecdotique. La question suivante est logiquement celle du rôle biologique éventuel de la protéine variante, il semble en effet que le variant de cycline B n'intervient pas dans le MPF, ce qui est le rôle connu de la cycline B. Quelle peut donc être la fonction du variant de cycline B hors du MPF ?

L'étude comparative de la cycline B et de son variant passe par la compréhension de la fonction de la région C-terminale et en particulier de l' hélice α C-term, que ce soit dans le contrôle de la liaison à Cdc2 ou dans le contrôle de la localisation de la cycline B, voire dans d'autres aspects des régulations touchant la cycline B restant à découvrir. Pour cela l'étude de mutants de Clb2 (la cycline B de levure) sur cette zone particulière, a été entreprise.

L'existence d'une « version » de la cycline B ayant une faible affinité pour Cdc2 ouvre de nouvelles voies de recherche sur la régulation du MPF et en particulier sur l'existence possible de régulations portant sur la cycline B monomérique, qui ne sont actuellement pas étudiées. Pour examiner de telles voies de régulation, l'existence du variant représentait un atout précieux pour rechercher des protéines s'associant à la cycline B seule, indépendamment du MPF.

L'isolement et l'étude du variant d'épissage de la cycline B d'étoile de mer nous permettaient d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Nous disposions en effet d'outils moléculaires permettant d'approfondir l'étude du variant chez l'étoile de mer *M.glacialis* (banques de cDNA, banques double-hybride). De plus l'étoile de mer est un modèle historique dans lequel le contrôle de la méiose a été bien étudié.

2 Matériel et méthodes.

2.1 Méthodes de biologie moléculaire.

Vecteurs utilisés.

Vecteur	Origine	Marqueur	Utilisation
pGem-T	Promega	ampicilline	Clonage de produits de PCR, TA cloning
pBluescipt	Stratagene	ampicilline	Clonage
pET21a	Novagen	ampicilline	Production de protéines
pGex4T	Pharmacia	ampicilline	Production de protéines, fusion GST
pBTM116	Institut Curie	ampicilline, Trp	Double hybride, fusion LexA
pGBKT7	Clontech	kanamicine, Trp	Double hybride, fusion gal4 AD
pGad10	Clontech	ampicilline, Leu2	Double hybride, fusion gal4 DNA-BD, clonage de la banque
PGadT7	Clontech	ampicilline, Leu2	Double hybride, fusion gal4 DNA-BD
pNuri	Banyuls	ampicilline	Clonage de la banque d'ADNc
pXen	CRBM	ampicilline	Transcription *in vitro* (SP6)
pRS-Gap/Gal	LISM	ampicilline, Ura3	Production de protéines en levure
pJM300	LISM	ampicilline, Ura3	Production de protéines en levure, fusion GFP

Criblage de banque d'ADNc.

Une banque d'ADNc construite à partir d'ARNm de *Marthasterias glacialis*, transformée dans les bactéries DH5α est étalée sur boite à raison de 20000 clones par boite. Les colonies obtenues sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Ensuite l'ADN présent est dénaturé pendant 5 minutes dans le tampon I (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) puis neutralisé 5 minutes dans le tampon II (NaCl 1.5M, tris HCl 0.5M pH 7.5) et enfin rincé dans une solution de SSC 10X. L'ADN est fixé aux membranes par chauffage à 80 degrés pendant une heure. Les membranes sont ensuite préhybridées une heure à 65 degrés dans une solution (DENHARDT 5X, SSC 5X, SDS 10%) contenant 100µg/ml d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes à 95 degrés. Puis les membranes sont hybridées sur la nuit avec la solution de préhybridation contenant la sonde d'ADN. Cette sonde, synthétisée en utilisant le kit Prime-a-Gene (Promega), est marquée au ^{32}P et a été purifiée sur colonne de polyacrylamide (P10 Biogel). Les membranes sont lavées 30 minutes à 52 degrés (3X SSC, 0.1%SDS). Les clones positifs sont révélés par autoradiographie.

Préparation d'ADN génomique d'étoile de mer.

L'ADN génomique est préparé à partie de têtes spermatiques de *Marthasterias glacialis*. Pour cela, 200µl de têtes spermatiques sont incubés deux heures avec 20µl de protéinase K puis l'ADN est récolté après adsorption sur colonne de silice (QIAamp tissues kit, Qiagen). L'ADN obtenu est quantifié par mesure de la DO_{260}. Une autre technique a été utilisée, 50µl de têtes spermatiques sont resuspendues dans 950µl de tampon d'extraction (0.8M Chlorure de guanidine, 1mM tris HCl pH8, 1mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM NaOH) puis la solution est incubée sur la nuit à 63 degrés en présence de 40mg/ml de protéinase K. Après centrifugation (15 minutes, 13000g), l'ADN contenu dans le surnageant est précipité par addition de 5 volumes d'éthanol. La « méduse » d'ADN est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et reprise dans de l'eau stérile.

Préparation d'ARN.

Les ARN totaux sont extraits en conditions dénaturantes (Isothiocyanate de guanidium et β-mercaptoéthanol) puis adsorption sur colonne de silice (Rneasy Midi, Qiagen). Ces ARN sont passés sur des billes métalliques portant des chaînes nucléotidiques de 25 dT, ce qui permet de récupérer, grâce à un système magnétique (Dynabeads, Dynal) les ARN poly A+, qui représentent la majorité des ARN messagers.

RT-PCR.

Les ARN poly A+ sont incubés pendant une heure à 42 degrés en présence de reverse-transcriptase (Super Script, GibcoBRL) et d'amorces oligo dT modifiées (30 T puis 2 bases dégénérées VN en 3'), afin de produire des ADNc monocathénaires. Une PCR est ensuite réalisée sur le produit de la reverse transcription à l'aide d'amorces spécifiques pour amplifier l'ADNc d'intérêt. Le kit TITAN one tube (Boehringer) qui permet l'amplification directe à partir d'ARN totaux a aussi été utilisé.

RACE.

Le RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends) est une technique permettant d'obtenir les extrémités 3' ou 5' d'un fragment de cDNA connu. Pour cela deux kits sont utilisés au laboratoire (Marathon et Smart RACE Clontech). Cette technique repose sur la synthèse d'ADNc double brin à partir d'ARN poly A+, des adaptateurs sont ensuite ajoutés à

leurs extrémités, soit par ligation sur l'ADNc double brin (Marathon), soit directement lors de sa synthèse (Smart RACE). Ces ADNc servent de matrice pour l'amplification par PCR du fragment d'intérêt en utilisant une amorce hybridant sur l'adaptateur et l'autre sur la séquence spécifique.

Mutagénèse dirigée par PCR.

On réalise une PCR sur le plasmide à muter avec deux amorces sens et anti-sens partiellement chevauchantes, l'une d'elles porte la mutation désirée sur la partie non chevauchante. Afin de minimiser les mutations mon spécifiques liées à la réaction de PCR, on utilise une polymérase à haute fidelité (Taq high fidelity, Boehringer) ainsi qu'un faible nombre de cycles d'amplification (15). La réaction se fait en présence de 4% de DMSO. Le produit de la réaction est digéré par l'enzyme de restriction DpnI afin d'éliminer l'ADN parental methylé. Ce produit est ensuite transformé dans les bactéries DH5α. La présence de la mutation désirée ainsi que l'absence d'autres mutations sont vérifiés par séquençage complet.

Northern Blot.

Les ARN poly A+ préalablement dénaturés par la chaleur et la formamide sont séparés par électrophorèse sur gel dénaturant d'agarose 0.9%-formaldéhyde puis sont transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les étapes de préhybridation de d'hybridation sont les mêmes que lors du criblage de banque d'ADNc. La membrane est lavée 15 minutes à 65 degrés, successivement dans les solutions SSC 2X, 1X, 0.2X toutes contenant 0.1% SDS. Le marquage est ensuite révélé par autoradiographie. Si nécessaire la membrane est déshybridée par trois lavages de 15 minutes dans du SDS 0.5% bouillant.

Transcription *in vitro*.

L'ADNc d'intérêt est cloné dans le pXen, qui contient les parties non traduites 3' et 5' de la β-globine. Le plasmide obtenu est linéarisé par l'enzyme de restriction EcoR1 ; 2µg de ce plasmide sont utilisés pour la transcription, avec le kit Promega Ribomax SP6, selon le protocole recommandé par le fabriquant. Les ARNm obtenus sont purifiés sur colonne de silice (kit Rneasy midi**,** Qiagen) et quantifiés sur gel d'agarose dénaturant.

Traduction *in vitro*.

L'ADNc d'intérêt, cloné dans un vecteur possédant un promoteur T7, est utilisé selon le protocole du kit TNT Coupled Reticulocyte Lysate System de Promega. Les protéines produites en lysat de réticulocytes, marquées lors de leur synthèse par la méthionine ^{35}S, sont visualisées par autoradiographie, après électrophorèse SDS-PAGE.

2.2 Méthodes de biologie cellulaire.

Le matériel biologique : ovocytes d'étoile de mer.

Les étoiles de mer *Marthasterias glacialis* sont collectées dans la baie de Banyuls-sur-mer et sont gardées en eau de mer courante. Les ovaires et testicules sont prélevés par incision dorsale d'un bras de l'animal. Les ovocytes arrêtés en prophase sont préparés par plusieurs rinçages en eau de mer sans calcium (NaCl 475mM, KCl 10mM, $MgCl_2$ 50 mM, Hepes-NaOH pH8.2 10mM). La maturation de ces ovocytes est déclenchée par l'addition de 1-methyl-adénine (1µM, Sigma).

Préparation d'extraits protéiques.

Au stade désiré de la maturation méiotique ou du développement embryonnaire, 1 ml de suspension d'œufs à 5% est prélevé. Cette suspension est centrifugée (1 minute, 1000g) et le culot est repris soit dans 1ml de tampon IPNP (50mM tris HCl pH7.4, 150mM NaCl, 50mM sodium fluoride, 10mM sodium phosphatase, 10mM phenylphosphate, 1mM sodium vanadate, 0.1% triton X100, 1mM benzamidine, 0.1mg/ml SBTI) pour immunoprécipitation, soit dans du tampon de charge 2X pour les extraits totaux. Les échantillons sont ensuite congelées dans l'azote liquide et conservés à -80 degrés.

Immuno-localisation.

Les ovocytes d'étoile de mer sont soumis à la digestion par la pronase (0.5 mg/ml) pendant 30 minutes afin de digérer leur gangue. La réaction est stoppée par ajout de BSA 1% et les œuf sont rincés dans l'eau de mer. Les œufs sont extraits une heure dans le tampon d'extraction (20% glycerol, 50mM MES pH6.7, 10mM EGTA, 0.5mM $MgCl_2$, 0.5% NP40) puis fixés dans une solution de méthanol 75% et glycerol 25%, ils sont ensuite rincés dans du TBS-tween et saturés pendant une heure avec du sérum de chèvre (5% dans du TBS-tween). Les œufs sont incubés à 4 degrés sur la nuit en présence de l'anticorps primaire (20 µg/ml). La détection de l'anticorps primaire est faite par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les œufs sont enfin rincés et montés entre lame et lamelle pour une observation en microscopie à fluorescence.

Micro-injection.

Les micro-injections dans les ovocytes d'étoile de mer ont été réalisées suivant la méthode décrite par Y.Hiramoto, (Hiramoto 1974). Protéines, anticorps et ARN sont injectés de la même façon. Les protéines sont préalablement concentrées à 10mg/ml (la concentration après injection dans l'œuf, est d'environ 6.4 µM bien au delà de la concentration physiologique). De même les anticorps sont concentrés à 10µg/µl et les ARN à 5µg/µl.

2.3 Méthodes de biochimie.

Production de protéines recombinantes non solubles en bactéries.

Un clone de bactéries $BL21_a$ obtenu par transformation avec un vecteur d'expression portant la phase codante d'intérêt, est mis en culture sur la nuit dans 20ml de LB_{ampi}. Le lendemain cette préculture est diluée dans 1l de LB_{ampi}, et mise à pousser jusqu'à une DO_{600}=0.5. La production est alors induite par ajout d'1ml d'IPTG 1M dans le milieu, pendant une nuit. La culture est centrifugée (2000g, 10 minutes, 4 degrés) puis le culot est lavé dans du PBS 1X. Les culots sont repris dans 10 volumes d'eau additionnée de 0.25mg/ml de lysozyme et congelés.

Les culots bactériens sont décongelés, soniqués puis centrifugés (10000g, 15 minutes, 4 degrés). Ils sont alors resuspendus dans du tampon : phosphate 10mM pH7.2, lysozyme 1mg/ml puis de nouveau soniqués et centrifugés (10000g, 15 minutes, 4 degrés). Le culot de corps d'inclusion est repris dans du DOC 2% et centrifugé dans les mêmes conditions, il est ensuite repris dans 1 volume d'eau et congelé. On ajoute à 1ml de culot, 6 ml d'une solution (GuCl 7M, NaCl 0.5M, β-mercapto-ethanol 1mM, tris pH 8.2 20mM). Le mélange est alors soniqué dans la glace trois fois 30 secondes puis centrifugé (150000g, 15 minutes, 4 degrés), le surnageant est conservé à –80 degrés.

Purification de protéines par gel filtration.

Les extraits de corps d'inclusion sont chargés sur une colonne de gel filtration (Superdex 200 HR 26/60, Pharmacia). Cette colonne est équilibrée avec du chlorure de guanidine 6M additionné de 10mM de β-mercapto-éthanol, éluée à 0.5 ml par minute. Des fractions de 5ml sont collectées puis leur contenu est analysé par électrophorèse SDS-PAGE. Les fractions les plus pures sont utilisables pour la chromatographie d'affinité, après concentration par précipitation dans l'acétone-éthanol.

Chromatographie d'affinité.

Dans un premier temps, l'affigel (affigel 10, Biorad), préalablement lavé avec du HCl 1mM, est incubé avec la protéine d'intérêt pendant 4 heures à 4 degrés. L'Affigel couplé à la protéine est alors lavé avec 6 volumes de GuCl 4M puis avec 2 volumes de PBS 1X et 1 volume de glycine 0.1M.

Dans un second temps, le gel est incubé avec les extraits d'étoile de mer (maturés 40 minutes). 100ml d'extrait (5% de volume cellulaire dans du tampon consensus : tris 50mM pH7.5, NaCl 150 mM, NaF, 2.5mM, PyroP 0.5mM, Va 5.10^{-2}mM, Phenyl-P 5mM, EGTA 2mM, DTT 2mM, NP-40 0.2%, Benzamidine 1mM, antiprotéases) sont décongelés et soniqués. L'extrait est centrifugé (10000g, 30 minutes, 4 degrés) et le surnageant est filtré sur 0.22µm pour éliminer la phase lipidique. L'extrait est alors incubé 2 heures à 4 degrés avec l'affigel couplé aux protéines.

Les protéines fixées sur le gel sont alors éluées dans les tampons suivants : 5 volumes de tampon consensus, 2.5 volumes de tampon consensus plus NaCl 0.5N, 2.5 volumes de tampon consensus plus NaCl 1M, 2.5 volumes de tampon consensus plus NP-40 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1% et enfin 3.5 volumes d'urée 6M, tris 50 mM, DOC 1%. Les éluats sont précipités dans l'acétone 100% puis leur contenu est analysé par gel SDS-PAGE.

Préparation des anticorps.

Les anticorps ont été préparés par G.Peaucellier contre des peptides de synthèse (Neosystem, Strasbourg) chez des lapins. Les lapins ont été injectés avec un peptide couplé à l'hémocyanine de keyhole limpet (*Megathura crenulata*, Calbiochem) à l'aide de sulfo-MBS (Pierce). Le lapin est ensuite saigné, le sérum est récupéré par centrifugation (10 minutes, 10000g). Les anticorps sont ensuite purifiés par affinité sur le peptide qui a été injecté.

Western blot.

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (SDS-PAGE) sont transférées sur une membranne de PVDF (millipore). Cette membrane est saturée pendant une heure dans du TBS-tween additionné de lait à 4%. Elle est ensuite incubée une heure avec l'anticorps primaire (dilué 1/5000 dans le TBS-Tween). Après trois rinçages, la membrane est incubée 30 minutes avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (pour les anticorps primaires biotinylés, avec de la streptavidine-perox). La révélation est effectuée par la technique de l'ECL+ (Amersham).

Immuno-précipitations.

Les extraits préparés sont soniqués 10 secondes puis centrifugés (10000g, 10 minutes à 4 degrés), 1 ml de surnageant est incubé une heure avec 6µg d'anticorps puis 30µl de suspension de billes de protéine A-sépharose sont ajoutés. On laisse alors incuber une heure

sous agitation à 4 degrés. Après centrifugation (1000g, 1 minute), les billes sont rincées trois fois avec du TBS-tween puis resuspendues dans un volume de tampon de charge 2X.

Mesure d'activité kinase sur immuno-précipitation.

5µl de billes issues d'une immuno-précipitation sont mélangés à 5µl de mélange de phosphorylation ($MgCl_2$ 1mM, ATP 50µM, histone H1 200µg/ml, Hepes-NaOH 40mM pH 7.4, gamma^{32}P ATP 1µCurie) et sont incubés 10 minutes à 30 degrés. Après addition du tampon de charge, les échantillons sont bouillis 3 minutes, puis sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE. L'activité kinase des échantillons est révélée par autoradiographie.

Phase Suc.

1mg de protéines dans 1ml de PBS-tween est incubé avec 40 µl de billes d'affigel couplé à la protéine P13 Suc1 de levure. on laisse alors incuber une heure sous agitation à 4 degrés. Après centrifugation (1000g, 1 minute), les billes sont rincées trois fois avec du TBS-tween puis resuspendues dans un volume de tampon de charge 2X. Les protéines fixées sur les billes sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE.

GST-pull down.

Les protéines de fusion P15I et III GST ont été produites solubles en bactérie, par culture sur la nuit à 25 degrés et sous forte agitation. 60µl de suspension de billes de glutathion-sépharose, préalablement lavées avec le tampon consensus, sont incubées avec 0.4mg de protéine de fusion GST pendant 45 minutes à 4 degrés. Ces billes sont lavées avec le tampon consensus puis mises en contact avec le surnageant 100000g de protéines d'étoile de mer (2.5ml), pendant 2 heures à 4 degrés. Le culot de billes est lavé trois fois avec le tampon consensus puis deux fois avec du TBS, les billes sont finalement resuspendues dans 30µl de tampon de charge 2X. Les protéines fixées sur les billes sont détectées par électrophorèse SDS-PAGE et Western blot.

Gel filtration d'extraits d'ovocytes.

Les ovocytes sont repris dans 4 volumes de tampon (Tris HCl pH 7.4, 20mM. KCl, 150mM. CHAPS 0.2%. β-glycerophosphate 6mM. $MgCl_2$, 1mM. EGTA, 1.5mM. DTT, 1mM. Benzamidine, 1mM. SBTI, Leupeptin, aprotinine, 10µg/ml) puis congelés dans l'azote

liquide. Après décongélation, les extraits sont soniqués et centrifugés (30 minutes, 200000g) puis filtrés sur 0.22µm (millipore). L'extrait est alors chargé sur une colonne de FPLC (Superose 6 HR 10/30) équilibrée avec le tampon de l'extrait. Les protéines sont éluées par fraction de 0.5ml, les protéines sont examinées par électrophorèse après précipitation dans l'acétone-éthanol. La colonne a été préalablement calibrée par le passage de protéines de poids moléculaire connu.

Test de phosphorylation.

Une suspension d'œuf à 10%, est mise en contact avec 10mCuries (370MBq) d'orthophosphate ^{32}P (1ml additionné de 50µl d'Hepes 0.5M pH 9.5, et de 150µl d'eau de mer 20X), pendant 1 heure. Les œufs sont ensuite lavés trois fois à l'eau de mer, puis resuspendus à 5%. La maturation est induite par addition d'1-metyladénine, des prélèvements sont alors effectués toutes les 20 minutes jusqu'à la fin de la maturation. Les protéines phosphorylées sont détectées par autoradiographie, après électrophorèse SDS-PAGE.

2.4 Méthodes spécifiques du modèle « levure ».

Souches de levure utilisées.

S.cerevisiae BF264-15DU (MATα, leu2, ura3, trp1, his2, ade1)

15DU ΔClb2

15DU diploïde ΔΔClb2

15DU ΔClb1.3.4 Clb2 thermosensible

S.cerevisiae Y190 et L40 pour le criblage en double hybride

Y190 (MATa, ura3, his3, ade2, Lys2, trp1, leu2, galΔ4, galΔ80, cyh^r2, $LYS2::GAL1_{UAS}$-$HIS3_{TATA}$-HIS3, $URA3::GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-LacZ)

L40 (MATa, his3, trp1, leu2, ade2, LYS2::(LexAop)4-HIS3, URA3::(LexAop)8-LacZ GAL4)

Milieux de culture.

Milieux riches : yeast peptone dextrose (YPD), ou galactose (YPG) : yeast extract 1%, peptone 2%, Dextrose ou Galactose 2%, pour milieux solides Agar 2%.

Milieux sélectifs : dextrose, raffinose ou galactose sans les acides aminés X (D-X, R-X, G-X): Yeast Nitrogen base 0.67%, Dextrose ou Raffinose ou Galactose 2%, pour milieux solides Agar 2%, Acides amines sauf ceux que l'on sélectionne ; Asp 0.01%, Lys 0.008%, His, Leu, Met, Trp, Ile, Phe, Ser, Tyr, Val, Arg, Thr 0.004%, Ade 0.003%, Ura 0.001%.

Transformation de levure.

Une culture de la souche d'intérêt en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}\approx 0.7$) est centrifugée (10 minutes à 1500g et à température ambiante). Le culot de cellules est lavé dans 1 volume d'eau puis concentré à 5.10^7 cellules par ml dans de l'Acétate de Lithium 0.1M. On met alors en contact 50µl de ces cellules avec 100ng d'ADN plasmidique, 5µg d'ADN entraîneur (ADN de sperme de hareng, Clontech) et 300µl de PEG/LiAc (PEG 3350 à 50% ; Acétate de Lithium 0.1M) sont ajoutés au mélange. L'ensemble est incubé 30 minutes à 30 degrés puis, après l'ajout de 40µl de DMSO, est soumis à un choc thermique de 15

minutes à 42 degrés. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 200µl d'eau puis les cellules sont étalées sur le milieu de culture adéquat.

Préparation d'extraits protéiques.

Les levures transformées avec le vecteur pRS316-Gal sont cultivées dans 50 ml de R-Ura à 30 degrés jusqu'à une DO_{600} de 0.7. L'induction de la production se fait par ajout de 2% de galactose dans le milieu de culture, pendant 5 heures. La culture est ensuite centrifugée et reprise dans 1ml de tampon de lyse (50mM Tris HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM $VaNO_4$, 0.1% NP40, 50mM glycero-phophate) auquel sont ajoutés au dernier moment des inhibiteurs de protéases. La suspension est vortexée en présence de billes de verre (Sigma, diamètre 600µm) pendant une heure à 4 degrés, afin de casser les cellules. Le surnageant contenant les protéines est séparés des billes par cenrifugation.

Préparation d'ADN génomique de levures.

Une culture de levure (50ml) est culottée puis resuspendue dans 0.3ml de tampon (1.2M sorbitol, 10mM tris HCl pH7.5, 10 mM $CaCl_2$) et incubée 30 minutes à 37 degrés, en présence de Lyticase (20µl à 100 u/µl) afin de digérer la parois. Les cellules sont alors culottées et reprises dans 0.3ml de solution de lyse (50 mM tris HCl pH6.8, 100mM NaCl, 100mM EDTA, 0.5% SDS) puis incubées 15 minutes à 65 degrés. Après ajout de 0.2ml d'acétate de potassium 5M, la solution est incubée 15 minutes à température ambiante puis centrifugée 30 minutes à 4 degrés. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité par ajout de 0.7ml d'isopropanol. Il est ensuite traité à la Rnase puis reprécipité avec de l'isopropanol, lavé avec de l'éthanol et repris dans de l'eau stérile.

Synchronisation de levures.

Une culture de levures en phase de croissance exponentielle est mise en présence d'α-facteur (60 ng/ml pour une souche Bar-, Sigma) et laissée 2 heures à 30 degrés. Le blocage des cellules en phase G1 est alors vérifié par examen du phénotype des levures au microscope. Ce blocage est levé par deux lavages dans 5 volumes d'YPD puis les cellules sont remises en culture. Des prélèvements à intervalles réguliers peuvent alors être effectués.

« Etiquetage » de protéine au locus.

Une construction contenant « l'étiquette » (Tag HA, cMyc, GFP…) ainsi qu'un marqueur de sélection est amplifiée par PCR en utilisant des amorces comportant également des séquences flanquant le site d'insertion prévu pour « l'étiquette ». Le produit de cette PCR est transformé dans la souche de levure choisie. La sélection sur le marqueur de sélection utilisé permet de repérer les levures ayant inséré le fragment dans leur génome, par recombinaison homologue.

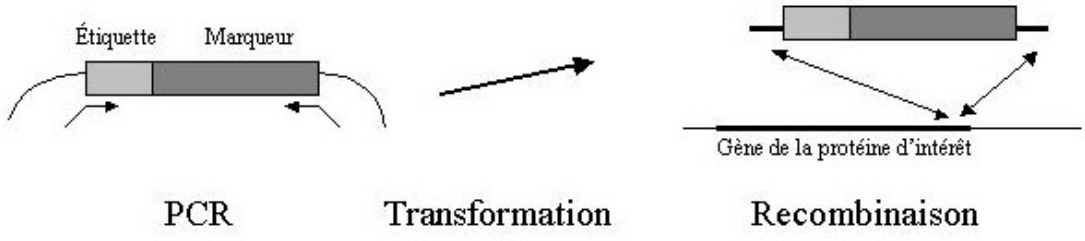


Figure 15 : principe de l'étiquetage de protéine au locus.

Expression de protéines de fusion GFP.

Les levures transformées avec le vecteur pJM-300 sont cultivées dans 10 ml de R-Ura à 30 degrés jusqu'à une DO_{600} de 0.7. Un millilitre de la culture est filtré sur une membrane Metriciel (0.45µm, Gelman science). Le filtre est placé sur une boite YPG pendant 3 heures, Les cellules récupérées dans 1ml d'eau sont observées au microscope à fluorescence.

Marquage à la concanavaline A.

Les levures, de la souche 15DU diploïde ΔΔClb2, transformées avec le vecteur pRS316-GAP sont cultivées dans 5 ml de R-Ura à 30 degrés jusqu'à une DO_{600} de 0.7. Les cellules sont lavées dans 1 volume de Tris/NaCl (Tris HCl 50mM pH7.5, NaCl 150mM) puis resuspendues dans 1ml du même tampon. Après une légère sonication (5 secondes), on ajoute à la suspension le marqueur Concanavaline A-FITC (100µg/ml final pendant 15 minutes à l'obscurité). Après un lavage avec le tampon Tris/NaCl, les cellules sont remises en culture pour 2 heures dans du YPD à l'obscurité. Les cellules son fixées par addition de formaldéhyde dans le milieu (3.7% final) puis reprises dans l'eau pour observation au microscope.

Préparation de cellules pour la cytomérie en flux.

1 ml de la culture d'intérêt est centrifugé (3 minutes , 2000g, 4 degrés) puis les cellules sont fixées dans l'éthanol 70 % pendant 30 minutes, elles sont ensuite lavées dans du PBS 1X. Le culot est repris dans 100µl de PBS 1X et incubé pendant une heure à 37 degrés en présence d'1mg de RnaseA. Les cellules sont lavées dans du PBS 1X puis resuspendues dans 100µl de PBS/IP (PBS 1X, iodure de propidium 50µg/ml, l'iodure de propidium marque les acides nucléiques), et incubées 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont de nouveau lavées dans du PBS 1X puis reprises dans 1ml de PBS/IP (PBS 1X, iodure de propidium 5µg/ml). Après une légère sonication (5 secondes), la suspension est passée au cytomètre en flux (FACS, Becton Dickinson). La mesure de la fluorescence des cellules permet de connaître la quantité d'ADN qu'elles contiennent et donc d'en déduire la phase du cycle cellulaire dans laquelle chaque cellule se trouve (G1-S-G2/M). La fluroresence d'environ 10000 cellules est mesurée, ce qui permet de construire un spectre montrant l'état de la population de cellules

Construction de la souche Clb2-AC.

Pour construire une souche portant la mutation de Clb2 au locus, le point de départ est une souche dont le gène Clb2 est inactivé par insertion du marqueur Ura3. Cette souche a été transformée avec un plasmide linéarisé portant l'ORF du mutant Clb2-AC. Les clones ayant intégré la construction au locus par recombinaison homologue, sont donc Ura-. Ce phénotype est testé par pousse sur un milieu contenant 0,1% de 5-fluoroorotic Acid. La présence sur le gène de Clb2 de la souche ainsi obtenue, du site de restriction Sph1 (ajouté par la mutation utilisée), a été testée par digestion Sph1 d'une amplification de Clb2 par PCR sur l'ADN génomique.

2.5 Méthodes de double hybride.

Principe du double hybride chez la levure.

Le criblage de banque d'ADNc en double hybride dans la levure *S.cerevisiae*, est basé sur la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel. L'ADNc codant la protéine d'intérêt « appât » est cloné en fusion avec un ADNc codant soit le domaine activateur du facteur de transcription Gal4 (pGBKT7), soit la protéine SOS LexA de *E.coli* (pBTM116). La banque de cDNA est clonée en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4. La banque et l'appât sont co-transformés dans la souche de levure adaptée (L40 ou Y190). Lorsqu'il y a interaction entre la protéine issue de la banque et l'appât, un facteur de transcription fonctionnel est reconstitué et les gènes rapporteurs His3 et LacZ sont activés.

Tests préalables.

La première étape consiste à vérifier l'activité de l'appât dans la levure. Pour cela le plasmide appât est transformé dans la souche de levure avec le pGAD10 vide (plasmide de la banque sans insert). Cette transformation est étalée sur milieu D-LW et D-LWH, ce qui permet de savoir si l'appât est toxique pour la levure ou s'il est transactivateur (pousse sur milieu –His sans protéine de la banque). Ce test permet aussi de déterminer la quantité de 3-AminoTriazol à ajouter dans le milieu pour éliminer le bruit de fond du au gêne His3.

Mesure de l'activité β-galactosidase (test X-gal).

Ce test permet de déterminer par l'apparition d'une coloration bleue l'activité LacZ d'une colonie de levure. La colonie à tester est transférée sur membrane (nitrocellulose Hybond C-extra, Amersham), la membrane est passée trois fois 15 secondes dans l'azote liquide afin de perméabiliser les parois des levures. La membrane est alors déposée sur un filtre (Whatman 3mM, diamètre 10cm) préalablement imbibé de tampon Z : (Na_2HPO_4 60mM, NaH_2PO_4 40mM, KCl 10mM, $MgSO_4$ 1mM), X-gal 2% (200µl pour 10ml), β-mercapto-éthanol (30µl pour 10ml), et laissée ainsi à 30 degrés. La coloration bleue apparaît au bout de quelques minutes à quelques heures.

Criblage de la banque.

Le criblage proprement dit s'effectue par cotransformation dans la levure du plasmide appât et de la banque. 5µg d'appât et 2.5µg de banque sont cotransformés comme décrit précédemment (avec tous les volumes doublés). Chaque transformation est étalée sur une boite de milieu D-LWH (diamètre 140mm), 10 transformations sont réalisées pour chaque criblage. Une dilution de la transformation (1/100 et 1/1000) est étalée sur milieu D-LW afin de déterminer le taux de transformation. Lorsque les clones apparaissent sur les boites D-LWH (au bout de 5 à 8 jours) un test X-gal est réalisé sur ces boites, les clones bleus sont alors repérées et réétalés sur milieu sélectif.

Extraction d'ADN plasmidique de levure.

Les clones positifs sont mis en culture, après restriage sur milieu sélectif, dans 3ml de D-LWH (30 degrés sur la nuit). Les culots de levure sont resuspendus dans 50µl de tampon de lyse (50mM tris HCl pH7.5, 1.2M sorbitol, 10mM EDTA, 10mM β-mercapto-ethanol) additionné de 2µl de Lyticase (100 u/µl) et incubés à 37 degrés sur la nuit afin de digérer la parois. Les levures sont ensuite traitées comme des bactéries (kit Wizard Promega).

Vérification des clones positifs.

Le plasmide appât est séparé de celui de la banque. Selon le plasmide dans lequel l'appât est cloné, le protocole est différent : pour le pGBKT7 après transformation en *E.coli* DH5α, les bactéries sont étalées sur milieu ampicilline ; pour le pBTM116 après transformation en *E.coli* HB101, les bactéries sont étalées sur milieu M9-Leu. Les plasmides de la banques sont extraits des bactéries par lyse alcaline, ils sont alors retransformés dans la souche de levure, avec l'appât ou non, afin de vérifier que l'on retrouve le même phénotype (His + et LacZ+) chez les co-transformants uniquement. Les plasmides de la banque donnant une interaction spécifique sont alors séquencés.

3 Résultats.

3.1 Clonage du variant de cycline B de M. glacialis.

L'étude du variant de cycline B d'étoile de mer a commencé par le clonage de la cycline B par criblage de banque d'ADNc. En effet les tentatives préalable de clonage par PCR avaient été des échecs. Le clonage ultérieur du variant a permis d'initier l'étude de sa fonction potentielle.

3.1.1 Clonage de la cycline B.

Un criblage de banque d'ADNc a été effectué avec une sonde hétérologue : le fragment de digestion PstI de l'ADNc de la cycline B d'*Astropecten aranciacus* qui correspond à la cyclin Box. Après deux étapes de criblage, 8 clones purs ont été isolés, 4 d'entre eux correspondant à la cycline B. Le clone le plus long (clone 211, de 2.1 kb) a été entièrement séquencé. Afin d'obtenir un ADNc complet, des réactions de RACE 3' et 5' ont été réalisées avec les amorces suivantes :

RACE 3' : amorce ETCB5, tacagcgcatacagtgaagatcacctgatg amplification : 1140pB
RACE 5' : amorce 5'CB, cactcatatccatgggctctggtgactg amplification : 550pB

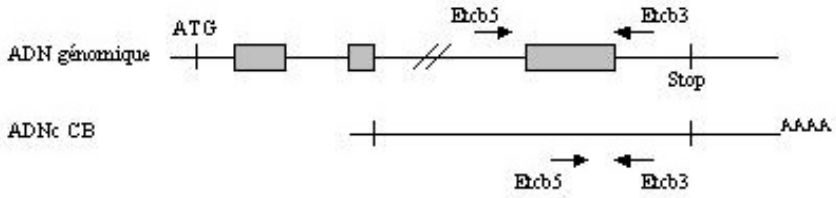
Le montage des séquences obtenues a donné la séquence de l'ADNc de la cycline B entier qui fait environ 2400 pb et est présenté en annexe 1, il comprend une ORF de 1164 pb ainsi qu'une partie UTR 5' de 255 pb et une partie UTR 3' de 918 pb.

La présence d'un intron dans la région du gène codant la partie C-terminale de la cycline B à été recherchée par PCR sur l'ADN génomique, à l'aide d'amorces situées de part et d'autre du site d'insertion présomptif (Etcb3-Etcb5). La comparaison des amplification

obtenues sur les ARNm et sur le gène, montre la présence d'un intron de 497 pB (figure 16.b), cet intron a été entièrement séquencé.

a

Etcb3 :cgctcagcacatctggtcagcgaggtccat
Etcb5 :tacagcgcatacagtgaagatcacctgatg



b

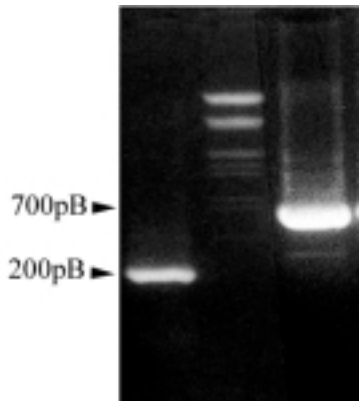
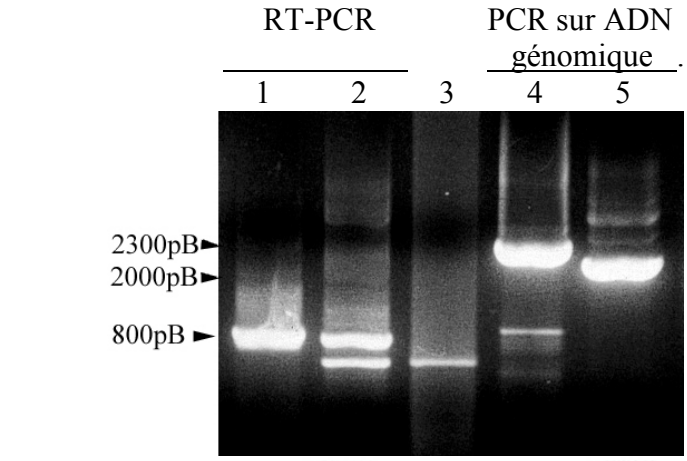


Figure 16 : Mise en évidence d'un intron sur le gène au niveau de la partie C-terminale de la cycline B. **a** Amorces utilisées pour l'amplification sur l'ADN génomique et position de ces amorces sur l'ADN génomique et l'ADNc de la cycline B (les rectangles grisés sont les introns). **b** Résultats des amplifications : sur l'ADNc de la cycline B à gauche, sur l'ADN génomique à droite, marqueur de poids moléculaire au centre (ADN du phage λ digéré EcoR1 et Hind3).

3.1.2 Recherche de l'ADNc du variant de cycline B.

La présence d'un intron dans cette partie du gène rend possible l'existence d'un variant d'épissage homologue de celui présent chez l'oursin. Pour savoir si le messager variant existe réellement chez l'étoile de mer, une RT-PCR a été réalisée, avec une amorce hybridant très en amont du site d'insertion de l'intron (BOX : tttgacaacccacagctctgcagc) et une amorce hybridant dans l'intron (INT3 : ttgggggtaagaagccacaaggc). Cette RT-PCR montre qu'un messager variant est présent dans les ovocytes d'étoile de mer (figure 17.a, piste 2).

a



b

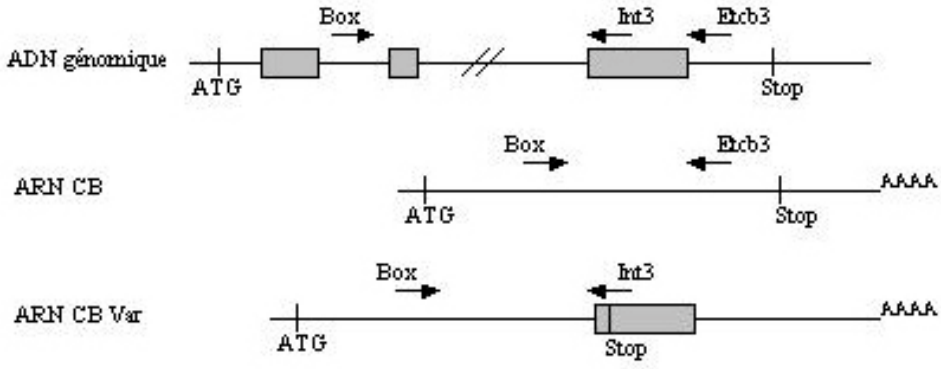
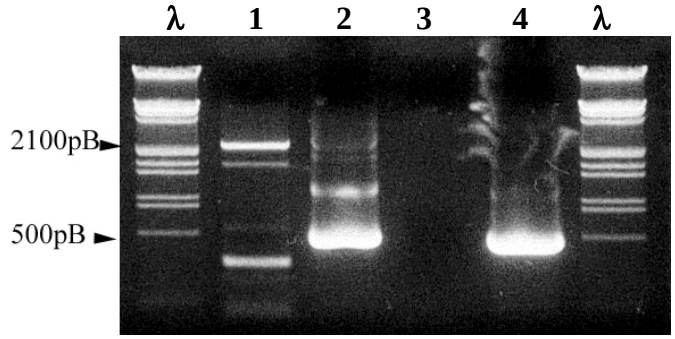


Figure 17 : Mise en évidence de l'existence du messager variant de cycline B. **a** Piste 1 : RT-PCR avec les amorces BOX-Etcb3, spécifique de la cycline B. Piste 2 : RT-PCR avec les amorces BOX-INT3, spécifique du variant de la cycline B. Piste 3 : contrôle sans matrice de la RT-PCR précedente. Piste 4 : PCR avec amorces BOX-Etcb3 sur l'ADN génomique. Piste 5 : PCR avec amorces BOX-INT3 sur l'ADN génomique. **b** Position sur l'ADN génomique ainsi que sur les ARN messagers des deux formes de cycline B, des amorces utilisées (les rectangles grisés sont les introns).

Afin de déterminer le mode d'obtention de l'ADNc variant, une réaction de RACE 3' a été réalisée avec deux amplifications successives en utilisant des amorces introniques : RAC1 tccaggtacttgagattctgtgtggc puis RAC2 gccttgtggcttcttacccccaatta. Une PCR réalisée sur le produit du RACE avec l'amorce RAC2 et une amorce située dans le dernier exon de la cycline B (Etcb3), à montré que la totalité de l'intron était conservé dans l'ADNc variant (figure 18.a). Le séquençage complet du produit du RACE 3' a confirmé que la seule différence entre les ADNc de la cycline B et de la cycline B variante est la rétention de cet intron dans l'ADNc du variant. Les séquences des RACE 3' sur la cycline B et son variant sont présentées en annexe 2.

a



b

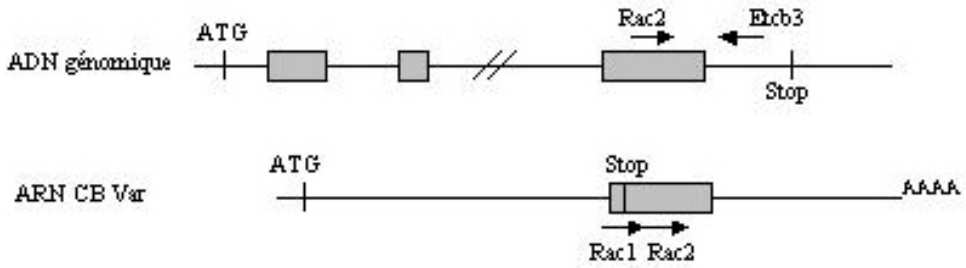


Figure 18 : Démonstration du mode d'obtention du messager variant. **a** Piste 1, produit de RACE 3'. Piste 2, PCR sur le produit du RACE. Piste 3, contrôle négatif. Piste 4, PCR avec les mêmes amorces sur l'ADN génomique, λ : marqueur de poids moléculaire. **b** position sur l'ADN génomique et l'ARNm de la cycline B variante des amorces utilisées (les rectangles grisés sont les introns).

3.1.3 Expression des messagers de la cycline B et de son variant.

Un Northern blot a été réalisé afin de comparer l'expression du messager de la cycline B à celle du messager variant. Le Northern blot Cycline B a été hybridé avec comme sonde le fragment NcoI-BglII de l'ADNc de la cycline B. Le Northern blot Variant a été hybridé avec comme sonde une amplification par PCR de l'intron (obtenue avec les amorces RAC2 et INT2 : cgaccttattggccacttcacatttaggc). L'hybridation obtenue avec la sonde cycline B montre une bande à 3kpb dont l'intensité est la plus forte dans les ovocytes maturés (figure 19.b). Par contre aucune bande n'a été révélée après hybridation avec la sonde CB variante (figure 19.c).

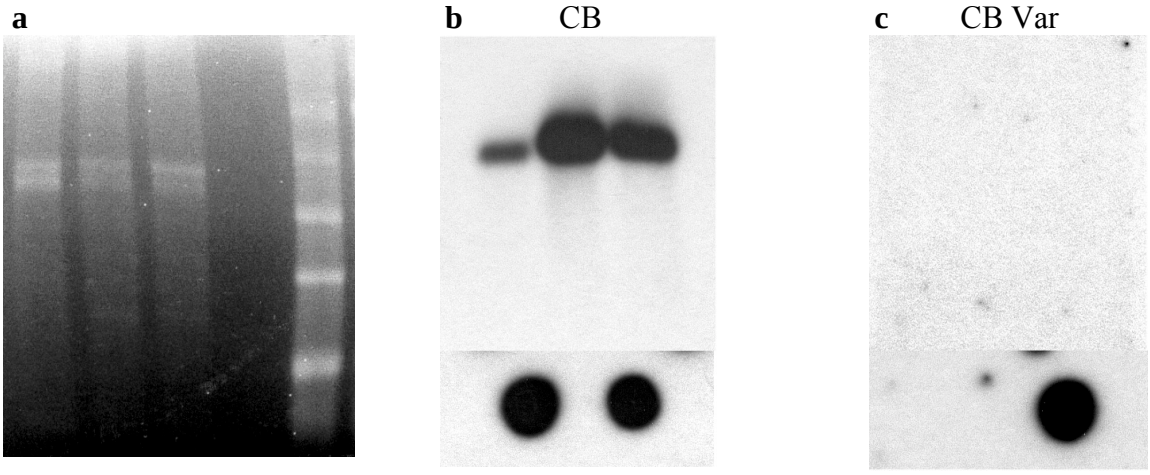


Figure 19 : Expression des messagers variants et normaux de la cycline B. **a** Marquage bromure d'éthidium des ARN utilisés (dans l'ordre : ARN d'ovaires, d'ovocytes matures, de larves, marqueurs). **b** Northern blots réalisé avec une sonde cycline B, en dessous : contrôles, dépôts des plasmides contenant les ORF de CB et CBvar. **c** Même membrane déshybridée et réhybridée avec la sonde intronique, en dessous les mêmes contrôles.

3.1.4 Recherche de la protéine variante endogène.

Pour tenter de mettre en évidence la protéine variante endogène, des Western blots ont été réalisés en utilisant un anticorps spécifique du variant. La protéine variante endogène n'a pu être mise en évidence, que ce soit en Western blot sur protéines totales d'ovocyte (résultat non montré) ou sur immuno-précipités, comme le montre la figure 20.b.

a

Anti Variant :
anti-peptide C-ter : CLVASYPQLKKKIV

Anti CB :
anti-peptide C-ter : CTSSTVNDLADQMC

Anti CB biotinylé : anti protéine totale

b

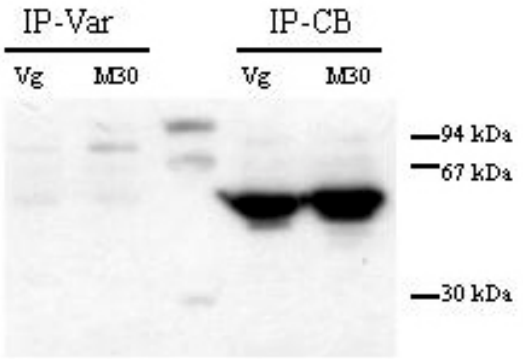


Figure 20. Recherche de la cycline B variante dans les ovocytes d'étoile de mer. **a** Anticorps utilisés. **b** Immuno-précipitations réalisées avec les anticorps spécifiques, révélées avec l'anti-cycline B biotinylé, sur des extraits d'ovocytes non matures (vésicule germinative) et 30 minutes après le début de la maturation.

3.2 Rôle des résidus C-terminaux de Clb2 de levure.

Pour étudier le rôle des résidus manquant chez le variant de cycline B, des mutants de la cycline Clb2 de la levure *S.cerevisiae* ont été utilisés, Clb2 étant la principale cycline de type B de la levure. Le modèle levure permet d'examiner facilement quelles sont les variations dans la fonction de Clb2 induites par des mutations de la partie C-terminale et donc de mieux comprendre le rôle potentiel du variant de cycline B.

3.2.1 Mutations de Clb2 utilisées.

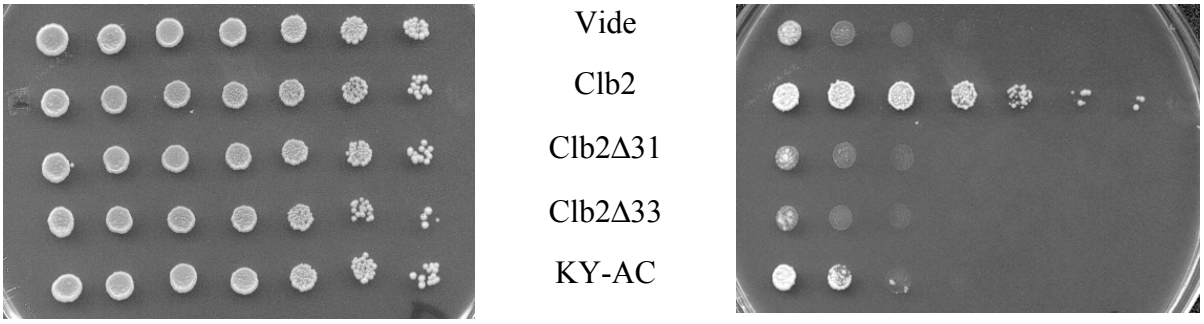
Trois mutants ont été construits par mutagénèse dirigée, les deux premiers sont de courtes délétions C-terminales de 31 et 33 acides aminés (Clb2Δ31 et Clb2Δ33), le dernier mutant porte les mutations $K_{459}A$ et $Y_{460}C$. La séquence C-terminale de ces mutants est montrée en figure 21. La mutation KY-AC touche deux résidus conservés parmi les cyclines B et qui manquent dans les variants d'épissage (figure 56). Une souche de levure portant le double mutant Clb2 KY-AC remplacé au locus de Clb2 a également été utilisée (appelée souche 15D Clb2-AC).

Clb2 :	--DEFHRKYQSRRFMKASIISVQWALKVRKNGYDIMTLHE*
Clb2Δ31	--DEFHRKY*
Clb2Δ33	--DEFHR*
Clb2 KY-AC	--DEFHR**AC**QSRRFMKASIISVQWALKVRKNGYDIMTLHE*

Figure 21 : Alignement C-terminal des mutants de Clb2 et de Clb2 natif. Les résidus mutés dans la forme Clb2-AC sont en gras et soulignés.

3.2.2Complémentation de la souche Clb2-TS.

Afin d'examiner si les mutants de Clb2 ont la même activité que la protéine native, des tests de complémentation des cyclines mitotiques de levure on été effectués. La souche délétée pour les Clb1,3,4 et portant un allèle de Clb2 thermo-sensible a été transformée par le plasmide pRS-Gap contenant soit Clb2 muté soit Clb2 natif. Des dilutions de 5 en 5 ont été déposées sur milieu sélectif et mises à pousser à température restrictive (37 degrés) ou permissive (28 degrés). Les deux délétions ne complémentent pas mieux la souche Clb2-TS que le plasmide vide, La mutation ponctuelle KY-AC complémente très légèrement cette souche mais bien moins que Clb2 natif (figure 22).

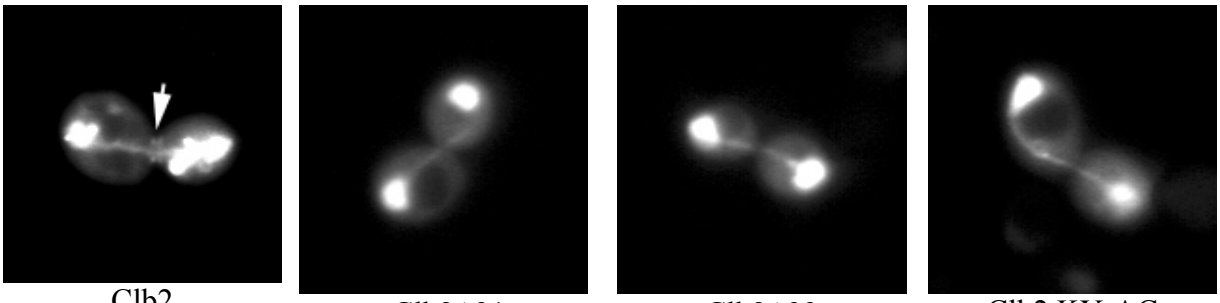


Figures 22 : Test de complémentation de la souche Clb2 TS avec les mutants du C-terminal de Clb2. A 28 degrés Clb2 endogène est actif alors qu'à 37 degrés il ne l'est plus.

3.2.3Localisation des mutants.

La localisation intracellulaire de ces mutants a été examinée en sur-expression de protéines de fusion GFP dans une souche sauvage. La localisation est identique pour les trois mutants : les protéines sont visualisées dans le noyau ainsi que sur le fuseau de division. Cette localisation diffère de celle de Clb2. En effet Clb2 est en plus visualisée sous la forme de deux anneaux au niveau de la jonction mère-fille (indiqués par la flèche sur la figure 23.a), ces anneaux n'ont jamais été visualisés dans le cas des mutants.

a



Clb2 Clb2Δ31 Clb2Δ33 Clb2 KY-AC

b

	Clb2	Clb2 KY-AC
Signal clair :	76%	0%
Indéterminé :	10%	9%
Pas de signal :	14%	81%

Figure 23 : **a** Localisation de Clb2 et de ses mutants en fusion GFP, clonés dans le pJM300, la flèche indique les deux anneaux à la jonction mère-fille. **b** Proportion de cellules à noyaux séparés présentant un signal en deux anneaux à la jonction mère-fille, pour Clb2 et pour Clb2-AC (deux comptages indépendants de plus de 120 cellules).

Localisation au SPB.

Clb2 est également visualisé, en surexpression de protéine de fusion GFP, au niveau des SPB (Spindle Pole Body, équivalent fonctionnel des centrosomes des cellules animales, indiqués par des flèches sur la figure 25.a). Ce marquage n'a jamais été observé en sur-expression du mutant Clb2-AC.

a **b**

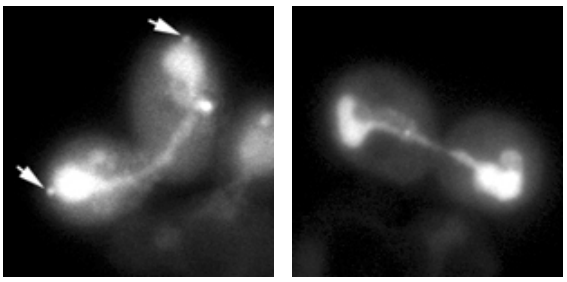


Figure 25 : **a** Signal au niveau des Spindle Pole Body (SPB), en sur-expression de Clb2-GFP (indiqué par les flèches). **b** Exemple d'absence de marquage au SPB en sur-expression de Clb2-AC-GFP.

Influence de la sur-expression du mutant sur le fuseau de division.

La sur-expression de la fusion Clb2-AC-GFP, entraîne fréquemment une malformation du fuseau de division. qui semble continuer à s'allonger au delà de la normale, deux exemples en sont donnés en figure 24.a. Des fuseaux légèrement courbes peuvent également être trouvé en sur-expression de Clb2-GFP, mais moins fréquemment. Paradoxalement, aucune différence au niveau des fuseaux de division n'a été observée entre les souches 15D (portant l'allèle sauvage de Clb2) et 15D-Clb2-AC, les fuseaux étant alors marqués par la tubuline-GFP, intégrée au locus (figure 24.b).

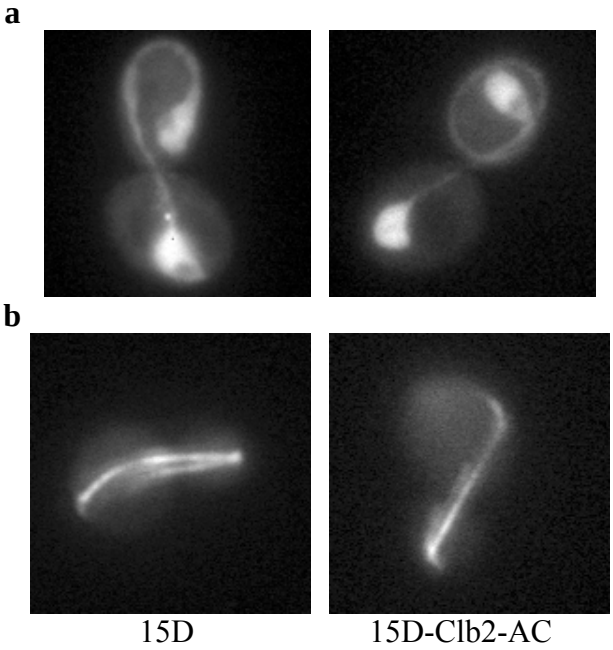


Figure 24 : **a** Exemples de fuseaux anormaux obtenus en sur-expression du mutant Clb2-AC en fusion GFP. **b** Signal de la tubuline-GFP intégrée au locus, dans les souches 15D et 15D-Clb2-AC.

3.2.4 Examen de l'effet sur le cycle cellulaire par cytométrie en flux.

Le profil du contenu en ADN des levures a été examiné en cytométrie en flux, en sur-exprimant soit le mutant Clb2 KY-AC, soit Clb2 sauvage, dans la souche délétée pour Clb2 ainsi que dans la souche sauvage (15D) afin de détecter un éventuel effet « dominant négatif » du mutant. Un effet du mutant KY-AC est visible dans les deux souches, différent de celui de

la sur-expression de Clb2 sauvage. Dans la souche ΔClb2, le spectre est décalé vers la droite, au delà de la position normale des cellules en G2 (ce qui est peut-être la conséquence d'un allongement des cellules, figure 25.a). Dans la souche 15D, l'effet obtenu avec le mutant est presque équivalent de celui obtenu avec le vecteur vide (un pic de cellules en G1 majoritaires, figure 25.b). Paradoxalement, les deux délétions ont moins d'effet que le mutant ponctuel (résultat non montré).

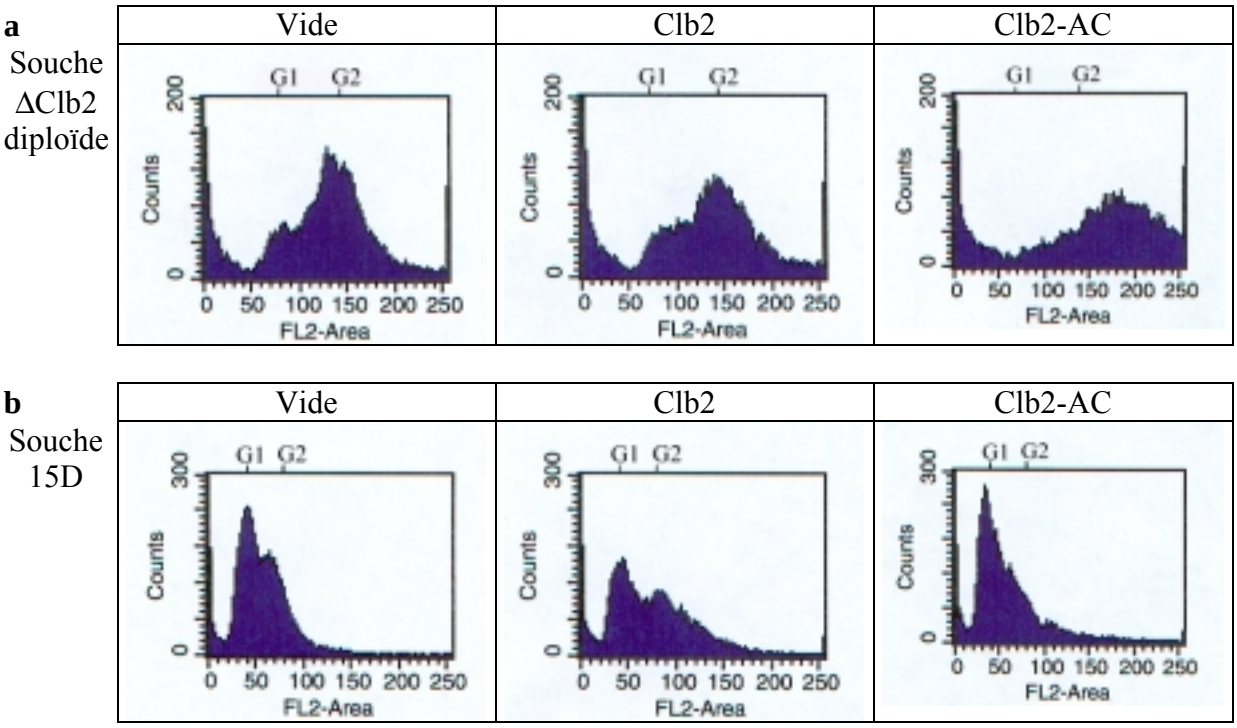


Figure 25 : Profils en cytométrie en flux (nombre de cellules en ordonnée, fluorescence en abscisse, unités arbitraires). **a** Souche ΔClb2 diploïde transformée par le pRS-GAP. **b** Souche 15D transformée par le vecteur pRS-GAL.

La comparaison des profils obtenus sur des cultures asynchrones des souches 15D, 15D ΔClb2 et 15D Clb2-AC montre un état intermédiaire de la souche 15D Clb2-AC, ce que confirme le comptage des cellules présentant un bourgeon (figure 26) qui représente la proportion de cellules en phase S-G2-M dans la culture. L'examen de cultures synchronisées par l'α-facteur a également confirmé que, du point de vue de la dynamique du cycle cellulaire, la souche 15D Clb2-AC est intermédiaire entre une souche sauvage et une souche délétée pour Clb2 (résultats non montrés).

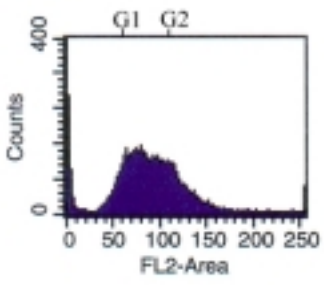
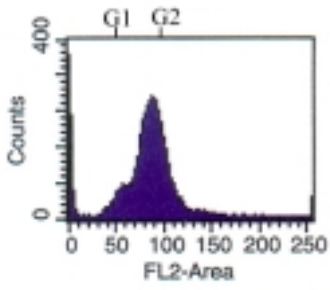
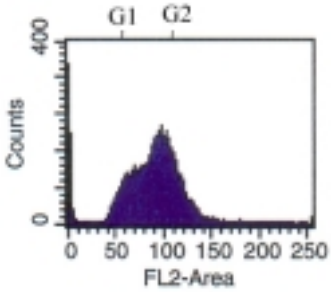
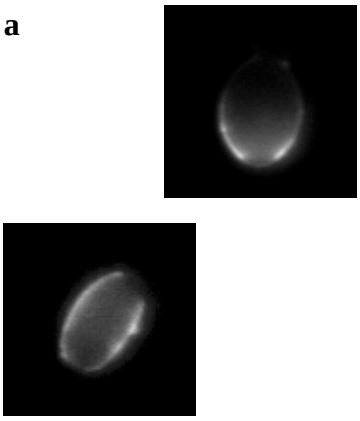
	Souche 15D	Souche 15D-ΔClb2	Souche 15D-Clb2-AC
			
Budding index	51.8%	73.6%	64.5%

Figure 26 : Profils en cytométrie en flux (nombre de cellules en ordonnée, fluorescence en abscisse, unités arbitraires). Profil des trois souches 15D, 15D-ΔClb2, 15D-Clb2-AC, en dessous pour chaque souche est indiqué le pourcentage de cellules présentant un bourgeon (cellules en phase S-G2-M, un comptage de 200 cellules).

3.2.5 Effet sur la polarisation de la croissance cellulaire.

L'effet du mutant Clb2 KY-AC sur la transition entre croissance isotrope et croissance polarisée a été examiné par marquage à la concanavaline A. Cette transition est dépendante de l'activité Clb2-Cdc28, la souche diploïde délétée pour Clb2 a donc un déficit de croissance isotrope. La transformation par Clb2 restaure environ 50% de croissance isotrope par contre la transformation par le mutant KY-AC ne restaure pas plus de croissance isotrope que le vecteur vide (environ 25 à 30%, figure 29.b).

a



b

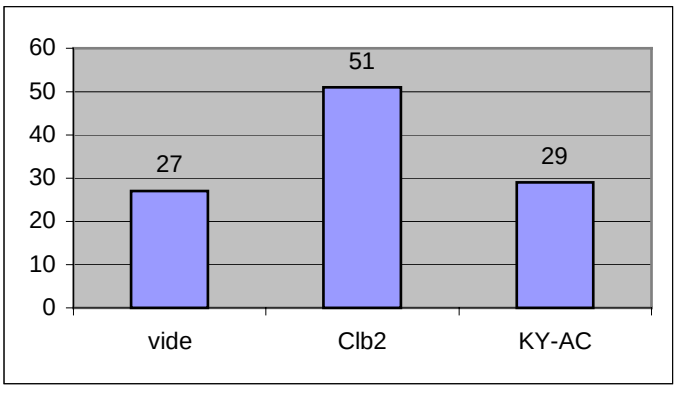


Figure 29 : Effet du mutant Clb2-AC sur la transition entre croissance isotrope et polarisée, examiné par marquage à la concanavaline A. **a** Cellule en croissance polarisée (haut) et isotrope (bas). **b** Pourcentage de cellules filles en croissance isotrope (deux comptages indépendants de plus de 200 cellules).

3.2.6 Test de l'interaction avec Cdc28.

Seul le mutant Clb2 KY-AC fusionné avec le tag HA a été testé, en sur-expression dans la souche 15D, les deux délétions n'étant pas fusionnées avec le tag HA. L'interaction a été testée par Western Blots sur immuno-précipités anti-HA et des test d'activité histone H1 kinase ont été réalisés sur ces immuno-précipitations. Le mutant Clb2 KY-AC fixe moins de Cdc2 que la protéine native et ne descend qu'environ 10% de l'activité kinase par rapport à Clb2 (figure 27.c). Les résidus C-terminaux de Clb2 sont donc nécessaires pour une bonne association à Cdc28.

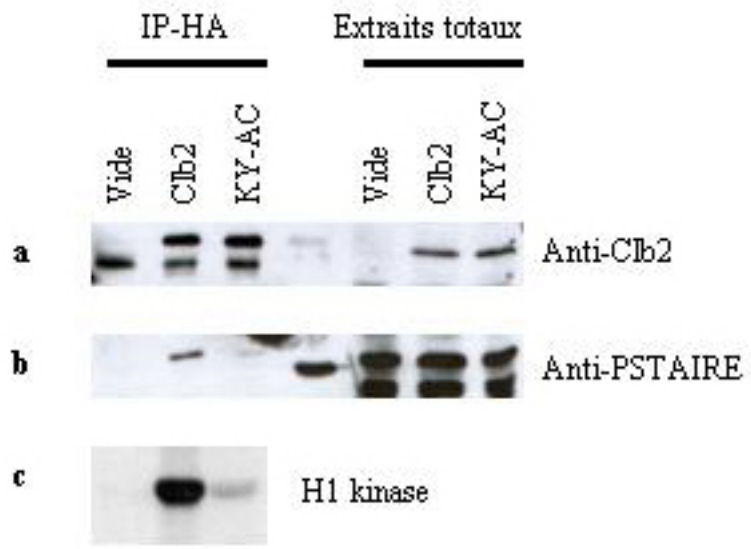


Figure 27 : Interaction entre Clb2 KY-AC et Cdc28. **a** Immuno-précipitations anti-HA révélées par l'anti-Clb2 (la bande basse est non spécifique). **b** Les mêmes immuno-précipitations révélées par l'anti-PSTAIRE (reconnaissant un motif conservé des CDK, la bande basse est non spécifique). **c** Activités H1 kinase sur ces immuno-précipitations.

3.3 Recherche de partenaires de la cycline B variante.

Afin de mieux comprendre la fonction du variant d'épissage de la cycline B, mais aussi afin de trouver de nouvelles voies de régulation de la cycline B indépendantes de Cdc2, Les partenaires possibles du variant d'épissage ont été recherchés. Pour cela deux techniques ont été utilisées : le double hybride dans la levure et la chromatographie d'affinité.

3.3.1 Recherche de partenaires par criblage en double hybride.

Utilisation des protéines entières comme appât.

Un ciblage a d'abord été réalisé en utilisant comme appât les protéines cycline B et cycline B variante entières. La banque utilisée à été préparée par la société Clontech à partir d'ARN extraits de gonades, d'ovocytes et de larves d'étoile de mer *Marthasterias glacialis*. La cycline B entière clonée dans les vecteurs pGBKT7 ou pBTM116 est toxique pour les levures et donc inutilisable en double hybride. Un premier criblage utilisant comme appât la cycline B variante clonée dans le pGBKT7 a donné environ 70 clones qui après vérifications se sont tous révélés être des faux positifs (1,5 millions de clones ont été criblés). Un second criblage utilisant comme appât la cycline B variante clonée dans le pBTM116 n'a pas permis l'obtention de clones positifs (2 millions de clones ont été criblés).

Criblage avec un appât muté au niveau du site de localisation.

Une hypothèse vraisemblable pour expliquer ces résultats négatifs serait une mauvaise localisation de notre appât qui n'irait pas dans le noyau, où l'interaction doit se produire. La cycline B possède en effet en N-terminal un signal de rétention cytoplasmique (CRS, dont la séquence est en figure 30). Pour inactiver ce CRS, les 4 Sérines qu'il contient ont été mutées en Alanines ce qui a pour effet de rendre la cycline constitutivement nucléaire (Kong, Barnes et al. 2000). Malheureusement la mutation du CRS ne change pas le comportement en double hybride ni du N-terminal seul, ni de la protéine entière.

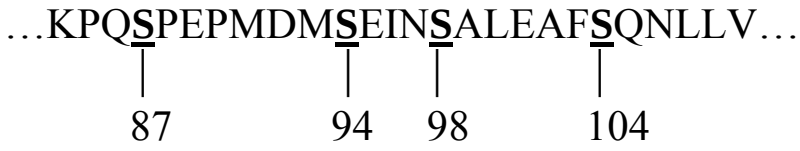
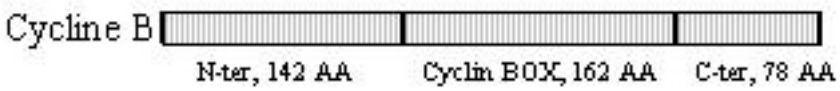


Figure 30 : Séquence du signal de rétention cytoplasmique (CRS) et position des résidus mutés.

Criblage avec la cycline B tronquée.

Il est fréquent que lors de criblages en double hybride de bons résultats soit obtenus en utilisant comme appât des portions de protéine. La cycline B variante a donc été coupée en trois fragments. Le fragment N-ter code la partie qui commence à l'ATG et va jusqu'au site EcoRI soit 142 acides aminés. Le fragment central comprend la partie qui code la cyclin Box et va du site EcoRI au site PvuII soit 162 acides aminés. Le fragment C-ter code la partie qui va jusqu'au stop et démarre au site PvuII, soit 78 acides aminés. Ces trois fragments ont étés clonés en phase avec LEXA dans le pBTM116 et testés en double hybride. Aucun de ces fragments n'a permis l'obtention de clones positifs en double-hybride (figure 31) et deux d'entre eux activent de façon autonome les gènes rapporteurs.



- N-ter : transactivateur.
- Cyclin Box : transactivateur.
- C-ter : 1,75 millions de clones criblés, aucun clone positif.

Figure 31 : Fragments de la cycline B utilisés en double hybride, et résultat des criblages.

Criblage avec la cycline B humaine.

La cycline B2 humaine a également été testée en double hybride, dans l'équipe de J.Camonis à l'institut Curie (INSERM U528). La cycline B2 entière est, comme la cycline B d'étoile de mer, toxique pour les levures. Deux criblages ont été réalisés avec la cycline B2 variante, le premier par complémentation sur une banque placentaire (20 millions de clones criblés), le second en co-transformation sur une banque issue de cellules de Jurkat (1,8 millions de clones criblés). Aucun de ces criblages n'a donné de clones positifs.

3.3.2 Recherche de partenaires par double hybride dirigé.

En 1998 a été publiée l'interaction entre la cycline B2 humaine et le récepteur au TGFβ de type 2 (Liu, Wei et al. 1999). Afin de vérifier cette interaction et d'examiner si elle reste la même avec la cycline B2 variante, un fragment d'ADNc codant la partie cytoplasmique du récepteur a été amplifié par PCR à partir d'ARN placentaire et a été cloné dans le vecteur pGBKT7. L'interaction a été testée avec la cycline B2 et son variant, en double hybride dirigé ainsi qu'en immuno-précipitation sur les protéines traduites *in vitro*. Aucune interaction n'a pu être mise en évidence avec l'une ou l'autre de ces techniques (résultats non montrés).

Sur la cycline B on trouve un motif nécessaire à l'interaction entre le MPF et CDC25 (Zheng and Ruderman 1993). Pour examiner si cette interaction passe directement par une association avec la cycline B, CDC25c de xénope (don du CRBM, Montpellier) a été cloné dans le vecteur pGBKT7 et cette interaction a été testée à la fois en double hybride dirigé et en immuno-précipitation sur les protéines traduites *in vitro*. Là encore aucune interaction n'a pu être mise en évidence (résultats non montrés).

3.3.3 La cycline B et RLIP76.

Au cours de sa thèse dans l'équipe de J.Camonis (INSERM U528), Carine Rossé à trouvé la cycline B lors d'un criblage en double hybride utilisant comme appât la protéine RLIP76, ce criblage a été réalisé chez la drosophile. Cette protéine est un effecteur de la GTPase Ral et a deux rôles. Lors de l'interphase elle est impliquée dans l'endocytose, alors que pendant la mitose elle est localisée au centrosome et sur les microtubules du fuseau sans que sa fonction soit bien connue. Sa déplétion conduit à des fuseaux monopolaires et à des catastrophes mitotiques (Quaroni and Paul 1999).

Afin de monter la conservation de cette interaction chez l'humain, les constructions permettant de tester en double hybride dirigé l'interaction entre RLIP et les cyclines B1, B2 humaines et leur variants ont été fournies à J.Camonis. Ce test a confirmé chez l'humain l'interaction trouvée chez la drosophile (figure 32). Une interaction a aussi été mise en évidence entre RLIP et les variants de cycline B, particulièrement celui de la cycline B1. Dans le cas de la cycline B2 et de son variant, l'interaction a été testée avec la cycline délétée de 137 acides aminés en N-terminal par coupure au niveau d'un site EcoRV interne, à cause de la toxicité de la forme entière.

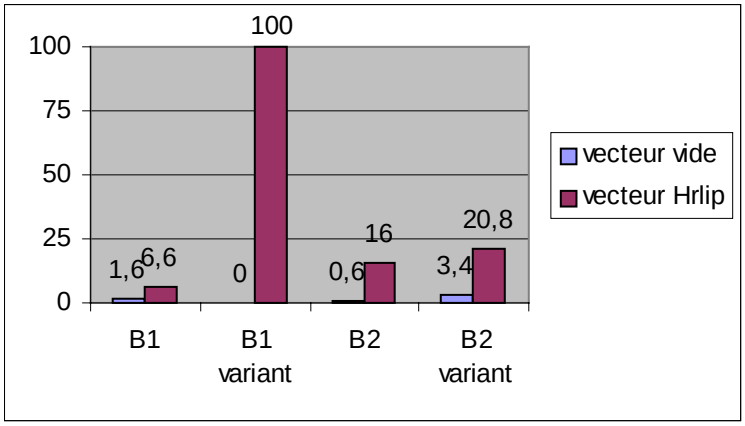


Figure 32 : Interaction entre RLIP et les cyclines B humaines. Les levures sont transformées avec un vecteur contenant l'une des cyclines B et soit le vecteur contenant RLIP, soit un vecteur contrôle. Le pourcentage des clones poussant en D-LW qui poussent aussi en D-LWH est indiqué, pour B1 variant ce calcul porte sur un faible nombre de clones. Ces interactions ont été confirmées en test X-gal.

Ils ont également montré que RLIP s'associe au MPF et qu'elle est associé à une activité kinase. En interphase, RLIP est associée à un complexe participant à l'endocytose, l'association entre la cycline B et RLIP en mitose modifie ce complexe. La phosphorylation par Cdc2 de l'Epsin, qui fait partie de ce complexe, l'inactive. L'Epsin se dissocie alors du complexe d'endocytose. L'interaction entre RLIP et la cycline B participerait donc à l'inactivation des complexes d'endocytose pendant la mitose et pourrait également cibler le MPF vers d'autres substrats.

3.3.4 Recherche de partenaires en chromatographie d'affinité.

Tout d'abord, la protéine recombinante Cycline B variante d'étoile de mer a été produite en bactéries. Elle a ensuite été purifiée par filtration sur gel, les fractions les plus pures ont été utilisées pour réaliser la colonne de chromatographie. Comme cette protéine n'a pu être produite soluble, elle a été couplée à la colonne dénaturée dans le chlorure de guanidine. La chromatographie en elle même a été réalisée en passant sur la colonne des extraits protéiques d'ovocytes d'étoile (Maturés 40 minutes), puis en éluant cette colonne avec des tampons de plus en plus stringents, les profils des différentes élutions sont montrés en figure 33.a.

a **b**

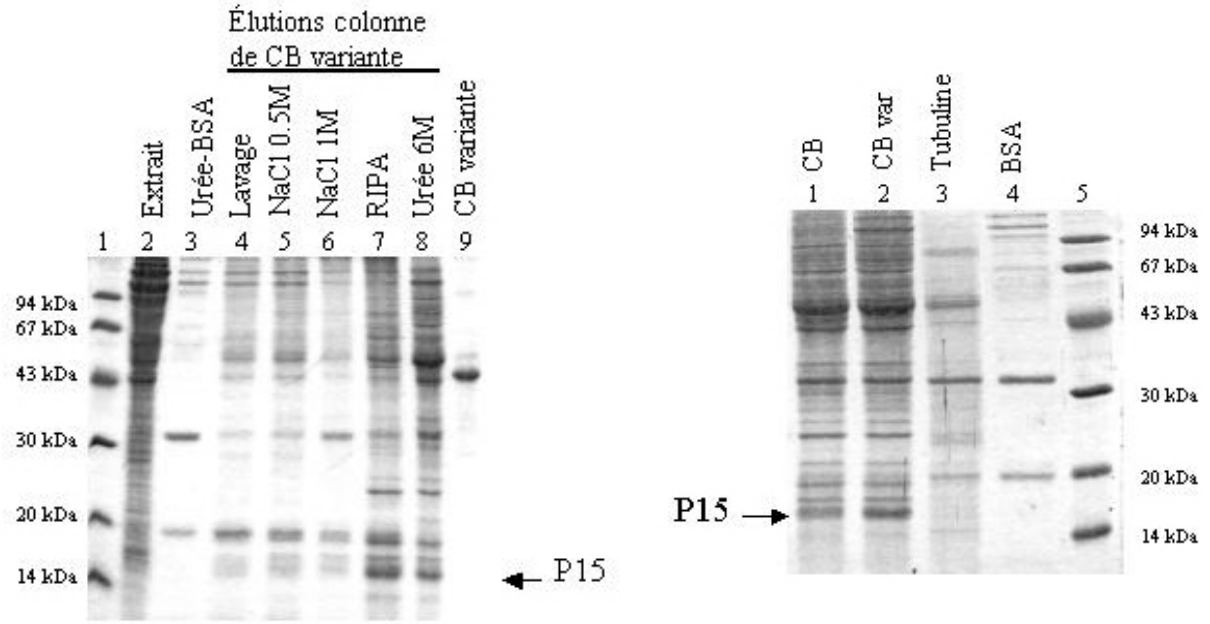


Figure 33 : Résultat de la chromatographie d'affinité sur la cycline B variante. **a** Chromatographie sur colonne de cycline B variante. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : extrait total d'ovocytes. Piste 3 : élution urée d'une colonne de BSA. Pistes 4 à 8, élutions de la colonne de cycline B variante, dans l'ordre : lavage, élution NaCl 0.5M, NaCl 1M, RIPA, urée 6M. Piste 9 : cycline B variante recombinante utilisée pour la colonne. **b** Comparaison des élution urée d'une colonne cycline B (piste 1), cycline B variante (piste 2), tubuline (piste 3), et BSA (piste 4), le marqueur de poids moléculaire est en piste 5.

La comparaison du profil d'élution obtenu en électrophorèse SDS-Page entre les chromatographies réalisées avec une colonne de cycline B variante, de cycline B normale, d'α-tubuline, de BSA permet de repérer les bandes spécifiques de l'une de ces colonnes (figure 33.b). Ces chromatographies ont été effectuées simultanément et dans les mêmes conditions. Cette comparaison a permis d'identifier une protéine d'environ 15kDa qui constitue la principale bande spécifiquement retenue sur les colonnes de cycline B, qu'elle soit normale ou variante. D'autres bandes semblent spécifiques mais leur faible abondance ne permet pas leur purification.

Cette bande à 15kDa ainsi détectée a été isolée puis micro-séquençée (par J.Derancourt, CRBM Montpellier). Six peptides ont été obtenus, certains d'entre eux sont partiellement chevauchants, ce qui permet de déduire les 4 peptides présentés en figure 34.

```
DPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDL     (composite pept. B,E)
DGRWGMYNVKGR                       (peptide A)
SIGSSLCSLGQMANAWR                  (peptide F)
TYTISSGECYTTTTVIIIPVNIIPNTPRPNASSK(composite pept. C,D)
```

Figure 34 : Peptides issus du micro-séquençage de la P15 (origine J.Derancourt).

3.4 Identification de la P15.

La chromatographie d'affinité a permis d'isoler une protéine de 15kDa qui interagit avec la cycline B. Pour connaître les propriétés de cette molécule, il était nécessaire de l'identifier. Pour cela son ADNc a été cloné et un polymorphisme a pu être mis en évidence. L'origine de cette variabilité a été étudiée.

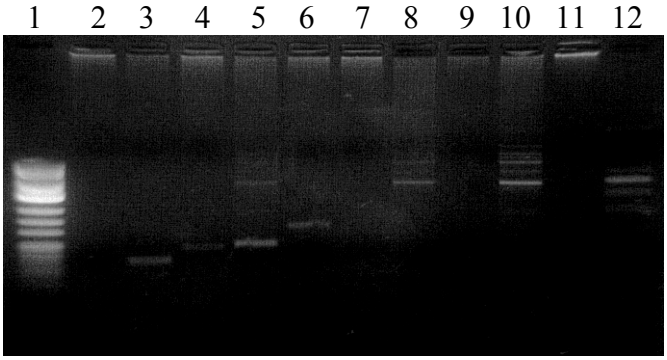
3.4.1 Clonage de la P15.

A partir des séquences peptidiques obtenues lors du micro-séquençage, des amorces dégénérées ont étés définies et utilisées pour isoler des fragments de l'ADNc par RT-PCR (figure 35.a). Les fragments obtenus étant partiellement chevauchants, une séquence de 250pb correspondant à environ un tiers de la P15 a pu être déduite.

a

A1:	tggggNatgtaYaaYgtNaa		A2:	aaNacRttRtacatNcccct
B1:	gaYaaRtaYgaRgcNaaYga		B2:	tcRttNgcYtcRtaYttRtc
C1:	ggNgaRTgYtaYacNacNac		C2:	gtNgtNgtRtaRcaYtcNcc
D1:	gtNaaYatHatHccNaaYac		D2:	gtRttNggDatDatRttNac

b



c

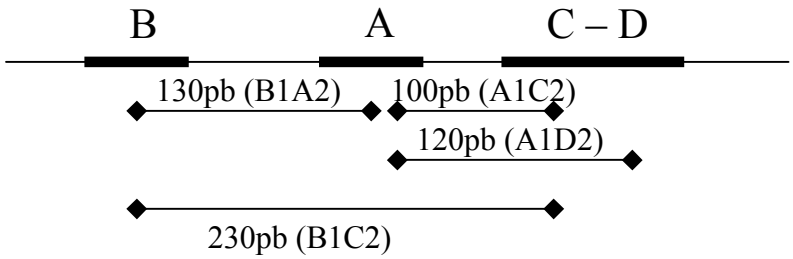


Figure 35 : **a** Amorces dégénérées utilisées pour la RT-PCR (5'-3') [N=a,c,t,g ; Y=c,t ; R=a,g ; D=a,g,t ; H=a,c,t], 1: amorce sens, 2: amorce anti-sens. **b** Amplification en RT-PCR avec les couples d'amorces suivants, dans l'ordre des pistes : marqueur, A1-B2, A1-C2, A1-D2, B1-A2, B1-C2, B1-D2, C1-A2, C1-B2, D1-A2, D1-B2, contrôle sans matrice (amorces B1-A2). Migration sur gel d'agarose 2%. **c** Positionnement des différents peptides déduit des RT-PCR et taille des fragments obtenus.

A partir du fragment de séquence de 250 pb ainsi obtenu, des amorces spécifiques ont été synthétisées pour cloner les extrémités du messager par des réactions de RACE 5' et 3'. La réaction de RACE 5' donne 2 bandes de 400 et 800 pb (figure 36.b), seule la bande de 400 pb est spécifique, l'autre est une auto-amplification avec l'amorce utilisée. Ce RACE permet d'obtenir l'ATG et donc le début de la protéine plus 144 pb de partie non traduite. La réaction de RACE 3' a donné deux bandes, qui sont toutes deux spécifiques (figure 36.b). La bande de 1000 pb permet d'atteindre le codon stop et donne 747 pb de partie non traduit en 3', jusqu'au poly A. La bande de 900 pb correspond à un site de poly-adénylation interne. L'assemblage de ces séquences nous donne l'ADNc complet de la P15 qui fait donc 1320 pb et est présenté dans l'annexe 3.

a

R31 : gagtattggctcgtcgctttgttccctg
R51 : catgccccagcgtccgtcatagtagttg



b

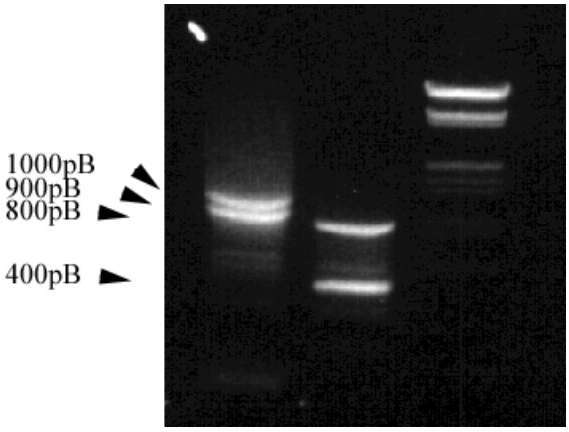


Figure 36 : Résultats des réactions de RACE 3' et 5'. **a** Amorces utilisées pour le RACE 3' (R31) et 5' (R51) ainsi que leur position sur l'ARNm de la P15 (le fragment obtenu initialement par RT-PCR est en grisé). **b** Profil obtenu par migration sur gel d'agarose 1% (RACE 3' – RACE 5' – marqueur).

3.4.2 Analyse de la séquence obtenue.

La séquence codante obtenue fait 429 pb et code une protéine de 143 acides aminés. La protéine déduite de la séquence de l'ADNc contient bien tous les peptides issus du micro-séquençage (doublement soulignés dans la figure 37). Par contre elle ne présente d'homologie significative avec aucune des protéines connues et présentes dans les bases de données. L'analyse plus précise de la séquence protéique montre la présence de sites possibles de phosphorylation par Cdc2 et l'existence d'un domaine riche en prolines.

MIHKLVLILSVVATASAFLPIPPPA*DPIDCPNKYTY*

*SFSRYSICL**SPDK**YEANDL*ASAQTYCK*SIGSSLCSL*

*GQMANAWR*HNYY*DGRWGMYNVKGR*DARVSSCG*TYTK*

*SSGECYTTTTVIIIPVNII**PNTP**RPNAQQK*AYCCS*

Figure 37 : Séquence protéique déduite de la P15. Les sites potentiels de phosphorylation sont en gras, les zones correspondants aux peptides issus du micro-séquençage sont en italique et doublement soulignés, le domaine riche en prolines est souligné.

3.4.3 Amplification de la région codante de la P15.

L'amplification par RT-PCR (à partir d'ARN d'œufs fécondés), à l'aide d'amorces hybridant sur l'ATG et le codon stop, donne une bande à la taille attendue (450 pb environ). Le séqueçage de douze clones indépendants fait apparaître des divergences de séquences entre eux. Trois types de clones ont alors été définis :

- Le type I, correspondant exactement à l'ADNc décrit précédemment.
- Le type II, comportant essentiellement une délétion par rapport au précédent.
- Le type III, plus éloigné, comportant principalement deux zones de divergence bien visibles sur l'alignement de la figure 38.b.

L'alignement de ces clones en acides nucléiques est montré en annexe 4. Aucune des différences de séquences de ces clones n'introduit de changement de phase ou de codon stop. Les protéines déduites sont donc proches les unes des autres, comme le montre l'alignement de la figure ci-dessous. Il convient de noter que seul le type I comprend la totalité des peptides issus du micro-séquençage.

a

```
      P15_atg :   catatgattcacaagttggtgctgattttga    (ajoute le site NdeI)
      P15_stop:   ggatccctagctacagcagtaagccttttgctg  (ajoute le site EcoRI)
```

b

```
P15I_          MIHKLVLILSVVATASAFLPIP-PPADPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDLASAQ
P15II_         MIHKLVLILSVVATTSAFIFT-----DPIDCPKKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDLASAQ
P15III_        MIHKLVLILSVVATASALIGMIGKPAKPFDCPNRKTYASSQYSICLSPDKYEANDLESAQ
Micro seq                                 DPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDL

P15I_          TYCKSIGSSLCSLGQMANAWRHNYYDGRWGMYNVKGRDARVSSCGTYTKSSGECYTTTTV
P15II_         TYCKSIGSSLCSLGQMANAWRHKYYDGRWGMYNVKGRDARVSSCGTYTKSSGECYTTTTV
P15III_        AYCQSFGSSLCSLGQMASSWRHNYYDERWGMYNVKGRDARVTPCRTYTISSGECYTSTPG
Micro seq          SIGSSLCSLGQMANAWR    DGRWGMYNVKGR        TYTKSSGECYTTTTV

P15I_          IIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
P15II_         IIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
P15III_        FATGNRIIPNTPRPNAQQKAYCCS
Micro seq      IIIPVNIIPNTPRPNASSK
```

Figure 38 : **a** amorces utilisées pour amplifier l'ORF. **b** Alignement des séquences protéiques des trois types de P15 déduits des trois types d'ADNc obtenus, en gras les résidus qui divergent par rapport à la P15 de type I. En dessous sont indiqués les peptides issus du micro-séquençage (Micro seq). Au niveau du dernier peptide, la différence de séquence trouvée (QQ au lieu de SS souligné dans le peptide), peut s'expliquer par une erreur due à la longueur du peptide micro-séquencé.

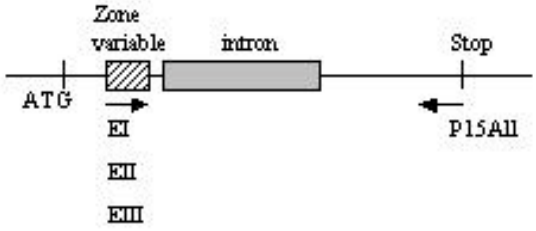
3.4.4 Ces trois formes sont-elles des gènes différents ou des allèles ?

Pour déterminer si ces trois types de P15 sont issus de gènes différents ou représentent des allèles d'un même gène, la structure du gène codant les trois types de P15 a été examinée. Pour cela des PCR sur l'ADN génomique ont étés réalisées en utilisant une amorce commune aux P15 I, II et III : P15All et une amorce spécifique pour chaque forme, hybridant juste au niveau de la zone la plus divergente entre les trois formes (EI, EII, EIII, figure 39.a). Les amplifications sont de tailles légèrement différentes, mais après séquençage complet des bandes il s'avère que pour les trois formes de P15, il y a un seul intron dans cette partie du gène. Dans les trois cas l'intron est à la même place dans le gène et les séquences des trois introns sont très voisines, elles diffèrent surtout par des insertions ainsi que par la longueur d'un poly T (les séquences introniques sont présentées en annexe 5). Selon l'individu dont provient l'ADN génomique (16 individus ont étés testés), on arrive à amplifier soit une soit

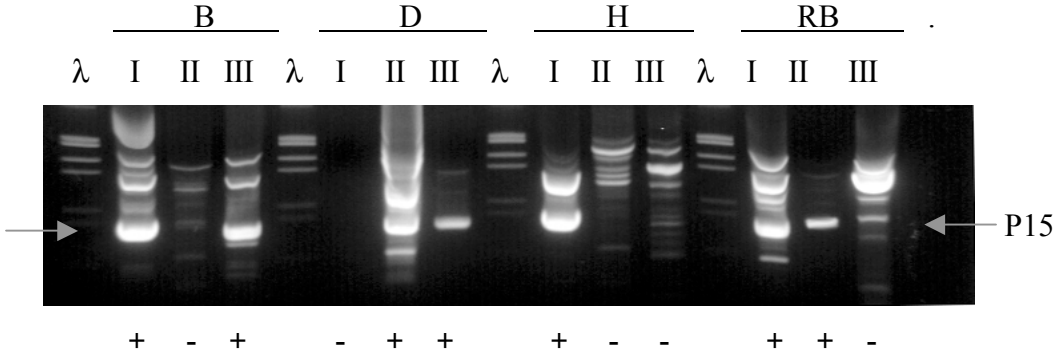
deux des formes de P15. Les amplifications obtenues pour 4 de ces individus sont montrées en figure 39.b.

a

```
P15All:ccatggaacagcagtaagccttttgctgagcattagg   (ajoute le site NcoI)
               *  C  Y  A  K  Q  Q  A  N  P
P15I: EI-gaattcgtttttgcccatccctcctccagca       (ajoutent le site EcoRI)
              F  L  P  I  P  P  P  A
P15II: EII-gaattcacgtctgcatttattttcaccgaccc
              T  S  A  F  I  F  T  D  P
P15III: EIII-gaattcttgattggcatgattggaaaacca
               L  I  G  M  I  G  K  P
```



b



c

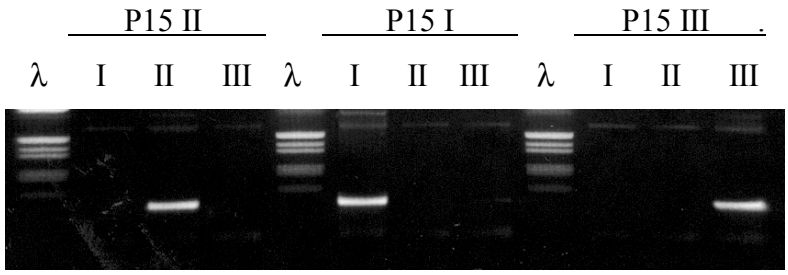
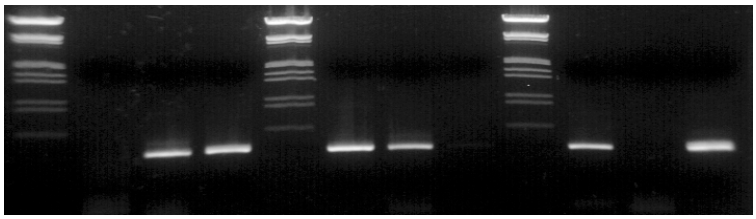


Figure 39 : **a** Amorces utilisées pour les PCR et leur position. **b** PCR sur l'ADN génomique de plusieurs individus (B, D, H, RB) utilisant les couples d'amorces suivants : (P15All-EI: I) (P15All-EII: II) et (P15All-EIII: III). λ : Marqueur de poids moléculaire. **c** Contrôle de spécificité des amorces : mêmes PCR sur les trois ORF clonés dans le pGemT.

Pour confirmer ce résultat, les ARN messagers et les protéines présentes chez 13 individus femelles ont été examinés en parallèle. La présence des messagers correspondant aux P15 I, II et III a été examinée par RT-PCR, réalisées en utilisant le kit TITAN et avec les amorces utilisées sur ADN génomique. La présence des différentes P15 parmi les protéines a été examinée en utilisant des anticorps spécifiques de l'une ou l'autre des formes (anti-P15I et anti-P15III) ainsi qu'un anticorps consensus reconnaissant les trois formes (anti-P15cons). Pour 11 individus sur 13 les résultats sont concordants entre RT-PCR et Western Blots (les deux individus restants présentent des contaminations au niveau des RT-PCR). Les résultats obtenus pour trois des individus sont montrés en figure 40.

a individus: 4 9 10.

λ I II III λ I II III λ I II III



b anti-peptide P15I, dirigé contre le peptide LPIPPPADPIDC

anti-peptide P15III, dirigé contre le peptide IGMIGKPACKC

anti-peptide P15cons, dirigé contre le peptide CRWGMYNVHGRDARV

c

anti-P15III anti-P15I anti-P15cons.

individus: 4 9 10 4 9 10 4 9 10

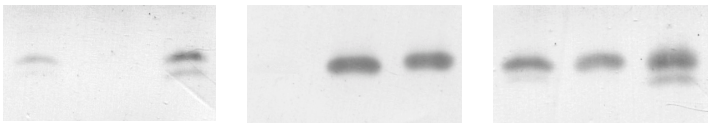


Figure 40. RT-PCR et western blots sur les individus numéro 4, 9 et 10. **a** RT-PCR, utilisant les mêmes amorces que pour les PCR sur l'ADN génomique . **b** anticorps utilisés. **c** Western blots sur les protéines des mêmes individus, anti-P15III (à gauche), anti-P15I (au milieu), anti-P15cons (à droite).

3.5 Caractérisation de la P15.

Pour tenter de comprendre la fonction de la P15, son abondance au cours du cycle cellulaire, ainsi que sa phosphorylation ont été étudiés. Sa liaison avec la cycline B a également été vérifiée. Pour préciser son rôle éventuel dans le cycle cellulaire, son interaction avec certains régulateurs du cycle cellulaire a été examinée.

3.5.1 Abondance des P15 *in vivo*.

Ces Western blots ont étés effectués avec l'anticorps anti-P15cons qui reconnaît les trois formes de P15 (I, II et III), sur des extraits provenant d'une étoile de mer possédant les deux formes I et III. Aucune variation d'abondance des P15 n'a été détectée, que ce soit pendant la maturation méiotique ou pendant les cycles d'embryogenèse précoce (figure 41).



Figure 41 : Abondance des P15 *in vivo*. **a** Western blot anti-P15cons sur les extraits d'ovocytes en maturation (temps en minutes après application de 1-MetAde). **b** Western blot anti-P15cons sur les extraits d'œufs en développement précoce (temps après 1-MetAde, la fécondation a lieu au temps 50 minutes, Bla : larves au stade blastula).

3.5.2Présence d'un peptide signal.

Les programmes d'analyse de séquence ont montrés en N-terminal de la P15 la présence d'un peptide signal potentiel (www.smart.embl-heidelberg.de, une prédiction de peptide signal pour la P15I est montrée en figure 42). Ce peptide hydrophobe de 17 acides aminés pourrait être clivé pendant la formation de la protéine. En effet la P15 retenue sur la colonne de cycline B a été presque entièrement micro-séquencée sans que ce peptide signal n'apparaisse. De plus, un anticorps dirigé spécifiquement contre le peptide signal (anti-peptide : MIHKLVLILSC) ne reconnaît ni la protéine fixée sur la colonne ni aucune protéine des extraits totaux d'œufs (résultats non montrés). Cette séquence est bien conservée, et les prédictions d'un peptide signal sont les mêmes pour les trois formes de P15.

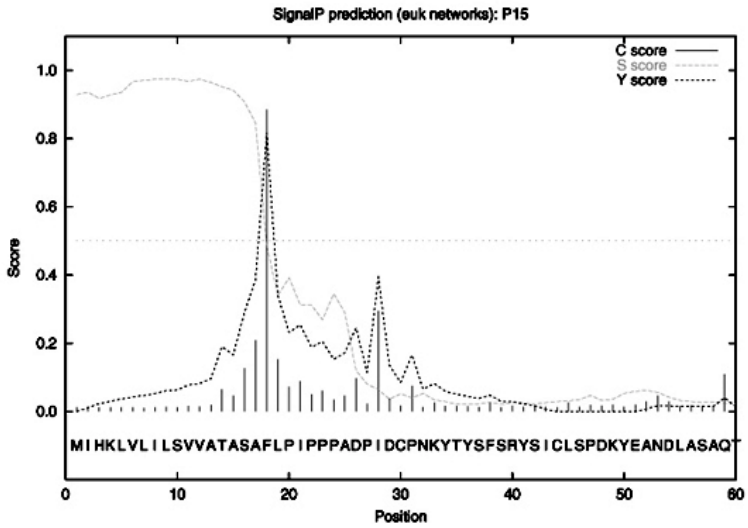


Figure 42. prédiction de la position du peptide signal de la P15I (www.CBS.dtu.dk). C score : probabilité de clivage. S score : probabilité de faire partie du peptide signal. Y score : donnée composite des deux scores précédents.

3.5.3Recherche d'une phosphorylation de la P15.

La présence de sites potentiels de phosphorylation par Cdc2 sur la P15 nous a conduit a examiner sa phosphorylation pendant la maturation des ovocytes d'étoile de mer. Pour appuyer cette hypothèse, M.Dorée et son équipe avaient identifié une protéine d'environ

16kDa comme étant fortement phosphorylée lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer (Doree, Cavadore et al. 1981). Des ovocytes ont étés incubés avec du phosphate radioactif puis la maturation est induite par la 1-methyl adénine. Les protéines ayant été phosphorylées sont ensuite révélées par autoradiographie. L'immuno-précipitation anti-P15 n'a pas permis de mettre en évidence une éventuelle phosphorylation (figure 43.b). L'immuno-précipitation anti-cycline B permet de montrer la phosphorylation de la cycline pendant la maturation méiotique ainsi que celle de Cdc2 qui est associé avec la cycline B.

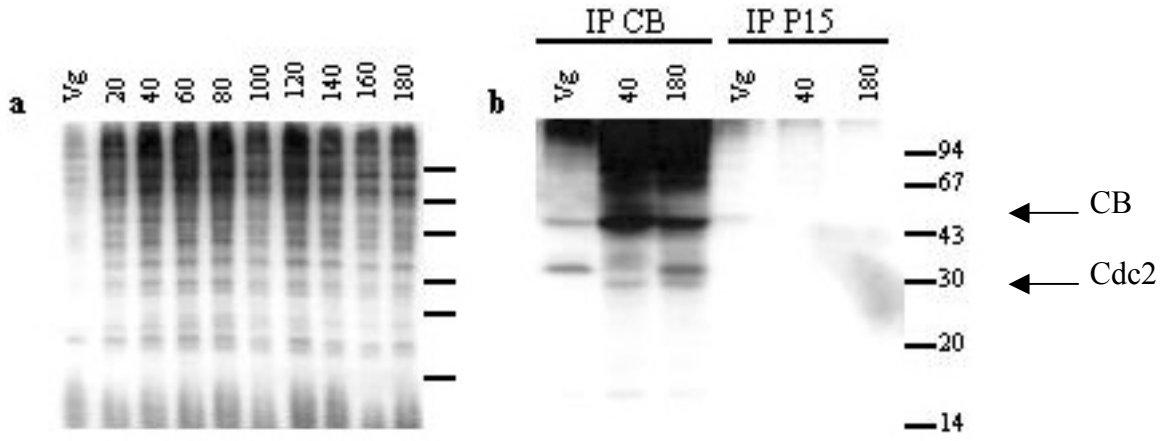


Figure 43 : **a** Phosphorylation des protéines totales au cours de la maturation méiotique. **b** Immuno-précipitations anti-cycline B et anti-P15, montrant la phosphorylation de la cycline B pendant la maturation et l'absence de phosphorylation visible de la P15.

3.5.4 Vérification de l'interaction entre P15 et Cycline B.

Pour vérifier l'existence d'une interaction entre la P15 et la cycline B, des immuno-précipitations ont été réalisées. La P15 n'a pu être mise en évidence dans les immuno-précipités cycline B et respectivement, la cycline B n'a pu être mise en évidence dans les immuno-précipités P15 (figure 44). Un test d'interaction en double hybride dirigé a été effectué en parallèle mais n'a pas donné de résultats, l'ORF de la P15 clonée dans les vecteurs double hybride active seule les gènes rapporteurs et ne peut donc pas être utilisée.

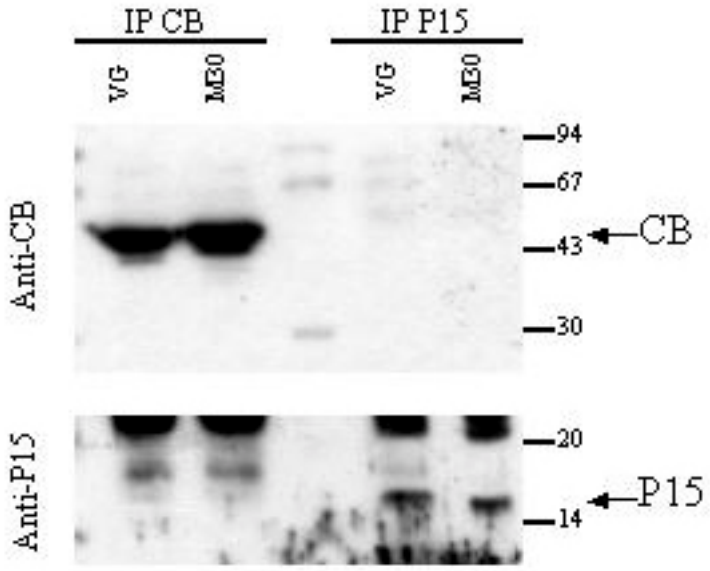


Figure 44 : Immuno-précipitations anti-P15 et anti-Cycline B révélées avec les anticorps anti-P15 et anti-cycline B.

Une autre technique a alors été employée pour mettre cette interaction en évidence, le GST pull-down. La protéine de fusion P15-GST a été produite en bactérie de façon soluble. La P15 a été clonée sans le peptide signal, en effet si ce dernier était présent son clivage éventuel viendrait perturber la production de la protéine de fusion, la GST étant en fusion N-terminale. La P15-GST recombinante a été fixée sur des billes de gluthation-sépharose. Ces billes ont ensuite été incubées avec un extrait protéique d'ovocytes d'étoile de mer. Les billes de P15-GST ont spécifiquement retenu la cycline B mais aucune fixation de Cdc2 n'est apparente (figure 45).

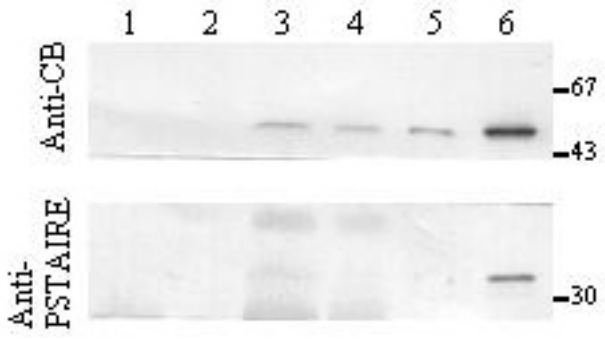


Figure 45 : GST pull-down. Piste 1, contrôle pull-down sur GST seule. Piste 2, même contrôle dilué 5 fois. Piste 3, pull-down sur P15III-GST. Piste 4, pull-down sur P15I-GST. Piste 5, témoin phase p13Suc1 sur les mêmes extraits d'ovocytes. Piste 6, même phase Suc, 5 fois plus concentrée.

3.5.5 Importance de Cdc2 dans l'interaction entre P15 et la cycline B.

Cdc2 est le partenaire de la cycline B dans le MPF. Pour préciser la relation de la P15 et du MPF, l'importance de Cdc2 dans l'interaction entre la P15 et la cycline B a été examinée. La protéine recombinante de fusion P15-GST a été incubée sur une colonne de cycline B, normale ou variante, et donc en l'absence complète de Cdc2. La P15 est alors spécifiquement retenue sur les deux colonnes comme le montre la figure 46, l'interaction entre P15 et la cycline B est donc indépendante de la présence de Cdc2.

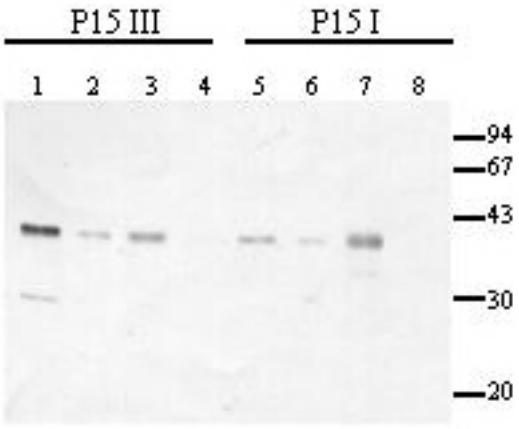


Figure 46 : Fixation directe de la P15 sur les colonnes de cycline B. Piste 1, protéine recombinante P15III-GST. Piste 2, incubation de la P15III-GST avec la colonne de cycline B. Piste 3, même incubation avec la colonne de cycline B variante. Piste 4 même incubation avec une colonne de BSA. Les pistes 5 à 8 sont équivalentes aux pistes 1 à 4 mais pour la P15I.

3.5.6 Interaction entre P15 et Cdk5.

L'existence d'une association entre la P15 et Cdk5 a également été examinée. En effet pendant ce travail, l'équipe de L.Meijer a publié la séquence d'une proteine correspondant à la P15, ils avaient préalablement montré son interaction avec Cdk5 (Azzi, Meijer et al. 1994). Aucune association entre ces deux protéines n'a été détectée par immuno-précipitations

(figure 47.a). De même, en GST-pull down, dans les conditions où la cycline B se fixe sur les billes de P15-GST, aucune fixation de Cdk5 n'a pu être mise en évidence (figure 47.b).

a **b**

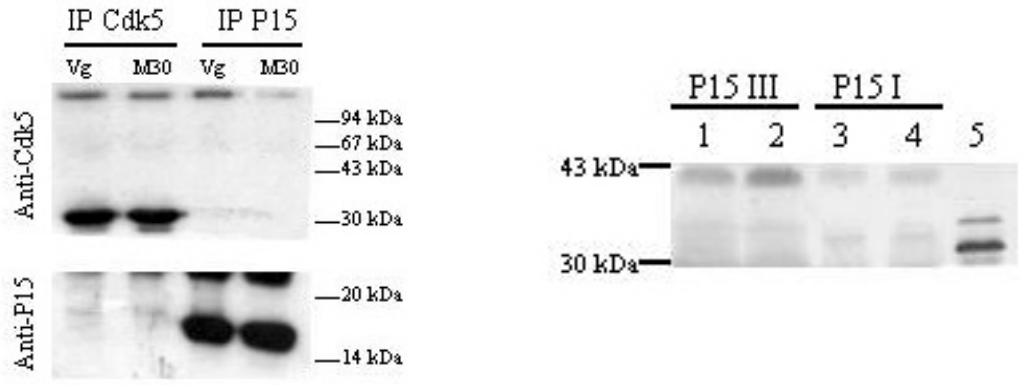


Figure 47 : Examen de l'association entre la P51 et Cdk5. **a** Immuno-précipitation anti-Cdk5 et anti-P15I, révélées anti-Cdk5 et anti-P15I. **b** Western blot anti-Cdk5, piste1 : pull-down GST-P15 III, piste 2 : GST-P15III sépharose seule, Piste 3 et 4 : les mêmes que les pistes 1 et 2 mais pour la P15I, piste 5 : immuno-précipitation anti-Cdk5.

3.5.7 Comportement de la P15 *in vivo*.

La présence sur la P15 d'un signal d'adressage, pose la question de son association dans la cellules avec certaines membranes. L'examen du comportement de la P15 après ultracentrifugation dans des tampons contenant ou non des détergents (figure 49), montre que la P15 est toujours majoritairement soluble donc non liée aux membranes.

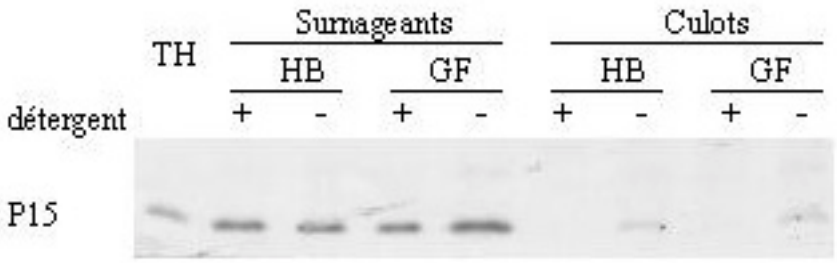


Figure 49 : Western blot anti-P15cons sur les culots et surnageants d'ovocytes obtenus après centrifugation 30 minutes à 100000g. Les ovocytes ayant préalablement été repris dans les tampons suivants : HB tampon utilisé pour la chromatographie d'affinité, GF tampon utilisé pour la filtration sur gel. Ces tampons étant préparés avec (+) ou sans détergent (-).TH est un extrait total témoin.

Afin de déterminer si la P15 est présente à l'intérieur de complexes macro-moléculaires, un extrait d'ovocytes a été fractionné en fonction du poids moléculaire (par gel filtration sur superose 6). La présence dans ces fractions de la P15 a été testée en western blot, il apparaît sur la figure 48.a, que la P15 n'est visualisée que dans les fractions correspondant aux protéines de faible poids moléculaire. La P15 est donc majoritairement monomérique dans la cellule.

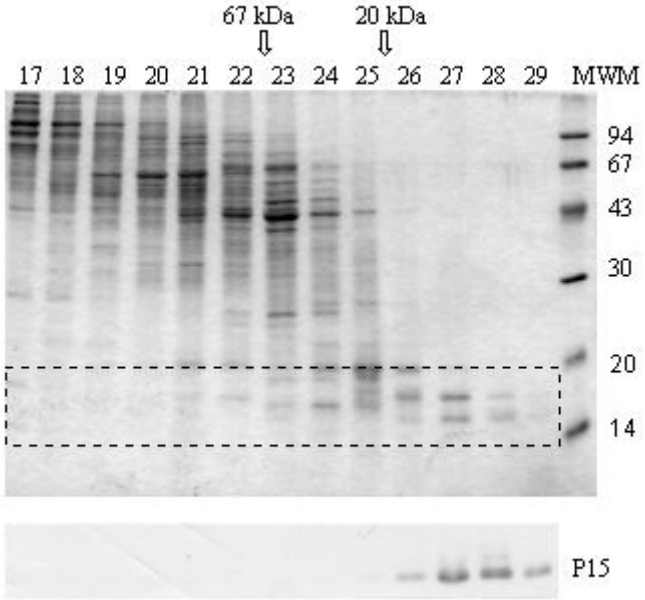


Figure 48 : Absence de la P15 dans les complexes macro-moléculaires. Coloration au bleu de coomassie des fractions numéro 17 à 29 d'un extrait d'ovocyte séparé selon le poids moléculaire par gel filtration. La position d'élution de protéines de calibrage est indiquée au dessus (BSA : 67kDa, SBTI : 20kDa). En dessous se trouve le western blot anti-P15cons fait sur la portion de gel encadrée en pointillés.

3.6 Localisation intra-cellulaire de la P15.

L'étude *in vivo* de la P15 a permis d'émettre des hypothèses sur sa fonction dans la sortie de division. Cette étude a été abordée par l'examen de sa localisation intra cellulaire ainsi que par l'examen de l'effet de la micro-injection de la P15 ou d'anticorps dirigés contre la P15.

3.6.1 Micro-injection d'ARNm.

Afin d'examiner le comportement *in vivo* de la P15, un ARN codant la P15 en fusion avec la eGFP a été injecté dans les ovocytes. La fusion entre la P15I et la eGFP a été clonée dans le plasmide pXen puis les ARNm ont été produits par transcription *in vitro* à partir de ce plasmide et ont été injectés dans les ovocytes d'étoile de mer, mais aucune fluorescence n'a été détectée. Ceci peut avoir plusieurs causes : soit les UTR présents dans le pXen (UTR de la β-globine de xénope) ne conviennent pas dans les ovocytes d'étoile de mer, soit l'activité de synthèse protéique est trop faible pour que la protéine soit détectable. La bonne qualité des messagers injectés a été vérifiée par leur traduction *in vitro* (figure 50).

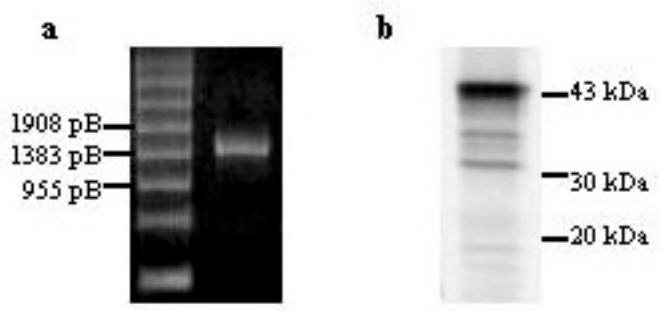


Figure 50 : Test de la qualité des ARN injectés. **a** Piste 1 : marqueur de poids moléculaire ARN. Piste 2 : ARN messager P15-GFP injecté (migration sur gel d'agarose 1% dénaturant). **b** Produit de la traduction *in vitro* à partir de ces ARN.

3.6.2 Immuno-localisation de la P15.

La localisation de la P15 dans les ovocytes d'étoile de mer a été examinée par immuno-localisation. La fixation des ovocytes au formaldehyde n'a pas permis de détecter une localisation nette de la P15. Par contre la fixation après extraction avec un détergent a permis de visualiser une distribution précise de la P15 à l'intérieur de la cellule.

Au stade vésicule germinative (VG), aucune localisation claire de la P15 n'a pu être établie, néanmoins il semble qu'elle soit présente au niveau des asters. Dans les ovocytes en maturation, la P15 est localisée au niveau du fuseau méiotique ainsi qu'au niveau du pôle extérieur du fuseau. Au moment de l'émission du premier globule polaire, la P15 est localisée au niveau de la jonction entre l'ovocyte et le globule polaire, où elle forme un anneau (figure 51). Les localisations observées sont les mêmes selon que l'on utilise l'anticorps anti-P15cons, l'anti-P15I ou l'anti-P15III, en fonction de l'allèle présent dans l'ovocyte (résultats non montrés).

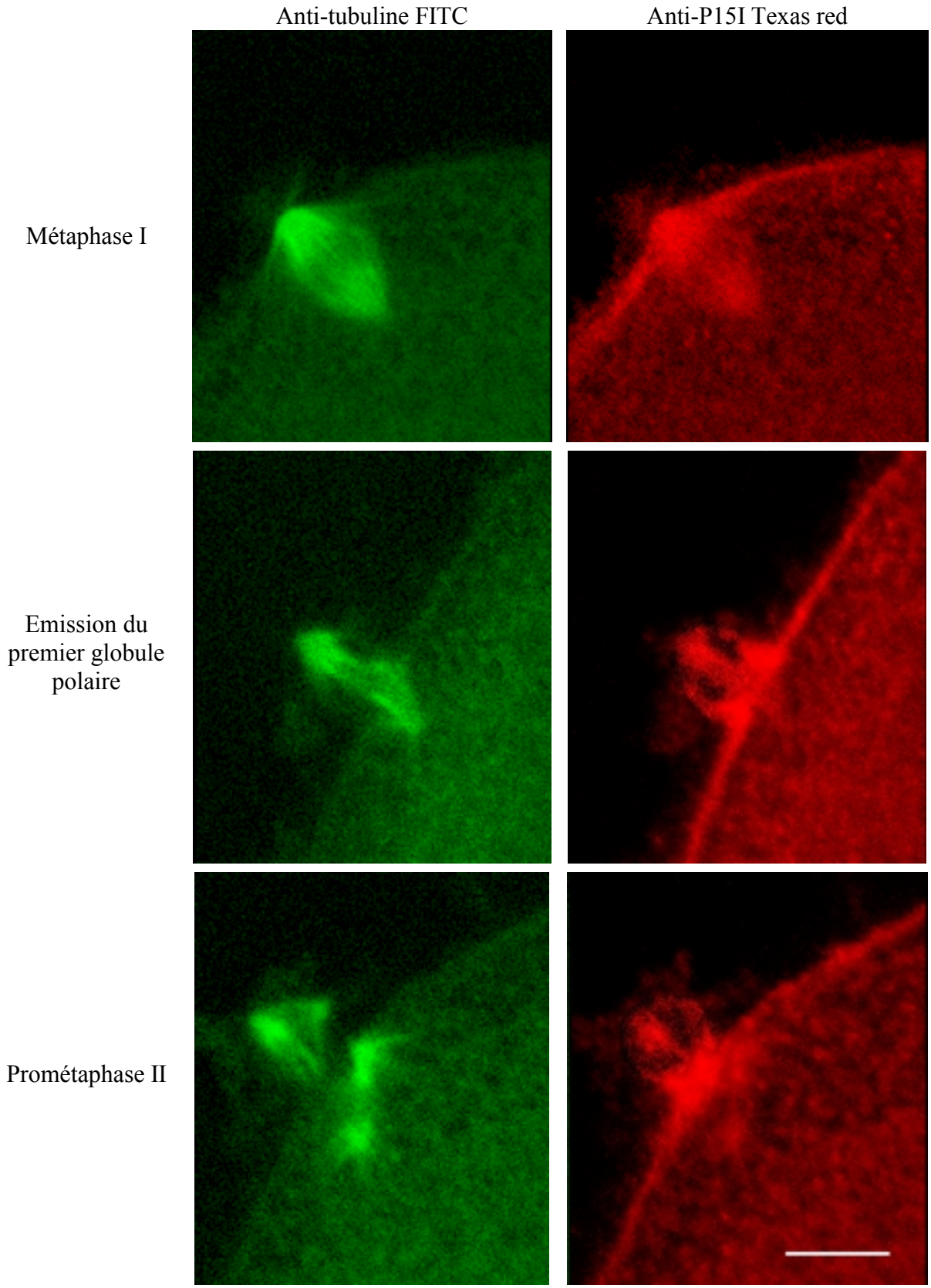


Figure 51: Localisation de la tubuline et de la P15I, dans les ovocytes d'étoile de mer,à 70 minutes après traitement à l'hormone (métaphase I), à 90 minutes (émission du premier globule polaire), à 100 minutes (prométaphase II). La barre d'échelle correspond à 10µm.

3.7 Recherche de la fonction de la P15 in vivo.

Le rôle possible de la P15 a été examiné par des expériences de micro-injection de la P15 recombinante ainsi que des anticorps anti-P15. La protéine de fusion GST-P15 concentrée a été injectée dans les ovocytes qui ont alors été traités à la 1-méthyl adénine pour déclencher la maturation. Les ovocytes injectés avec la P15-GST passent GVBD (la rupture de l'enveloppe nucléaire) de la même façon que les témoins injectés avec la GST seule mais contrairement aux témoins ils n'émettent jamais le premier globule polaire. De la même façon, une injection de la P15 après l'émission du premier globule polaire empêche l'émission du second globule polaire.

Un examen de l'activité histone H1 kinase présente dans les ovocytes micro-injectés montre que contrairement à ce qui se passe dans les œufs témoins, dans lesquels l'activité kinase liée au MPF baisse au cours du temps, l'activité du MPF reste élevée dans les ovocytes qui ont été micro-injectés avec de la P15-GST (figure 52).

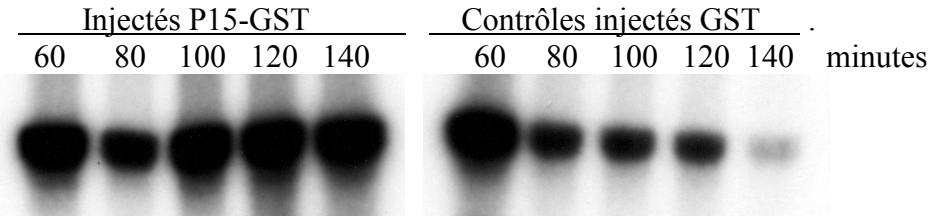


Figure 52. Effet de la micro-injection de la P15 sur l'activité H1 kinase présente dans les ovocytes. Autoradiographie de la phosphorylation de l'histone H1 par les extraits d'ovocytes fixés à des temps successifs après l'induction de la maturation.

Le marquage de l'ADN dans les ovocytes injectés avec la P15 montre que les chromosomes restent condensés au pôle animal (figure 53.a). Au même moment dans les ovocytes témoins, le pronucleus s'est reformé et les chromosomes sont décondensés, de plus les deux globules polaires ont été émis (figure 53.b).

Un effet similaire à celui résultant de la micro-injection de la protéine P15-GST, a été obtenu en micro-injectant dans les ovocytes les anticorps anti-P15I ou anti-P15III selon l'allèle présent à l'origine dans les ovocytes utilisés. La figure 52.c montre un marquage de l'ADN dans un ovocyte injecté par l'anticorps anti-P15, les chromosomes restent alors

condensés au pôle animal (mais moins dispersés que dans les ovocytes micro-injectés avec la protéine P15-GST) et l'émission des globules polaires n'a pas lieu.

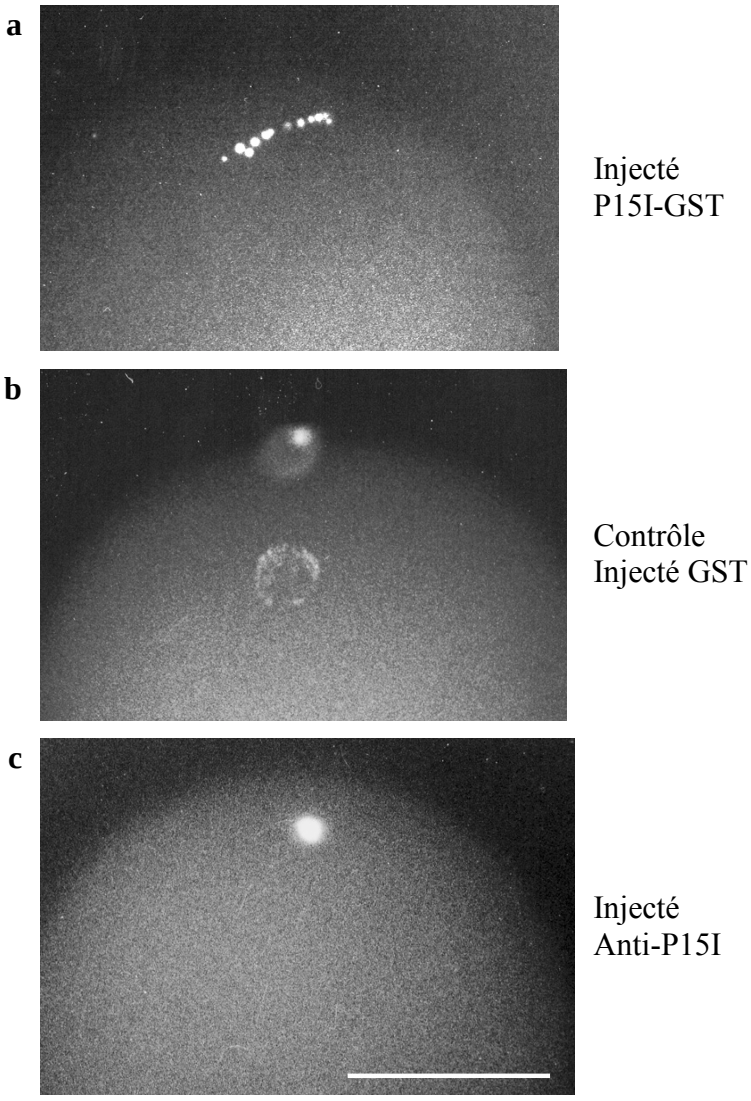


Figure 53 : Marquage de l'ADN (hoechst) d'ovocytes. **a** Ovocyte micro-injecté avec la P15I-GST. **b** ovocyte contrôle micro-injecté avec la GST seule. **c** Ovocyte micro-injecté avec l'anticorps anti-P15I. les ovocytes sont injectés puis la maturation est induite, les ovocytes sont fixés 3 heures plus tard. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Dans les ovocytes injectés avec la P15, l'activité kinase reste élevée (figure 52). La présence d'une activité MPF élevée dans les ovocytes injectés a été confirmée par transfert de cytoplasme des ovocytes injectés vers des ovocytes témoins qui commencent alors la maturation méiotique (résultat non montré). L'injection de la P15 induit donc un blocage du cycle cellulaire méiotique en métaphase de la division qui suit l'injection. Ceci est confirmé par le fait que les chromosomes restent condensés après l'injection de la P15 ou de l'anticorps (figure 53.a.c).

4 Discussion.

4.1 Le variant d'épissage de la cycline B.

Le clonage de la cycline B d'étoile de mer a permis celui du variant d'épissage de la cycline B. Ce clonage, associé au clonage des variants d'oursin et humains a permis de mieux comprendre ce qui fait la particularité de ces variants d'épissage.

L'existence chez l'étoile de mer du variant d'épissage de la cycline B n'a pu être montrée qu'en RT-PCR. La protéine variante endogène n'a pas pu être visualisée, même en western blot sur immuno-précipités, sachant que l'anticorps anti-CBsv immuno-précipite bien la protéine produite en lysat de réticulocyte (résultat non montré). L'examen en immuno-fluorescence de la localisation du variant permettrait peut être, comme c'est le cas chez l'oursin, de mettre la protéine variante en évidence.

4.1.1 Conservation du variant d'épissage au cours de l'évolution.

Actuellement les variants de cycline B ont été isolés chez certains échinodermes (oursin et étoile de mer, numéro d'accession : AJ512968). De plus parallèlement à ce travail JC Lozano a cloné les mêmes variants chez les cyclines B1 et B2 humaines. J'ai donc examiné chez un certain nombre d'organismes dont le séquençage du génome est disponible, si un intron est présent dans la partie du gène codant le C-terminal de la cycline B. Cette recherche a été réalisée par comparaison des séquences des ADNc de cycline B avec les séquences d'ADN génomique correspondantes. Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus : Cet intron existe des échinodermes aux mammifères mais est absent chez les levures et les arthropodes, il semble aussi être absent chez les nématodes mais la séquence génomique est tronquée à cet emplacement. L'absence d'autres génomes séquencés n'a pas permis de compléter cette liste d'organismes.

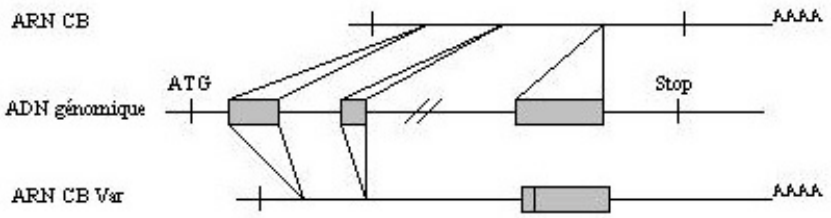
Organisme	Présence de l'intron	Existence du variant	Référence
S.cerevisiae (Clb2)	-	-	NC_001148.1
C.elegans	?	?	NC_003282.1
D.melanogaster	-	-	AE_003458.3
S.granularis	+	+	(Lozano, Schatt et al. 1998)
M.glacialis	+	+	Ce travail
Fugu.rubripes	+	?	Scaffold_18697
M.musculus (B2)	+	?	NW_000353.1
H.sapiens (B1, B2)	+	+	(Cogswell, Godlevski et al. 1995)

Figure 54 :Tableau récapitulatif de la présence d'un intron et de l'existence du variant d'épissage chez différents organismes, Les références sont soit celles du clone génomique soit celle de la publication correspondante.

4.1.2 Mode d'obtention du variant de cycline B.

Pour les quatre variants d'épissage de la cycline B connus, les réactions de RACE 3' ont permis d'obtenir l'extrémité du messager, jusqu'au poly A et donc permis de comprendre comment ces variants d'épissage sont obtenus. Pour les variants des cyclines B1 et B2 humaines ainsi que pour le variant d'étoile de mer, c'est tout l'intron qui n'est pas épissé et est donc retenu dans l'ARN messager. Le mécanisme par lequel est obtenu le variant d'oursin est plus complexe, puisqu'il s'agit d'un épissage différentiel faisant intervenir des sites d'épissage alternatifs, comme le montre la figure 55.b, l'intron est partiellement retenu dans l'ARNm et un exon est éliminé. Ces épissages conduisent à la synthèse d'une cycline tronquée, en effet les séquences d'origine intronique introduisent rapidement un codon stop. Il semble curieusement que ces ARN variants échappent au moins partiellement à la voie du NMD qui reconnaît les ARN présentant un codon stop mal placé par un mécanisme encore mal déterminé et élimine ces ARN (Wilkinson and Shyu. 2002).

a



b

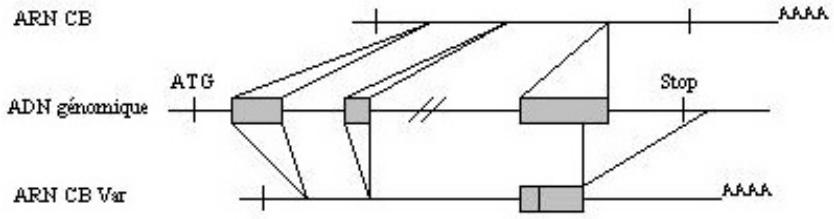


Figure 55 : Schémas du mode d'obtention du messager variant de la cycline B (les introns sont en grisé). **a** Cas de l'étoile de mer et de l'humain. **b** Cas de l'oursin.

4.1.3 Existence de variants d'épissage chez d'autres cyclines

L'épissage différentiel est un mode de régulation de l'expression génique dont l'importance commence seulement à être perçue, pour revue voir(Smith and Valcarcel 2000). Rien n'est connu sur la régulation de l'épissage de la cycline B, il serait intéressant d'examiner quels complexes d'épissage sont impliqués dans l'épissage de cet intron, et comment ces complexes sont régulés.

L'existence de variants d'épissage chez d'autres cyclines est connu. Il existe un variant de la cycline D1 humaine qui diffère de la forme normale par son C-terminal. Ce variant est lié à l'existence d'un polymorphisme au niveau du site d'épissage et semble impliqué dans certain cancers (Betticher, Thatcher et al. 1995). Il existe également des variants de la cycline E humaine, qui en diffèrent par des délétions internes (Sewing, Ronicke et al. 1994). Leur expression est différente de celle de la cycline E, ils sont surexprimés dans certaines tumeurs et ont une activité en liaison à Cdk2 différente de celle de la cycline E ((Mumberg, Wick et al. 1997),(Porter and Keyomarsi 2000)). Ces caractéristiques des variants d'épissage de la cycline E rappellent certaines des caractéristiques du variant de cycline B.

4.1.4 Les résidus enlevés dans le variant d'épissage.

L'alignement des variants d'épissage de la cycline B et des formes normales correspondantes, montre clairement que les séquences d'origine intronique ne présentent pas d'homologies entre elles (mis à part la Valine d'entrée dans l'intron), cet alignement est montré en figure 56. On fait donc l'hypothèse que la particularité des variants d'épissage ne réside pas dans les séquences ajoutées mais celles qui sont enlevées du fait de l'épissage alternatif. L'alignement de nombreuses cyclines B a montré que les seuls résidus absolument conservés dans cette région sont une lysine et une tyrosine, qui ont donc vraisemblablement un rôle essentiel dans la cycline B. Une sérine plus proche du C-terminal de la cycline B est également bien conservée.

4.1.5 Position des ces résidus dans la cristallographie de la cycline A.

La cristallographie de la cycline A montre que les résidus manquant dans le variant d'épissage incluent la totalité des résidus impliqués dans la formation de l'hélice α C-term (Brown, Noble et al. 1995). A l'intérieur de celle ci, les résidus K_{411} et Y_{412} ne sont pas exposés mais internes et participent à la formation de la structure de la partie C-terminale de la cycline par leur association via des liaison hydrogène avec les résidus 229, 335 et 338 (situés respectivement après l'hélice α1 et dans l'hélice α'2). Il faut noter que cette cristallographie a été réalisée sur une cycline A délétée d'environ 150 acides aminés en N-terminal, on ne sait donc rien sur les liens éventuels entre l'hélice α C-term et cette partie de la molécule.

```
CLUSTAL X (1.5b) multiple sequence alignment


CB1-human       AAGAFCLALKILD--NGEWTPTLQHYLS-YTEESLLPVMQHLAKNVVMVNQGLTKHMTVKNKYATSKHAKISTLPQLNSALVQDLAKAVAKV--
CB2-human       AAAASCLSQKVLG--QGKWNLKQQYYTG-YTENEVLEVMQHMAKNVVKVNENLTKFIAIKNKYASSKLLKISMIPQLNSKAVKDLASPLIGRS-
CB-etoile       AAAALCLSSKILEP-DMEWGTTLVHYSA-YSEDHLMPIVQKMALVLKNAPT--AKFQAVRKKYSSAKFMNVSTISALTSSTVMDLADQMC----
CB-oursin       AAAAIYMSMTLLGSEGDSWGAKMTHYSM-YNEDHIMPIVKKMAKAVIRNDAMTEKYHAVKTKYRSSRFMNISALPELESDLIFSLAEESEERM-
CA2-bovine      AAAAFHLALYTVT--GQSWPESLVQKTG-YTLETLKPCLLDLHQTYLRAPQ--HAQQSIREKYKNSKYHGVSLLNPPETLNV-----------
CA2-human       AGAAFHLALYTVT--GQSWPESLIRKTG-YTLESLKPCLMDLHQTYLKAPQ--HAQQSIREKYKNSKYHGVSLLNPPETLNL-----------
CA-etoile       AAAAVCLANYTLS--GTAWTPMLEKHSG-YNLEDIAPCVRDLLKTFTNAPS--QSQQAAQEKYKSQRYNSVSMIAAPTTLPSWL----------
Clb2-Yeast      AAAAMFMSRKMLG--KGKWDGNLIHYSGGYTKEELAP-VCHMIMDYLVSPI--V-HDEFHRKYQSRRFMKASIISVQWALKVRKNGYDIMTLHE
                *..*  .   .     *          *. . . . . .               . ** . .   * .   .


CB1var-human    AAGAFCLALKILD--NGEWTPTLQHYLS-YTEESLLPVMQHLAKNVVMVNQGLTKHMVSQYSGIVRC--------------------------
CB2var-human    AAAASCLSQKVLG--QGKWNLKQQYYTG-YTENEVLEVMQHMAKNVVKVNENLTKFIVSTTVFLSCGKL-------------------------
Cbvar-etoile    AAAALCLSSKILEP-DMEWGTTLVHYSA-YSEDHLMPIVQKMALVLKNAPT—-AKFQVLEILCGLLLCCLDCLVASYPQLKKKIV---------
Cbvar-oursin    AAAAIYMSMTLLGSEGDSWGAKMTHYSM-YNEDHIMPIVKKMAKAVIRNDAMTEKYHVSLHTMK----------------------------
```

Figure 56 : alignement de la partie C-terminale des cyclines B1 et B2 humaines, des cyclines B d'étoile de mer et d'oursin ainsi que des cyclines A humaine, bovine et d'étoile de mer, ainsi que de Clb2 de levure. En dessous sont alignés les variants d'épissage de cycline B connus (humaines, d'étoile de mer, d'oursin), la partie variante est soulignée.

4.2 Rôle possible du variant.

La confrontation des résultats obtenus chez les échinodermes et dans les cellules humaines en culture avec ceux obtenus par l'étude de mutants de Clb2 chez la levure, permet d'essayer de comprendre quelles sont les modifications induites par ces variations de la cycline B. Cela permet également d'apporter des éléments de réponse sur la fonction du variant d'épissage de la cycline B.

4.2.1 Implication de ce variant dans le MPF.

Les résultats obtenus par JC Lozano et P.Schatt (Lozano, Schatt et al. 1998), ont montré que le variant d'épissage d'oursin s'associe plus faiblement à Cdc2 que la cycline B. Ces résultats ont été obtenus en examinant la quantité de cycline B et de son variant récupérée sur phase Suc après micro-injection des protéines d'oursin dans des ovocytes de xénope. Les résultats obtenus avec Clb2 muté au niveau du KY conservé, dans la levure, sont concordants avec ceux obtenus chez l'oursin. Ils montrent que cette double mutation suffit à supprimer près de 90% de la liaison de Clb2 à Cdc28 chez la levure ainsi que l'activité kinase associée. Les résidus manquant dans le variant sont donc essentiels à la bonne formation du complexe MPF. Il faut noter que la mutation utilisée ne crée pas un allèle nul, ce mutant complémente très légèrement la souche Clb2-TS, à la différence des deux délétions utilisées. Il faut également noter que la délétion C-terminale de 12 acides aminés de la cycline A utilisée par Kobayashi, et qui ne se lie plus à Cdk2, comporte encore les résidus KY (Kobayashi, Stewart et al. 1992). Il semble donc qu'il y ait un motif en C-terminal de la cycline qui a un rôle dans la liaison à Cdc2. Ce motif inclue les résidus KY, qui y jouent un rôle important. Comme le montre l'effet du mutant Clb2-Δ31, la présence des résidus KY n'est pas suffisante pour redonner une activité normale à Clb2.

4.2.2 Localisation différentielle du variant de la cycline B.

Si la localisation du variant d'épissage de la cycline B d'étoile de mer n'a pas pu être examinée, celle du variant d'oursin est connue. Ce variant est localisé dans les ovocytes immatures au niveau du cortex de l'œuf ainsi qu'en points peu nombreux du noyau, sans association visible avec la chromatine. Au cours de la maturation méiotique, on l'observe au niveau du fuseau de division. Au stade blastula, le variant est présent dans les cellules en un point proche du noyau, qui est peut-être le centrosome (Lozano, Schatt et al. 1998).

Le mutant C-terminal de Clb2 voit lui aussi sa localisation changer par rapport à la protéine native (Hood, Hwang et al. 2001). Deux différences sont visibles : une perte de la localisation en deux anneaux à la jonction mère-fille ainsi qu'une perte de la localisation au « spindle pole body », l'équivalent fonctionnel des centrosomes des cellules animales. Ces changements de localisation sont les mêmes pour les deux délétions C-terminales de Clb2 étudiées. La localisation à la jonction mère-fille semble liée à la transition entre croissance polarisée et isotrope dans le bourgeon, cette transition est liée à l'activité de Cdc28-Clb2, et est également touchée par cette mutation. Une hypothèse peut être émise pour expliquer cette différence de localisation, Bud3 est un protéine dont le rôle dans la formation du bourgeon est bien établi (Chant, Mischke et al. 1995) et son interaction avec Clb2 a été montrée en double hybride. De plus dans une souche délétée pour Bud3, Clb2 n'est plus localisée à la jonction mère-fille (MN Simon, communication personnelle). Bud3 pourrait donc être la protéine responsable de la localisation de Clb2 à la jonction mère-fille.

La localisation des variants d'épissage des cyclines B humaines, a été étudiée dans l'équipe de J.Sobszak-Thepot (UNR 7098). Une localisation différentielle a été observée entre les cyclines B et leur variants (figure 58). Ainsi le variant de la cycline B1 est nucléaire en phase G2, alors qu'au même moment la cycline B1 est exportée du noyau vers le cytoplasme. Le variant de la cycline B2 a aussi une localisation particulière : en métaphase il est observé autour des centrosomes alors que la cycline B2 est visualisée au milieu du fuseau de division. Il faut noter que l'anticorps anti-cycline B2 est dirigé contre un peptide C-terminal et ne reconnaît qu'une fraction de la cycline B présente, ce qui explique la différence entre la localisation observée et celle visualisée au niveau du golgi par l'équipe de J.Pines (Jackman, Firth et al. 1995).

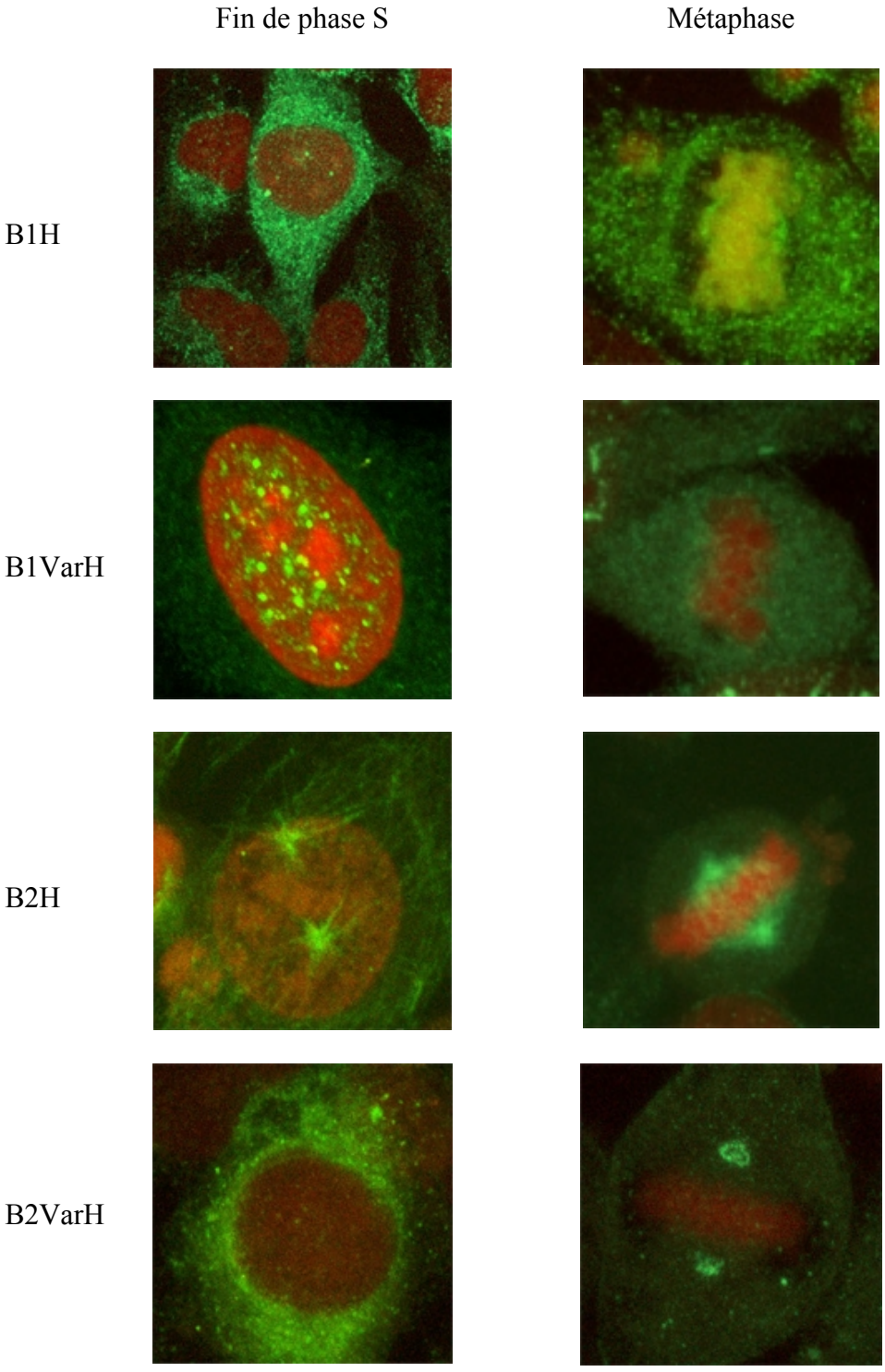


Figure 58 : Localisation des cyclines B1 et B2 humaines ainsi que de leur variants, dans des cellules Hela, en fin de phase S et en métaphase. Les cyclines sont marquées a l'aide d'anticorps dirigés contre les peptides C-terminaux et couplés FITC. L'ADN est visualisé en rouge. (origine, J.Sobczak).

4.2.3Expression du variant d'épissage de la cycline B.

Si le variant d'épissage de la cycline B d'étoile de mer n'a pas pu être mis en évidence *in vivo*, l'expression du variant d'oursin a pu être étudiée. Le variant d'oursin est globalement peu abondant, au cours du développement précoce son expression est plus forte dans les micromères puis au niveau du site d'apparition de l'archenteron. Au stade gastrula, le variant est présent dans l'archenteron ainsi que dans les cellules pigmentaires et dans certaines cellules du blastocœle. Les micromères sont les premières cellules de l'embryon dont le cycle se désynchronise et à commencer à se différencier, ils sont à l'origine d'une partie des cellules qui donneront l'animal adulte (Davidson, Cameron et al. 1998).

L'expression des variants des cycline B humaines, clonés au laboratoire par JC Lozano, a été étudiée par RT-PCR sur des ARN provenant de différents tissus. Une expression différentielle des variants a été mise en évidence, notamment pour le variant de la cycline B1 qui est fortement exprimé dans le foie, le pancréas et le placenta comme le montre la figure 57.a. Cette observation a conduit à tester la surexpression des variants dans les lignées tumorales de foie, la figure 57.b montre que dans les lignées HuH7 et Chang, les variants sont particulièrement surexprimés.

a **b**

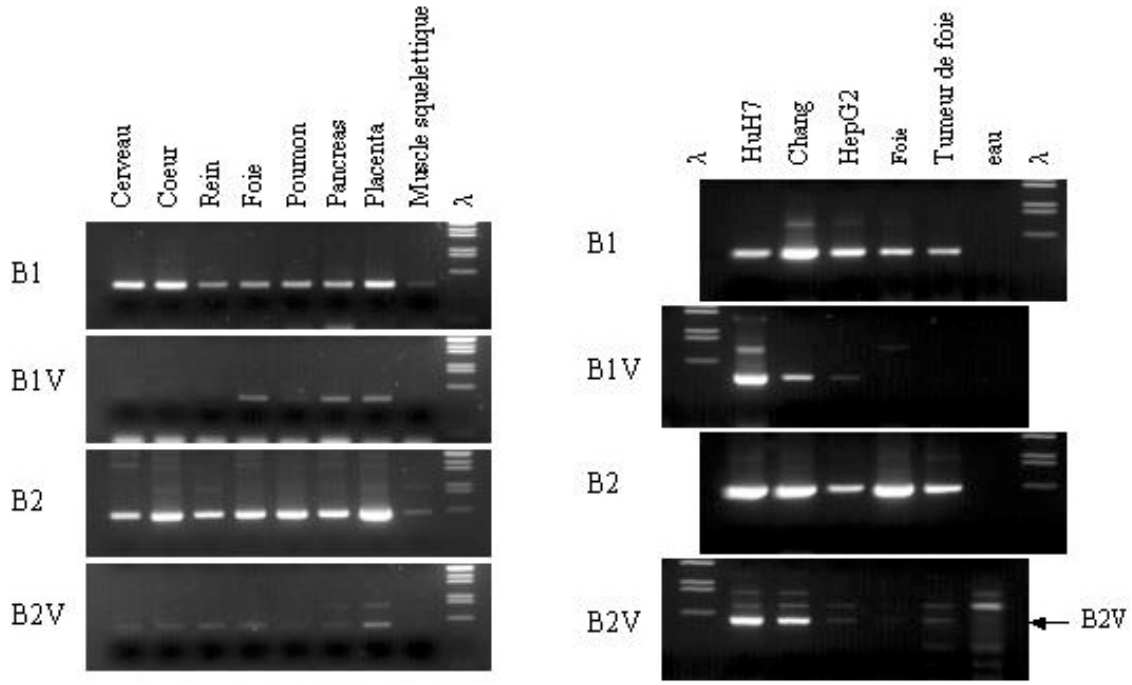


Figure 57 : Expression des variants de cycline B humains. **a** Analyse en RT-PCR de la présence des cycline B humaines et de leur variants dans différents tissus. **b** Même analyse dans trois lignées établies d'hépatocarcinomes humains ainsi que dans le foie sain ou tumoral (origine JC Lozano).

4.2.4 Bilan comparatif.

La comparaison des résultats obtenus en utilisant différents modèles biologiques confirme l'importance des résidus C-terminaux de la cycline B. Dans tous les cas une grande différence de comportement a été constatée entre les cyclines B normales et variantes. Le variant d'épissage de la cycline B peut donc être considéré comme une cycline plus courte et n'intervenant pas dans le MPF. Il pourrait donc avoir pour fonction de titrer, dans certaines circonstances, des régulateurs du MPF agissant par liaison avec la cycline B. Ainsi dans les ovocytes l'étoile de mer, l'injection du variant (d'oursin ou d'étoile de mer) allonge la durée de la maturation méiotique, comme s'il titrait un activateur du MPF.

L'étude des variants humains et notamment celle de leur interaction avec Cdc2 permettra de confirmer cette hypothèse. De plus la surexpression des variants dans certaines lignées d'hépatocarcinomes suggère qu'il puisse avoir un rôle dans les processus tumoraux qu'il serait intéressant d'approfondir.

Pour mieux comprendre la fonction des résidus C-terminaux de la cycline B, Un criblage différentiel en double hybride pourrait être réalisé en utilisant comme appât les protéines Clb2 et le mutant Clb2-AC. En effet un criblage utilisant la protéine Clb2 a déjà été un succès (MN.Simon, communication personnelle). Ceci permettrait d'identifier des protéines présentant une affinité différente pour Clb2 et pour le mutant Clb2-AC (Bud3 serait intéressant à tester, par exemple).

4.3 La recherche de partenaires de la cycline B.

Pour mieux comprendre la fonction du variant d'épissage de cycline B, deux techniques ont été utilisées pour rechercher ses partenaires. L'intérêt de cette recherche est lié à la faible affinité de ce variant pour Cdc2. Ce phénomène nous laissait espérer la découverte de partenaires se liant à la cycline B en l'absence de Cdc2, et donc d'approcher de nouvelles voies de régulation du cycle cellulaire.

4.3.1 Recherche en double hybride.

Le criblage en double hybride a posé de nombreux problèmes. La cycline B entière est toxique lorsqu'elle est produite dans la levure avec les vecteurs double-hybride, cela est vraisemblablement du à une interaction inadéquate avec la machinerie de contrôle du cycle cellulaire endogène chez la levure. A l'opposé, les criblages utilisant le variant d'épissage de la cycline B n'ont donné aucun clone positif alors que ce variant ne pose pas de problème de toxicité, sans que l'on s'explique pourquoi. Actuellement aucun criblage en double hybride n'a été publié utilisant comme appât une cycline B, seul un double hybride avec comme appât un court fragment correspondant au CRS de la cycline B a été un succès (Kong, Barnes et al. 2000). De plus dans l'équipe de MN.Simon et E.Bailly (CNRS, UPR 9027), un criblage dont l'appât est la cycline de levure Clb2 a été positif (communication personelle). Ce succès peut s'expliquer par le fait qu'en utilisant la cycline endogène, des interactions ont été rendues possible via l'association de Clb2 à Cdc28 dans la levure. Ce criblage a donc permis d'obtenir des substrats ou des régulateurs du MPF.

Comme l'a montré l'équipe de J.Camonis avec la découverte de l'interaction entre la cycline B et RLIP, la cycline B peut être trouvée comme cible dans un crible en double hybride (elle est alors généralement délétée du N-terminal contenant la boite de destruction). Il semble que RLIP soit un substrat du MPF, cette interaction confirme le rôle du MPF dans l'inactivation des complexes d'endocytose pendant la mitose. Par contre, la fonction de RLIP au niveau du fuseau pendant la division reste énigmatique.

4.3.2 Recherche en chromatographie d'affinité.

La recherche de partenaires par chromatographie d'affinité s'est d'abord heurtée à un problème de production de protéine recombinante. Il a en effet été impossible de produire de façon soluble la cycline B et son variant. Ces protéines ont donc été utilisées dénaturées dans le chlorure de guanidine. Utiliser les protéines dénaturées fait que seule une minorité va reprendre une conformation native, ceci a pour inconvénient l'augmentation des interactions non spécifiques (avec des chaperones par exemple). Cette méthode a permis d'identifier une protéine de 15kDa comme interagissant avec la cycline B. Il était ensuite essentiel de vérifier l'interaction entre la P15 et la cycline B par une autre méthode, cela a été possible en GST-pull down, les protéines de fusion P15 GST ayant pu être produites solubles.

4.4 Cybip ou la P15.

La chromatographie d'affinité sur une colonne de cycline B variante a permis d'identifier une protéine de 15kDa comme partenaire de la cycline B variante. Le clonage de cette protéine a montré qu'elle avait déjà été isolée par l'équipe de L.Meijer, mais aussi qu'elle présentait un polymorphisme lié à la présence de différents allèles.

4.4.1 Le clonage de la P15.

Comme l'a montré une publication récente (Vogel, Baratte et al. 2002), la P15 que nous avons étudié correspond à une protéine que l'équipe de L.Meijer avait isolé à Roscoff il y a plusieurs années (Azzi, Meijer et al. 1994). Cette protéine a été isolée biochimiquement en recherchant Suc1 d'étoile de mer. Pour cette équipe, qui a également cloné Suc1 d'étoile de mer, la P15 fait partie de la famille de p13-Suc1. Au delà de la similitude au niveau de la taille des protéines, ils trouvent une cross-réaction des anticorps anti-P9CKS1 (homologue humain de Suc1) sur la P15 ainsi qu'une association de la P15 avec les Cdk, ce qui rappelle l'association Suc1-Cdc2. Par contre l'alignement présenté par cette équipe ainsi que celui présenté ci-dessous montrent que l'homologie entre ces protéines est très faible, l'étude de leur structure secondaire permettrait peut-être de noter des similitudes dans leur organisation dans l'espace.

Comme la P15 a été trouvée associée à la cycline B et non aux Cdk, elle a été renommée Cybip pour CYclin B BInding Protéin. Les différentes formes ont également été renommées pour nous mettre en accord avec les travaux de l'équipe de L.Meijer. Les formes A et B publiées sont donc respectivement les formes II et III de ce travail, la forme I a alors logiquement été nommée C. Dans le cadre de ce manuscrit les numérotation utilisées au cours de ce travail ont été gardées. Les numéros d'accession des trois formes de P15 dans les banques de données sont : AJ512965, AJ512966, AJ512967.

```
CKS1Hs_        ------------------------------------M-SHKQ-IYYS-DKYDDEEFEYRH
CKS1Dm_        ------------------------------------M-SKD--IYYS-DKYYDEQFEYRH
P13Mg_         ------------------------------------MGSKN--IYYS-DKYFAGDYEYRH
P13suc1_       ------------MSKSGVPRL-----LTASERERLEPFIDQ--IHYSP-RYADDEYEYRH
P15I_          MIHKLVLILSVVATASAFLPIP-PPADPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDLASAQ
P15II_         MIHKLVLILSVVATTSAFIFT-----DPIDCPKKYTYSFSRYSICLSPDKYEANDLASAQ
P15III_        MIHKLVLILSVVATASALIGMIGKPAKPFDCPNRKTYASSQYSICLSPDKYEANDLESAQ
                                                        .   *  *  :*   :    :

CKS1Hs_        VMLP---KDIAKLVPKT---------HLMSESEWRNLGVQ-Q-SQ--GWVHYMIHEPE--
CKS1Dm_        VVLP---KELVKMVPKT---------HLMTEAEWRSIGVQ-Q-SR--GWIHYMIHKPE--
P13SG_         VMLP---KDIAKQVPN----------HLMTEKEWRGIGVQ-Q-SQ--GWIHYMVHAPE--
P13suc1_       VMLP---KAMLKAIPTDYFNPETGTLRILQEEEWRGLGIT-Q-SL--GWEMYEVHVPE--
P15I_          TYCKSIGSSLCSLGQMAN-----AWRHNYYDGRWGMYNVKGRDARVSSCGTYTKSSGECY
P15II_         TYCKSIGSSLCSLGQMAN-----AWRHKYYDGRWGMYNVKGRDARVSSCGTYTKSSGECY
P15III_        AYCQSFGSSLCSLGQMAS-----SWRHNYYDERWGMYNVKGRDARVTPCRTYTISSGECY
               .      . : .              :   : .*   .:  : :       *     *

CKS1Hs_        --------P-HILLFR-RPLPKKPKK---
CKS1Dm_        --------P-HILLFR-RPKTD-------
P13SG_         --------P-HILLFR-RPVTKPLGDHNQ
P13suc1_       --------P-HILLFK-REKDYQMK----
P15I_          TTTTVIIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
P15II_         TTTTVIIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
P15III_        TSTPGFATGNRIIPNTPRPNAQQKAYCCS
                         .*:    *
```

Figure 59 : alignement des trois formes de P15 ainsi que de quatre protéines Suc1 (humaine, de drosophile, d'étoile de mer, de levure).

4.4.2 Les propriétés de la P15.

La P15 a été trouvée fixée aussi bien sur une colonne de cycline B que de cycline B variante. Il semble que l'affinité de la P15 soit légèrement supérieure pour la cycline B variante (figure 33.b, comparer les pistes 1 et 2). Cette interaction a été confirmée en GST-pull down. L'équipe de L.Meijer elle, montre curieusement une interaction *in vitro* entre la P15 et certaines Cdk exogènes : Cdk 4, 5, 6, 8 mais pas Cdk 1 ni 2.

Nous avons donc testé l'interaction entre la P15 et Cdk5, que ce soit par immuno-précipitation ou en GST pull-down, cette interaction n'a pu être mise en évidence. L'interaction de la P15 avec la cycline B n'est pas non plus visible en immuno-précipitation, par contre elle est apparue clairement en GST pull-down. Il est vraisemblable que seule une fraction de la P15 est associée à la cycline B. Quelque soit l'anticorps utilisé (anti-P15cons ou anti-P15I ou III), aucun n'est vraiment efficace pour immuno-précipiter les P15. Pour y

remédier il faudrait disposer d'un anticorps dirigé contre la protéine totale et non contre un peptide.

Il faut cependant observer que tous les résultats d'interactions entre la P15 et les Cdk publiés par l'équipe de L.Meijer avaient été obtenus en système hétérologue (incubations d'extraits de vertébrés sur une colonne de P15 d'étoile de mer par exemple). Cette équipe s'est ensuite servie d'une colonne de P15 pour isoler chez l'étoile de mer une Cdk d'un poids moléculaire de 34kDa et qui est reconnu par les anticorps anti-PSTAIRE (Detivaud, Pettit et al. 1999). Cette Cdk ne serait pas Cdc2 et est toujours ni séquencée ni caractérisée à l'heure actuelle. Un western blot anti-PSTAIRE a été réalisé au laboratoire sur le pull-down P15 (voire figure 45) mais aucune Cdk n'a pu être mise en évidence de cette façon.

Une autre interrogation se pose vis-à-vis de certaines conclusions de l'équipe de L.Meijer. Ils trouvent en effet des propriétés différentes aux deux formes de P15 qu'ils ont cloné (formes II et III). Pour eux seule la forme III s'associerait aux Cdk. Or nous avons montré clairement que les trois formes de P15 isolées sont trois allèles d'un même gène. En effet les données obtenues sur les ARNm, les protéines et l'ADN génomique concordent : l'une des formes voire deux d'entre elles peuvent être absente d'un individu donné sans altérer sa viabilité. (pour des allèles d'un seul gène, et qui doivent donc être interchangeables, des propriétés aussi divergentes que les présente cette équipe sont étonnantes et vraisemblablement sans fondement biologique).

A contrario, nous avons trouvé les mêmes propriétés aux P15I et III, notamment la liaison à la cycline B, la localisation intracellulaire ainsi que l'effet en micro-injection. Reste à vérifier que la P15II possède également ces propriétés mais compte tenu de la séquence protéique de cette forme, il est délicat d'obtenir un anticorps qui soit spécifique (cette forme présente simplement une délétion de 4 résidus et 3 variations d'acides aminés, voir la séquence protéique en figure 38). La confirmation définitive du fait que les trois P15 sont des allèles d'un seul gène sera faite par la réalisation de RACE génomique sur les différentes formes de P15. Ceci permettra de prouver qu'elles se trouvent bien au même emplacement sur le chromosome.

La présence du peptide signal à l'extrémité N-terminale de la P15 est bien établie par les logiciels de recherche de motifs protéiques. Disposer d'un contrôle qui permette de vérifier l'efficacité de l'anticorps dirigé contre le peptide signal sur la protéine native nous

donnerai la preuve qu'il est réellement clivé dans la cellule. Or il nous a été impossible de produire la P15 entière, toutes les protéines recombinantes dont nous disposons sont délétées du peptide signal. Mais étant donné que l'anticorps dirigé contre le peptide signal a été purifié par affinité sur ce peptide, son efficacité est bien établie. Le clivage du peptide signal pourra aussi être confirmé par traduction *in vitro* de la protéine entière en présence de microsomes. La signification biologique de ce signal reste par contre énigmatique, il s'agit sûrement d'un signal d'adressage mais vers quel compartiment cellulaire ? Pour le savoir il faudrait pouvoir suivre précisément la localisation de la P15 après sa synthèse, il ne semble pas en tout cas que la P15 soit associée aux membranes (figure 49).

4.4.3 Un rôle possible pour la P15 / Cybip.

La découverte de l'interaction entre la P15 et la cycline B a posé la question du rôle de la P15 dans la cellule et en particulier dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette question a été abordée par l'étude de sa localisation *in vivo*, ainsi que par l'examen de l'effet de sa micro-injection dans les ovocytes.

La localisation cellulaire observée de la P15 est intéressante, en effet la cycline B est présente, comme la P15, au niveau du fuseau de division pendant la méiose. Cette co-localisation rend possible *in vivo* l'interaction entre la cycline B et la P15. Par ailleurs la P15 est localisée préférentiellement autour du pôle externe du fuseau puis au niveau de la jonction du globule polaire avec l'ovocyte. Ceci amène à penser que la P15 joue un rôle dans l'émission des globules polaires.

Si la P15 ne varie pas en abondance pendant la maturation méiotique, elle est peut être régulée par phosphorylation. L'analyse de la séquence a en effet mis en évidence des sites potentiels de phosphorylation par Cdc2. Les test menés n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque phosphorylation, de plus aucune variation de mobilité électrophorétique n'a été visualisée, mais l'efficacité de nos anticorps en immuno-précipitation est faible et seule une fraction de la P15 est immuno-précipitée. L'utilisation de l'électrophorèse bidimensionelle permettrait d'examiner plus précisément l'état réel de phosphorylation de la P15.

La micro-injection dans les ovocytes de la protéine recombinante P15 ou des anticorps anti-P15 a pour effet de bloquer la maturation méiotique en métaphase. La P15 n'a pas contre aucun effet sur l'activation du MPF dans les œufs injectés. En effet la rupture de l'enveloppe nucléaire se produit exactement de la même façon que chez les œuf témoins. L'examen de l'activité histone H1 kinase présente dans les œufs micro-injectés montre que celle ci reste élevée pendant le blocage en métaphase. La micro-injection de la P15 empêche donc la désactivation du MPF, indispensable à la sortie du cycle cellulaire. Cette désactivation est due dans l'œuf à la dégradation de la cycline B. Il faudrait vérifier par un Western blot anti-cycline B sur des ovocytes injectés que le niveau de cycline B y reste élevé.

Notre hypothèse est donc que la P15 a un rôle lié à la dégradation de la cycline B. Pour expliquer l'effet identique de l'injection de protéine et d'anticorps anti-P15, l'hypothèse la plus simple est que la P15 interagit en plus de la cycline B, avec un autre partenaire : la protéine X. L'injection de protéine ou d'anticorps peut alors avoir le même effet de déplacement de l'interaction entre ces trois protéines. L'injection de protéine titrant la protéine X alors que celle de l'anticorps bloque un site d'interaction de la P15, soit avec la cycline B, soit avec la protéine X. Cette protéine X n'est pas Cdc2, en effet la micro-injection de la P15 bloque la maturation avec une activité MPF haute, ce qui n'est pas cohérent avec un déplacement de l'interaction entre cycline B et Cdc2.

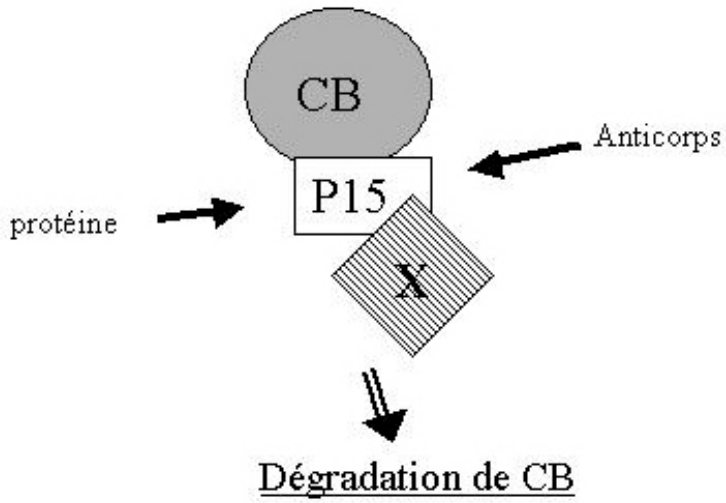


Figure 60 : action schématique de la P15 sur la dégradation de la cycline B, via une troisième protéine X.

Il semble particulièrement intéressant de continuer à étudier les régulations liées à la P15. L'identification de la protéine X permettrait de mieux comprendre comment la P15 agit sur la dégradation de la cycline B. Sa recherche sera menée par chromatographie d'affinité sur une colonne de P15. Nous avons montré que la P15 est également abondante pendant de développement précoce de l'embryon, il faudrait examiner si elle y a le même rôle que pendant la maturation méiotique. Cette étude n'a pu être menée pendant ce travail faute de disponibilité d'étoile de mer mâle. Il est curieux de constater que dans les bases de données de séquences (Swiss-prot, EMBL, dbEST…) aucun homologue de la P15 n'est présent. La P15 est très abondante dans les ovocytes et son action semble essentielle pendant la méiose. Il est donc vraisemblable que sa fonction soit conservée au cours de l'évolution mais que les séquences aient tellement divergé que les homologies ne sont plus reconnaissables. L'étude de cette petite protéine réserve donc encore des surprises !

5 Bibliographie.

A

Abrieu, A., M. Doree, et al. (2001). "The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes." J Cell Sci **114**(Pt 2): 257-67.

Abrieu, A., M. Doree, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinase activation down-regulates a mechanism that inactivates cyclin B-Cdc2 kinase in G2-arrested oocytes." Mol Biol Cell **8**(2): 249-61.

Abrieu, A., D. Fisher, et al. (1997). "MAPK inactivation is required for the G2 to M-phase transition of the first mitotic cell cycle." Embo J **16**(21): 6407-13.

Amon, A. (1999). "The spindle checkpoint." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 69-75.

Andersen, C. B., R. A. Roth, et al. (1998). "Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in Xenopus oocytes." J Biol Chem **273**(30): 18705-8.

Andrews, B. and V. Measday (1998). "The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea." Trends Genet **14**(2): 66-72.

Asaoka-Taguchi, M., M. Yamada, et al. (1999). "Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos." Nat Cell Biol **1**(7): 431-7.

Azzi, L., L. Meijer, et al. (1994). "Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein." J Biol Chem **269**(18): 13279-88.

B

Bai, C., R. Richman, et al. (1994). "Human cyclin F." Embo J **13**(24): 6087-98.

Betticher, D. C., N. Thatcher, et al. (1995). "Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript." Oncogene **11**(5): 1005-11.

Brandeis, M., I. Rosewell, et al. (1998). "Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1- null mice die in utero." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4344-9.

Braun, K., G. Holzl, et al. (1998). "Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation." Oncogene **17**(17): 2259-69.

Brizuela, L., G. Draetta, et al. (1987). "p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34Cdc2 protein kinase." Embo J **6**(11): 3507-14.

Brown, N. R., M. E. Noble, et al. (1995). "The crystal structure of cyclin A." Structure **3**(11): 1235-47.

C

Cao, Q. and J. D. Richter (2002). "Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation." Embo J **21**(14): 3852-62.

Chang, W., D. Gruber, et al. (2001). “Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression.” J Cell Sci **114**(Pt 15): 2879-87.

Chant, J., M. Mischke, et al. (1995). “Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast.” J Cell Biol **129**(3): 767-78.

Charrasse, S., T. Lorca, et al. (2000). “The Xenopus XMAP215 and its human homologue TOG proteins interact with cyclin B1 to target p34Cdc2 to microtubules during mitosis.” Exp Cell Res **254**(2): 249-56.

Chiba, K. and M. Hoshi (1995). “G-protein-mediated signal transduction for meiosis reinitiation in starfish oocyte.” Prog Cell Cycle Res **1**: 255-63.

Clute, P. and J. Pines (1999). “Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase.” Nat Cell Biol **1**(2): 82-7.

Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, et al. (1995). “Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle- dependent cyclin B1 gene promoter.” Mol Cell Biol **15**(5): 2782-90.

D

Davidson, E. H., R. A. Cameron, et al. (1998). “Specification of cell fate in the sea urchin embryo: summary and some proposed mechanisms.” Development **125**(17): 3269-90.

Dawson, I. A., S. Roth, et al. (1995). “The Drosophila cell cycle gene fizzy is required for normal degradation of cyclins A and B during mitosis and has homology to the CDC20 gene of Saccharomyces cerevisiae.” J Cell Biol **129**(3): 725-37.

Desdouets, C., J. Sobczak-Thepot, et al. (1995). “Cyclin A: function and expression during cell proliferation.” Prog Cell Cycle Res **1**: 115-23.

Detivaud, L., G. R. Pettit, et al. (1999). “Characterization of a novel cdk1-related kinase.” Eur J Biochem **264**(1): 55-66.

Dickinson, L. A., A. J. Edgar, et al. (2002). “Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing.” J Biol Chem **277**(28): 25465-73.

Doree, M., J. C. Cavadore, et al. (1981). “Hormone-induced phosphorylation of a 16000 Dalton polypeptide following meiosis reinitiation in starfish oocytes.” Exp Cell Res **135**(2): 251-7.

Doree, M. and T. Hunt (2002). “From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?” J Cell Sci **115**(Pt 12): 2461-4.

Draetta, G., F. Luca, et al. (1989). “Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF.” Cell **56**(5): 829-38.

Draviam, V. M., S. Orrechia, et al. (2001). “The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus.” J Cell Biol **152**(5): 945-58.

Ducommun, B., P. Brambilla, et al. (1991). “Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin.” Embo J **10**(11): 3311-9.

Dulic, V., E. Lees, et al. (1992). “Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase.” Science **257**(5078): 1958-61.

Dupre, A., C. Jessus, et al. (2002). “Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes.” Embo J **21**(15): 4026-36.

E

Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). “Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.” Cell **33**(2): 389-96.

F

Fellous, A., M. Kubelka, et al. (1994). “Association of p34Cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of Xenopus oocytes.” Int J Dev Biol **38**(4): 651-9.

Ferby, I., M. Blazquez, et al. (1999). “A novel p34(Cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes.” Genes Dev **13**(16): 2177-89.

Fisher, R. P. and D. O. Morgan (1994). “A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase.” Cell **78**(4): 713-24.

Fu, T. J., J. Peng, et al. (1999). “Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription.” J Biol Chem **274**(49): 34527-30.

Fung, T. K., W. Y. Siu, et al. (2002). “Cyclin F is degraded during G2-M by mechanisms fundamentally different to other cyclins.” J Biol Chem **16**: 16.

Furnari, B., N. Rhind, et al. (1997). “Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase.” Science **277**(5331): 1495-7.

Furuno, N., M. Nishizawa, et al. (1994). “Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in Xenopus oocytes.” Embo J **13**(10): 2399-410.

G

Gallant, P. and E. A. Nigg (1994). “Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins.” Embo J **13**(3): 595-605.

Gardner, R. D. and D. J. Burke (2000). “The spindle checkpoint: two transitions, two pathways.” Trends Cell Biol **10**(4): 154-8.

Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). “Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.” Nature **349**(6305): 132-8.

Golan, A., Y. Yudkovsky, et al. (2002). “The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk.” J Biol Chem **277**(18): 15552-7.

Groisman, I., Y. S. Huang, et al. (2000). “CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division.” Cell **103**(3): 435-47.

Groisman, I., M. Y. Jung, et al. (2002). “Translational control of the embryonic cell cycle.” Cell **109**(4): 473-83.

H

Hagting, A., M. Jackman, et al. (1999). "Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal." Curr Biol **9**(13): 680-9.

Hagting, A., C. Karlsson, et al. (1998). "MPF localization is controlled by nuclear export." Embo J **17**(14): 4127-38.

Hannon, G. J., D. Casso, et al. (1994). "KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin- dependent kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1731-5.

Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." Science **183**(120): 46-51.

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**(4930): 629-34.

Hershko, A. (1999). "Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1389): 1571-5; discussion 1575-6.

Hiramoto, Y. (1974). "A method of microinjection." Exp Cell Res **87**(2): 403-6.

Hood, J. K., W. W. Hwang, et al. (2001). "The Saccharomyces cerevisiae cyclin Clb2p is targeted to multiple subcellular locations by cis- and trans-acting determinants." J Cell Sci **114**(Pt 3): 589-97.

Huang, J. and J. W. Raff (1999). "The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in Drosophila cells." Embo J **18**(8): 2184-95.

I-J

Jackman, M., M. Firth, et al. (1995). "Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus." Embo J **14**(8): 1646-54.

Jeffrey, P. D., A. A. Russo, et al. (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." Nature **376**(6538): 313-20.

Jessus, C. and D. Beach (1992). "Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between Cdc25 and Cdc2-cyclin B." Cell **68**(2): 323-32.

K

Kanatani, H., H. Shirai, et al. (1969). "Isolation and indentification on meiosis inducing substance in starfish Asterias amurensis." Nature **221**(177): 273-4.

Karaiskou, A., A. Dupre, et al. (2001). "From progesterone to active Cdc2 in Xenopus oocytes: a puzzling signalling pathway." Biol Cell **93**(1-2): 35-46.

Karaiskou, A., L. H. Perez, et al. (2001). "Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins." J Biol Chem **276**(38): 36028-34.

Kelm, O., M. Wind, et al. (2002). "Cell cycle-regulated phosphorylation of the Xenopus polo-like kinase Plx1." J Biol Chem **277**(28): 25247-56.

Keyomarsi, K. and A. B. Pardee (1993). "Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1112-6.

King, R. W., J. M. Peters, et al. (1995). "A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B." Cell **81**(2): 279-88.

Kobayashi, H., E. Stewart, et al. (1992). "Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34Cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits." Mol Biol Cell **3**(11): 1279-94.

Kolonin, M. G. and R. L. Finley, Jr. (2000). "A role for cyclin J in the rapid nuclear division cycles of early Drosophila embryogenesis." Dev Biol **227**(2): 661-72.

Kong, M., E. A. Barnes, et al. (2000). "Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction." Embo J **19**(6): 1378-88.

Kotani, T., N. Yoshida, et al. (2001). "Requirement of cyclin B2, but not cyclin B1, for bipolar spindle formation in frog (Rana japonica) oocytes." Mol Reprod Dev **59**(2): 199-208.

Kuersten, S., M. Ohno, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond." Trends Cell Biol **11**(12): 497-503.

L

Labbe, J. C., J. P. Capony, 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." Embo J **8**(10): 3053-8.

Lees, E. (1995). "Cyclin dependent kinase regulation." Curr Opin Cell Biol **7**(6): 773-80.

Li, J., A. N. Meyer, et al. (1997). "Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 502-7.

Liu, J. H., S. Wei, et al. (1999). "Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B." Oncogene **18**(1): 269-75.

Lozano, J. C., E. Perret, et al. (2002). "Molecular cloning, gene localization, and structure of human cyclin B3." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 406-13.

Lozano, J. C., P. Schatt, et al. (1998). "A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant." J Cell Biol **140**(2): 283-93.

M

Matsushime, H., M. E. Ewen, et al. (1992). "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK- J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins." Cell **71**(2): 323-34.

Masui, Y. and C. L. Markert (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. " J Exp Zool **177**(2):129-145.

McGowan, C. H. and P. Russell (1993). "Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34Cdc2 exclusively on Tyr15." Embo J **12**(1): 75-85.

Mendez, R., L. E. Hake, et al. (2000). "Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c- mos mRNA." Nature **404**(6775): 302-7.

Mendez, R. and J. D. Richter (2001). "Translational control by CPEB: a means to the end." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 521-9.

Meyerson, M., G. H. Enders, et al. (1992). "A family of human Cdc2-related protein kinases." Embo J **11**(8): 2909-17.

Meyerson, M. and E. Harlow (1994). "Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner." Mol Cell Biol **14**(3): 2077-86.

Minshull, J., J. J. Blow, et al. (1989). "Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis." Cell **56**(6): 947-56.

Moore, J. D., J. Yang, et al. (1999). "Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1." J Cell Biol **144**(2): 213-24.

Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-4.

Mueller, P. R., T. R. Coleman, et al. (1995). "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." Science **270**(5233): 86-90.

Mumberg, D., M. Wick, et al. (1997). "Cyclin ET, a new splice variant of human cyclin E with a unique expression pattern during cell cycle progression and differentiation." Nucleic Acids Res **25**(11): 2098-105.

Murray, A. W. and M. W. Kirschner (1989). "Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle." Nature **339**(6222): 275-80.

Murray, A. W., M. J. Solomon, et al. (1989). "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity." Nature **339**(6222): 280-6.

N

Nakahata, S., Y. Katsu, et al. (2001). "Biochemical Identification of Xenopus Pumilio as a Sequence-specific Cyclin B1 mRNA-binding Protein That Physically Interacts with a Nanos Homolog, Xcat-2, and a Cytoplasmic Polyadenylation Element-binding Protein." J Biol Chem **276**(24): 20945-20953.

Nakajo, N., S. Yoshitome, et al. (2000). "Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes." Genes Dev **14**(3): 328-38.

Nakamura, T., R. Sanokawa, et al. (1995). "Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain." Exp Cell Res **221**(2): 534-42.

Nebreda, A. R. and I. Ferby (2000). "Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 666-75.

Nigg, E. A. (1991). "The substrates of the Cdc2 kinase." Semin Cell Biol **2**(4): 261-70.

Nishiyama, A., K. Tachibana, et al. (2000). "A nonproteolytic function of the proteasome is required for the dissociation of Cdc2 and cyclin B at the end of M phase." Genes Dev **14**(18): 2344-57.

Noble, M. E., J. A. Endicott, et al. (1997). "The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control." Trends Biochem Sci **22**(12): 482-7.

Nugent, J. H., C. E. Alfa, et al. (1991). "Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis." J Cell Sci **99**(Pt 3): 669-74.

Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." Nature **344**(6266): 503-8.

Nurse, P. and P. Thuriaux (1980). "Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe." Genetics **96**(3): 627-37.

O

Okumura, E., T. Fukuhara, et al. (2002). "Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M- phase transition." Nat Cell Biol **4**(2): 111-6.

Ookata, K., S. Hisanaga, et al. (1995). "Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34Cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics." J Cell Biol **128**(5): 849-62.

Ookata, K., S. Hisanaga, et al. (1992). "Relocation and distinct subcellular localization of p34Cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes." Embo J **11**(5): 1763-72.

Ookata, K., S. Hisanaga, et al. (1993). "Association of p34Cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes." J Cell Sci **105**(Pt 4): 873-81.

P

Patra, D. and W. G. Dunphy (1998). "Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase- promoting complex at mitosis." Genes Dev **12**(16): 2549-59.

Patra, D., S. X. Wang, et al. (1999). "The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators." J Biol Chem **274**(52): 36839-42.

Peter, M., C. Le Peuch, et al. (2002). "Initial activation of cyclin-B1-Cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1." EMBO Rep **3**(6): 551-6.

Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." Genes Dev **14**(6): 655-65.

Picard, A., S. Galas, et al. (1996). "Newly assembled cyclin B-Cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes." Embo J **15**(14): 3590-8.

Pines, J. (1996). "Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins." Curr Biol **6**(11): 1399-402.

Pines, J. and T. Hunt (1987). "Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs." Embo J **6**(10): 2987-95.

Pines, J. and T. Hunter (1994). "The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B." Embo J **13**(16): 3772-81.

Porter, D. C. and K. Keyomarsi (2000). "Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity." Nucleic Acids Res **28**(23): E101.

Q

Quaroni, A. and E. C. Paul (1999). "Cytocentrin is a Ral-binding protein involved in the assembly and function of the mitotic apparatus." J Cell Sci **112**(Pt 5): 707-18.

Quimby, B. B. and A. H. Corbett (2001). "Nuclear transport mechanisms." Cell Mol Life Sci **58**(12-13): 1766-73.

R

Radzio-Andzelm, E., J. Lew, et al. (1995). "Bound to activate: conformational consequences of cyclin binding to CDK2." Structure **3**(11): 1135-41.

Raff, J. W., K. Jeffers, et al. (2002). "The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time." J Cell Biol **157**(7): 1139-49.

Riabowol, K., G. Draetta, et al. (1989). "The Cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells." Cell **57**(3): 393-401.

Rickert, P., W. Seghezzi, et al. (1996). "Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II." Oncogene **12**(12): 2631-40.

Rudner, A. D. and A. W. Murray (2000). "Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex." J Cell Biol **149**(7): 1377-90.

Russell, P. and P. Nurse (1986). "Cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast." Cell **45**(1): 145-53.

S

Sadler, K. C. and J. V. Ruderman (1998). "Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes." Dev Biol **197**(1): 25-38.

Sergere, J. C., J. Y. Thuret, et al. (2000). "Human CDK10 gene isoforms." Biochem Biophys Res Commun **276**(1): 271-7.

Sewing, A., V. Ronicke, et al. (1994). "Alternative splicing of human cyclin E." J Cell Sci **107**(Pt 2): 581-8.

Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem Sci **25**(8): 381-8.

Smits, V. A., R. Klompmaker, et al. (2000). "p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint." J Biol Chem **275**(39): 30638-43.

Smits, V. A. and R. H. Medema (2001). "Checking out the G(2)/M transition." Biochim Biophys Acta **1519**(1-2): 1-12.

Stebbins-Boaz, B., Q. Cao, et al. (1999). "Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF- 4E." Mol Cell **4**(6): 1017-27.

Stebbins-Boaz, B., L. E. Hake, et al. (1996). "CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in Xenopus." Embo J **15**(10): 2582-92.

Strausfeld, U., J. C. Labbe, et al. (1991). "Dephosphorylation and activation of a p34Cdc2/cyclin B complex *in vitro* by human CDC25 protein." Nature **351**(6323): 242-5.

Sugimoto, M., N. Martin, et al. (2002). "Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). " Oncogene **21**(53):8067-8074.

T

Takeno, S., T. Noguchi, et al. (2002). "Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Cancer **94**(11): 2874-81.

Takizawa, C. G. and D. O. Morgan (2000). "Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1- Cdk1 and Cdc25C." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 658-65.

Takizawa, C. G., K. Weis, et al. (1999). "Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7938-43.

Tamura, K., Y. Kanaoka, et al. (1993). "Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1." Oncogene **8**(8): 2113-8.

Tang, D. and J. H. Wang (1996). "Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuron-specific Cdk5 activators." Prog Cell Cycle Res **2**: 205-16.

Tokumoto, T., M. Yamashita, et al. (1997). "Initiation of cyclin B degradation by the 26S proteasome upon egg activation." J Cell Biol **138**(6): 1313-22.

Toyoshima, F., T. Moriguchi, et al. (1998). "Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint." Embo J **17**(10): 2728-35.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, et al. (2001). "Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase." Nature **410**(6825): 215-20.

Tsai, L. H., E. Harlow, et al. (1991). "Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase." Nature **353**(6340): 174-7.

U-V

van der Velden, H. M. and M. J. Lohka (1994). "Cell cycle-regulated degradation of Xenopus cyclin B2 requires binding to p34Cdc2." Mol Biol Cell **5**(7): 713-24.

Vee, S., L. Lafanechere, et al. (2001). "Evidence for a role of the (alpha)-tubulin C terminus in the regulation of cyclin B synthesis in developing oocytes." J Cell Sci **114**(Pt 5): 887-98.

Vogel, L., B. Baratte, et al. (2002). "Molecular cloning and characterisation of p15(CDK-BP), a novel CDK- binding protein." Biochim Biophys Acta **1589**(2): 219-31.

W

Wang, J., X. Chenivesse, et al. (1990). "Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma." Nature **343**(6258): 555-7.

Wei, P., M. E. Garber, et al. (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." Cell **92**(4): 451-62.

Wilkinson, M.F.and A.B. Shyu. (2002). "RNA surveillance by nuclear scanning? " Nat Cell Biol **4**(6):E144-7

X-Y

Yamaguchi, S., H. Okayama, et al. (2000). "Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation." Embo J **19**(15): 3968-77.

Yamamoto, A., V. Guacci, et al. (1996). "Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s)." J Cell Biol **133**(1): 99-110.

Yamano, H., C. Tsurumi, et al. (1998). “The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor.” Embo J **17**(19): 5670-8.

Yamb, C. H., T. K. Fung, et al. (2002). “Cyclin A in cell cycle control and cancer.” Cell Mol Life Sci **59**(8): 1317-26.

Yang, J., E. S. Bardes, et al. (1998). “Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1.” Genes Dev **12**(14): 2131-43.

Yang, J. and S. Kornbluth (1999). “All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners.” Trends Cell Biol **9**(6): 207-10 .

Yang, J., H. Song, et al. (2001). “Combinatorial Control of Cyclin B1 Nuclear Trafficking through Phosphorylation at Multiple Sites.” J Biol Chem **276**(5): 3604-9.

Yoshitome, S., N. Furuno, et al. (1998). “Overexpression of the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2, but not of cyclin B1, inhibits bipolar spindle formation in Xenopus oocytes.” Biol Cell **90**(6-7): 509-18.

Yudkovsky, Y., M. Shteinberg, et al. (2000). “Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint.” Biochem Biophys Res Commun **271**(2): 299-304.

Z

Zheng, X. F. and J. V. Ruderman (1993). “Functional analysis of the P box, a domain in cyclin B required for the activation of Cdc25.” Cell **75**(1): 155-64.

Zur, A. and M. Brandeis (2002). “Timing of APC/C substrate degradation is determined by fzy/fzr specificity of destruction boxes.” Embo J **21**(17): 4500-10.

6 Annexes.

ANNEXE 1

ADNc de la cycline B

Les sites de restriction utilisés ainsi que les principales amorces sont indiquées.

```
1/1                                                 31/11
AAG AGT GGT AAC AAC GCA GAG TAC GGG GCA ACA CAA ACA CAC GTC GAG TGA TCA AAG CAC


61/21                                               91/31
ATT TTA CCA TAG CAT TAC GAA GCG TGT ACG GAT TTA AAA CCC AGC AGA ACA AAA AGG TGT


121/41                                              151/51
TTT GTA AAT TGA AGC AGC ATT TTG AGA GTT TCT GTG GAG AGG TCT TGA CTC TTT TCT ATT


181/61                                              211/71
TGA AGC GTA ATT TGT GCA GAA ATG TCT CTG AGA GTG AGA GGA ACC TCA AAT CTT CTT GGC


241/81                                              271/91
AAT GCC AAA CTG GGC ATG TTG AAC GGC GAA AAT GTT GAC TCG AGG ATC ATG GGC AAG GTG
                    M   L   N   G   E   N   V   D   S   R   I   M   G   K   V

301/101                                             331/111
GCC ACC AGA GCA TCC TCA AAG GGA GTT AAG TCA ACA CTG GGC ACA AGG GGT GCC CTG GAG
A   T   R   A   S   S   K   G   V   K   S   T   L   G   T   R   G   A   L   E

361/121                                             391/131
AAC ATC AGT AAC GTA GCA CGC AAT AAC TTG CAA GCA GGA GCT AAG AAG GAG CTG GTA AAA
N   I   S   N   V   A   R   N   N   L   Q   A   G   A   K   K   E   L   V   K

421/141                                             451/151
GCT AAA CGT GGA ATG ACC GAA TCA AAG GCT ACC AGT TCA CTA CAG TCT GTC ATG GGG CTC
A   K   R   G   M   T   E   S   K   A   T   S   S   L   Q   S   V   M   G   L

481/161                                             511/171
AAT GTT GAA CCA ATG GAA AAG GCC AAA CCA CAG TCA CCA GAG CCC ATG GAT ATG AGT GAG
N   V   E   P   M   E   K   A   K   P   Q   S   P   E   P   M   D   M   S   E
                                                    ←-----------5'CB-------------------
541/181                                             571/191
ATC AAT AGT GCA TTG GAA GCA TTC TCT CAG AAC CTC TTG GTA GGA GTG GAA GAC ATC GAC
I   N   S   A   L   E   A   F   S   Q   N   L   L   V   G   V   E   D   I   D

601/201                                             631/211
AAG AAT GAC TTT GAC AAC CCA CAG CTC TGC AGC GAG TTT GTA AAT GAC ATC TAT CAG TAC
K   N   D   F   D   N   P   Q   L   C   S   E   F   V   N   D   I   Y   Q   Y
                    --------Box----------→
661/221                                             691/231
ATG AGG AAA CTG GAG CGT GAA TTC AAA GTG AGG ACA GAC TAT ATG ACG ATA CAG GAA ATC
M   R   K   L   E   R   E   F   K   V   R   T   D   Y   M   T   I   Q   E   I
                        EcoRI
```

```
721/241                                     751/251
ACC GAG AGA ATG CGT AGT ATC CTC ATC GAC TGG CTG GTT CAA GTA CAT CTT AGA TTC CAT
T   E   R   M   R   S   I   L   I   D   W   L   V   Q   V   H   L   R   F   H

781/261                                     811/271
CTA CTC CAA GAG ACT CTC TTT CTC ACC ATC CAA ATT CTG GAC AGA TAT CTG GAG GTT CAA
L   L   Q   E   T   L   F   L   T   I   Q   I   L   D   R   Y   L   E   V   Q

841/281                                     871/291
CCC GTG TCC AAA AAT AAA CTT CAG TTG GTC GGT GTG ACA TCC ATG CTG ATT GCA GCC AAG
P   V   S   K   N   K   L   Q   L   V   G   V   T   S   M   L   I   A   A   K

901/301                                     931/311
TAT GAG GAG ATG TAC CCG CCA GAG ATT GGG GAC TTT GTG TAC ATC ACA GAC AAC GCT TAC
Y   E   E   M   Y   P   P   E   I   G   D   F   V   Y   I   T   D   N   A   Y

961/321                                     991/331
ACC AAG GCA CAG ATT CGT TCC ATG GAG TGC AAT ATC CTC AGG AGG CTA GAT TTC AGT CTC
T   K   A   Q   I   R   S   M   E   C   N   I   L   R   R   L   D   F   S   L
                        NcoI
1021/341                                    1051/351
GGT AAA CCA CTC TGC ATT CAC TTC CTC AGA CGC AAC TCA AAG GCT GGA GGG GTT GAT GGT
G   K   P   L   C   I   H   F   L   R   R   N   S   K   A   G   G   V   D   G

1081/361                                    1111/371
CAA AAA CAC ACC ATG GCC AAG TAC CTG ATG GAG CTA ACA CTA CCA GAA TAC GCA TTC GTC
Q   K   H   T   M   A   K   Y   L   M   E   L   T   L   P   E   Y   A   F   V

1141/381                                    1171/391
CCA TAT GAC CCA TCA GAG ATT CCT GCA GCT GCC CTG TGC TTA TCC AGT AAG ATC CTT GAA
P   Y   D   P   S   E   I   P   A   A   A   L   C   L   S   S   K   I   L   E
                              PvuII
1201/401                                    1231/411
CCA GAC ATG GAA TGG GGT ACC ACA CTA GTC CAT TAC AGC GCA TAC AGT GAA GAT CAC CTG
P   D   M   E   W   G   T   T   L   V   H   Y   S   A   Y   S   E   D   H   L
                                            ----------Etcb5--------------------
1261/421                                    1291/431
ATG CCT ATT GTG CAG AAG ATG GCC CTC GTC CTC AAG AAT GCA CCA ACA GCA AAA TTC CAG
M   P   I   V   Q   K   M   A   L   V   L   K   N   A   P   T   A   K   F   Q
--→
1321/441                                    1351/451
GCC GTC AGA AAG AAG TAC TCG AGC GCC AAA TTC ATG AAC GTG AGC ACA ATC TCA GCA CTG
A   V   R   K   K   Y   S   S   A   K   F   M   N   V   S   T   I   S   A   L

1381/461                                    1411/471
ACG TCC TCC ACC GTA ATG GAC CTC GCT GAC CAG ATG TGC TGA GCG TAA ATC CCT CGG CAC
T   S   S   T   V   M   D   L   A   D   Q   M   C   *
                ←-------------Etcb3------------------
                                      BglII
1441/481                                    1471/491
TCC ACA TTC TGT ACA TAT TAT ATA TAT CAT ATA GAG TAG TAA CTA GTA GGA GTA AAA GCC


1501/501                                    1531/511
AGC TGC AAG AAA AAC ACA AGT TAA GAT CTA ACT CCA GAA GGC ACC AGT TTA GAG TTT GAA


1561/521                                    1591/531
CTG ACA TGG CCT TCA AAG CTG CGT TTT TTG AAT GAT GGA CAT TTA TAT TTT ATG AGA ATT
```

1621/541 1651/551
GGA GGA GAG GAA ATT TAT TGA CAA TGT CAA CAG CTT GGG TTT GAA GTG GTA CAC ATG GTA

1681/561 1711/571
AAT TAC TGT CGT GTA CAA TGC TAG AGA AAT GGT GGG TAA GAC AAC CTG AAA TAA CAA AAT

1741/581 1771/591
CTG AAT CTA TTG TCT TGG TGC TAC CCG ACT ATT CTT CTT GGT GTT GAT CGA TTC AAA TGA

1801/601 1831/611
AAT GAA TGC CTG TGC AAT GAG ATG TAT ATA AGC TGA ATA GCT CGG CAG AAT CCA TTA ATT

1861/621 1891/631
TTT AAC TGA ATA GCT TTG ATT CTT GCA GGG GTC TTT AAA AAA AAA TAT TAT GGT ACA AAT

1921/641 1951/651
AAA GTG TGA CAT TAC AGA GTT TTA TGC AAG TTC GCA TCT TGG GTA ACC AAT TTA TTT CTT

1981/661 2011/671
AGC TGC ATG TCC ATG TGT ACT AAA GTT GTT CAA TTA ATA TGC TAG CTT TAT TAA AGG TTC

2041/681 2071/691
AAT ACT TCC CAC ATA AAT TAG TTT GGC TTT AAC CTA GTC TGT TGT GAT TGG TTT AAT TTT

2101/701 2131/711
TTG TTT TAC TGT ATT AGA TAC ATT TGC ACC AAG GTC AGT AAG TTC CCC ACA CAA CTT CAG

2161/721 2191/731
ACC AAT TGT TCA TGT TAT GAA ATT TTC GTT TCC CTT TTC ACT TTG AAA ATA TCA TGT CCA

2221/741 2251/751
AGC TAA TTT TTT TAT GAA GGA ACC AGC CTA TAA ATG ATT GTT TTA CAA TGT ATT TTA AAT

2281/761 2311/771
TAA AAA ACT ATT GTG ATG TAT TTG TTC TTT GTA AAT AAA ATG TTA CTT GAT AAT AAT AAA

2341/781 2371/791
AAA TTT TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

ANNEXE 2

séquence de l'intron de CB

En gras les séquences introniques, la phase de lecture protéique a été poursuivie dans l'intron.

```
1/1                                     31/11
AAG AAT GCA CCA ACA GCA AAA TTC CAG GTA CTT GAG ATT CTG TGT GGC CTT TTA CTT TGC
K   N   A   P   T   A   K   F   Q   V   L   E   I   L   C   G   L   L   L   C
                              ---------------Rac1--------------→
61/21                                   91/31
TGT TTA GAT TGC CTT GTG GCT TCT TAC CCC CAA TTA AAA AAA AAA ATT GTC TAA AGT TTA
C   L   D   C   L   V   A   S   Y   P   Q   L   K   K   K   I   V   *
             -----------Rac2------------------→
             ←------Int3------------------
121/41                                  151/51
CAA GGC CGT GTG TTG AAG CGT TAC AAA GTA TTT TTG GAT TCA GCC ATT TGG ATT CAA CCA


181/61                                  211/71
TTT TTG GAT GTA ACT ATC ATG ATT CTC TTC CTA CTT TAA TCT GAT TTC CAA AAT TTC CCC


241/81                                  271/91
CTC GGA AAA TTC AGC AAA ATT GTT ATT AAA AGT TTA TAA AAG CCT ATA CCA CAT GTA CAT


301/101                                 331/111
GTG GGT CAG CCT TTG TAC TCA ATC AAA TGT TCC TAC TTC TAT CCA ATG GCC AAA TAT CAT


361/121                                 391/131
GCC TGT TTC ATA GGG CCT ATT CAT ACA TGT AAT ATT TAC AAG TAT GTG AAT AAG GTG CCT
                                                                        ←---

421/141                                 451/151
TAA TGT GAA GTG GCC AAT AAG GTC ATC TTT TTC TCT CTT CCC CTC TTT TTT TTT TCT TAT
-----------Int2------------------

481/161                                 511/171
ATC TAA TTT TTC TTT CTT GTT TTT TGC CAG GCC GTC AGA AAG AAG TAC TCG AGC GCC AAA


541/181                                 571/191
TTC ATG AAC GTA AGC ACA ATC TCA GCA CTG ACG TCC TCC ACC GTA ATG GAC CTC GCT GAC


601/201                                 631/211
CAG ATG TGC TGA GCT TAA ATC CCT CGG CAC TCC ACA TTC TGT ACA TAT TAT ATA TAT CAT
```

ANNEXE 3

Séquence complète de l'ADNc de la P15 de type I

Les amorces utilisées pour les RACE 3' et 5'sont indiquées.
En gras, le fragment initialement obtenu par RT-PCR.

```
1/1                                         31/11
ggg caa gca gtg gta aca acg cag agt acg cgg gaa gtc aga gca tgg tca gag caa gca


61/21                                       91/31
cgg tgt agt agc acg tca gat ctg cga tag cga aag acg gca ttt ttt cca cca aag cta


121/41                                      151/51
gat taa act tca atc agt gtc acg atg att cac aag ttg gtg ctg att ttg agc gtg gtg
                              M   I   H   K   L   V   L   I   L   S   V   V

181/61                                      211/71
gcc acc gcg tct gca ttt ttg ccc atc cct cct cca gca gac ccc atc gat tgt ccg aat
A   T   A   S   A   F   L   P   I   P   P   P   A   D   P   I   D   C   P   N

241/81                                      271/91
aag tat act tat tcg ttt tca cgg tat agt att tgt cta tca cca gac aag tac gag gcc
K   Y   T   Y   S   F   S   R   Y   S   I   C   L   S   P   D   K   Y   E   A

301/101                                     331/111
aat gat ttg gcg tca gcc cag acc tac tgt aag agt att ggc tcg tcg ctt tgt tcc ctg
N   D   L   A   S   A   Q   T   Y   C   K   S   I   G   S   S   L   C   S   L
                                              ------------------R31------------→
361/121                                     391/131
ggc cag atg gct aac gct tgg agg aac aac tac tat gac gga cgc tgg ggc atg tat aac
G   Q   M   A   N   A   W   R   N   N   Y   Y   D   G   R   W   G   M   Y   N
                                  ←--------------R51------------------
421/141                                     451/151
gta aag ggt cgt gac gct cgc gtt tct tcc tgt ggc aca tac acc aaa tca tcg ggc gag
V   K   G   R   D   A   R   V   S   S   C   G   T   Y   T   K   S   S   G   E

481/161                                     511/171
tgt tat acc acc aca act gtc att att att cct gtt aac att atc ccg aac acc ccc cgc
C   Y   T   T   T   T   V   I   I   I   P   V   N   I   I   P   N   T   P   R

541/181                                     571/191
cct aat gct cag caa aag gct tac tgc tgt agc tag taa ctt aaa gaa ata aag aaa tga
P   N   A   Q   Q   K   A   Y   C   C   S   *   *

601/201                                     631/211
caa gaa aca ggc tac ata ata ata gca caa tat gag ccg ttt tgt ctc tct tct tgc tct


661/221                                     691/231
tcc tct cta cta agt tcg gat tgt ctg tta taa att tca ata gcg cca cca taa acg tta


721/241                                     751/251
atc agt aat ttc agt ttc aat aat cag cat tca gta gct tac gta cat gat aat tat gct
```

781/261 811/271
gta taa tct tgt aag agt tat cac gta tac aat tcg cag taa att gtg aaa ttt tag gaa

841/281 871/291
atg cat gtt aac atg aaa caa aaa ggg gaa aga caa gat gaa atc ata ttc act atc ttc

901/301 931/311
caa ccc ttc agc tgt gcc tag tca agc agt tgt gta aag acg cct ccg acg gcc cac cgg

961/321 991/331
act gcc agc tgc agt cca ttt taa ttg gtt ttc aat ata tat tta cgg cct act ggt ctc

1021/341 1051/351
tca cac aaa aca aaa aca cca tag ttt gca ctc ttc ttt tgg gtt taa gga gtc ctt tct

1081/361 1111/371
tta att ttg aac tta act acg ttc aat act ttt gtc aac ata ttt tac tat gat aaa gta

1141/381 1171/391
taa att acg ttt ttc tga aac tta cat gtt gtt ctt aat tgg cta agt agc aat aaa gct

1201/401 1231/411
caa aca act gat tcc ttc ctt gtg aat ctt tca cgc ttg act taa cct agt ttt aaa ttt

1261/421 1291/431
ata gtt tta tag ttt ttt tga aaa tct gca ttc taa taa aaa taa gac ttt ttt caa tcc

1321/441
aaa aaa aaa aaa aaa aaa

ANNEXE 4

Alignement des ORF des 3 types de P15

(ordre : type I/II/III, les différences par rapport au type I sont en gras)

```
I   ATGATTCACAAGTTGGTGCTGATTTTGAGCGTGGTGGCCACCGCGTCTGCATTTTTGCCCATCCCTCCTCCAGCA
II  ATGATTCACAAGTTGGTGCTGATTTTGAGCGTGGTGGCCACC**A**CGTCTGCATTT**A**T**TTT**CA**C**C------------
III ATGATTCACAAGTTGGTGCTGATTTTGAGCGTGGTGGCCACCGCGTCTGCATT**GA**T**TGG**CAT**GAT**T**GGAAA**AC**CA
    ****************************************** **********  *   **

I   GACC—--CCAT-CGATTGTCCGAATAAGTATACTTATTCGTTTTCACGGTATAGTATTTGTCTATCACCAGACAAG
II  GACC—--CCAT-CGATTGTCCGAA**A**AAGTATACTTATTCGTTTTCACGGTATAGTATTTGTCTATCACCAGACAAG
III G**C**C**AAA**CCAT**T**CGATTGTCCGAATA**GG**A**A**ACTTAT**G**CGT**C**TTCAC**A**GTATAGTATTTGTCTATCACCAGACAAG
    * *   **** ************ * * * ****** *** ***** ****************************

I   TACGAGGCCAATGATTTGGCGTCAGCCCAGACCTACTGTAAGAGTATTGGCTCATCGCTTTGTTCCCTGGGCCAG
II  TACGAGGCCAATGATTTGGCGTCAGCCCAGACCTACTGTAAGAGTATTGGCTC**G**TCGCTTTGTTCCCTGGGCCAG
III TACGAGGCCAATGATTTGG**A**GTC**G**GCCCAG**G**CCTACTGT**C**AGAGT**T**TTGGCTC**G**TCGCTTTGTTCCCTGGGCCAG
    ****************** *** ****** ******** ***** ******* ********************

I   ATGGCTAACGCTTGGAGGCACAACTACTATGACGGACGCTGGGGCATGTATAACGTAAAGGGTCGTGACGCTCGC
II  ATGGCTAACGCTTGGAGGCACAA**G**TACTATGACGGACGCTGGGGCATGTATAACGTAAAGGGTCGTGACGCTCGC
III ATGGCTA**G**C**T**CTTGGAGGCACAACTACTATGACG**A**ACGCTGGGGCATGTATAACGTAAAGGGTCGTGACGCTCGC
    ******* * ************* ********** ****************************************

I   GTTTCTTCCTGTGGCACATACACCAAATCATCGGGCGAGTGTTATACCACCACAACTGTCATTATTATTCCTGTT
II  GTTTCTTCCTGTGGCACATACACCAAATCATCGGGCGAGTGTTATACCACCACAACTGTCATTATTATTCCTGTT
III GTT**A**CT**C**CCTGT**C**GCACATACACCA**T**ATCATCGGGCGAGTGTTATACCA**G**CACA**C**CTG**G**C**T**TT**GCAAC**T**GG**T**AA**T
    *** ** ***** ************ ********************** **** *** * **     *  *  *

I   AACATTATCCCGAACACCCCCCGCCCTAATGCTCAGCAAAAGGCTTACTGCTGTAGCTAG
II  AACATTATCCCGAACACCCCCCGCCCTAATGCTCAGCAAAAGGCTTACTGCTGTAGCTAG
III A**GA**ATTATCCCGAACACCCCCCGCCCTAATGC**C**CAGCAAAAGGCTTACTGCTGTAGCTAG
    *  **************************** ****************************
```

ANNEXE 5

Alignement des séquences génomiques des P15 I, II, III (introns en gras)

```
CLUSTAL X (1.5b) multiple sequence alignment

gP15I           GAATTCTTTTTGCCCATCCCTCCT---CCAGCAGACCCCATCGATTGTCCGAATAAGTAT
gP15III         GAATTCTTGATTGGCATGATTGGAAAACCAGCCAAACCATTCGATTGTCCGAATAGGAAA
gP15II          GAATTCACGTCTGCATTTATTTTC------ACCGACCCCATCGATTGTCCGAAAAAGTAT
                ******          *   *          *  * **  ************* * * *

gP15I           ACTTATTCGTTTTCACGTAAGTACCGTATGACGTCAGTGCAAAACCAACACAGATAACTT
gP15III         ACTTATGCGTCTTCACGTAAGTACCGTATGACGTCAGTGCAAAACCAACACAGATAACTT
gP15II          ACTTATTCGTTTTCACGTAAGTACTGTTTGACGTCAGTGCAAAACCAATACAGATAACTT
                ****** *** ************* ** ******************** ***********

gP15I           TAC-ATAAAAGTTGAAGTGAAACTCGAAATTTTGAGAAAAAAATCGACAATTTACCAAAT
gP15III         TACTATAACAGTTGAAGTGAAACTCT---------------------------------
gP15II          TAC-ATAAAAGTTGAAGTGAAACTCGAAATTTTGAGAGAAAAATCAACAATTTACCAAAT
                *** **** ****************

gP15I           GTAAGACACCACTCTCCCATGAAATTGCAAAGACTTGTCATATTGTGCAAACTCTTGTAA
gP15III         ----------------CATGAAATTGCAAAGACTTGTCATATTGTGCAAACTCTT---A
gP15II          GTAAGACACCACTCTCCCATGAAATTGCAAAGACTTGTCATATTGTGCAAACTCTTGTAA
                                 ************************************   *

gP15I           CTGCAATACAGGTTAGTCAACCCATTGCCACAGATAGA--GAGTGGCGCTCATTACCTCA
gP15III         CTGCAATTCAGGT-AGTCGACCCATTGTCAAAGATATACAGAGTGGCGATCATTACTTCA
gP15II          CTGCAATACAGGTTAGTCAACCCATTGCCACAGATAGA--GAGTGGCGCTCATTACCTCA
                ******* ***** **** ******** ** ***** *  ******** ******* ***

gP15I           AAACACATTATAACAGCATTACCTTTATAATACAGAATTTGGACCCATTGTACGTCAAAC
gP15III         AAACACATTATAACAGCAATACCTTTATAATACAGAATT-GGACCCATTGTACGTCA---
gP15II          AAACACATTATAACAGCAGTACCTTTATAATACAGAATTTGGACCCATTGTACGTCAAAC
                ****************** ******************** *****************

gP15I           AGTTTTAAACCGATATTATCGACACGCATCATCTTCTAAAAAACATTTCCAACATGTTTC
gP15III         -GTTTTAAACCGATATTGTCGACACGCATCATCTTCTAAAAAACATCTCCAATATGTTTC
gP15II          AGTTTTAAACCGATATTATCGACACGCATCATCTTCTAAACAACATCTCCAACATGTTTC
                 ***************** ********************** ***** ***** *******

gP15I           TCTGCCAATATTGTTATTTTTACAATGATAGTCTTAATGTTTTTTTTTTTTTTTTGTTT
gP15III         TCTGCCAATATTGTTATTTTTACAATGATAGTCTTAATGTTTTATGTTTTT---TTGTTT
gP15II          TCTGCCAATATTGTTATTTTTACAATGATAGTCTTAATGTTTT----------------
                ****************************************

gP15I           TTTTTTTTTTTCATCCGTAGGGTATAGTATTTGTCTATCACCAGACAAGTACGAGGCCAA
gP15III         TGTTTTTTTTTCATCTGTAGAGTATAGTATTTGTCTATCACCAGACAAGTACGAGGCCAA
gP15II          --TTTTTTTTTCATCCGTAGGGTATAGTACTTGTCTATCACCAGACAAGTACGAGGCCAA
                  ************* **** ******** ******************************

gP15I           TGATTTGGCGTCAGCCCAGACCTACTGTAAGAGTATTGGCTCATCGCTTTGTTCCCTGGG
gP15III         TGATTTGGAGTCGGCCCAGGCCTACTGTCAGAGTTTTGGCTCGTCGCTTTGTTCCCTGGG
gP15II          TGATTTGGCGTCAGCCCAGACCTACTGTAAGAGTATTGGCTCGTCGCTTTGTTCCCTGGG
                ******** *** ****** ******** ***** ******* ****************

gP15I           CCAGGTGGCTAACGCTTGGAGGCACAAGTACTATGACGAACGCTGGGGCATGTATAACGT
gP15III         CCAGATGGCTAGCTCTTGGAGGCACAACTACTATGACGAACGCTGGGGCATGTATAACGT
gP15II          CCAGATGGCTAACGCTTGGAGGCACAAGTACTATGACGGACGCTGGGACATGTATAACGT
                **** ****** * ************* ********** ******** ************

gP15I           AAAGGG
gP15III         AAAGGG
gP15II          AAAGGG
                ******
```

7 Cybip, a starfish cyclin B-binging protein, is imvolved in meiotic M phase exit.

In press: BBRC, 2003

Cybip, a starfish cyclin B-binding protein, is involved in meiotic M-phase exit

Nicolas Offner[1], Jean Derancourt[2], Jean-Claude Lozano[1], Philippe Schatt[1], André Picard[1] and Gérard Peaucellier[1*].

1: UMR 7628, Laboratoire Arago, BP 44, F-66651 Banyuls sur Mer Cedex.

2: CRBM UPR 1086-CNRS, 1919, route de Mende, F-34293 Montpellier cedex 5.

*: author for correspondence: peaucel@obs-banyuls.fr

tel: (33) 4 68 88 73 78

fax: (33) 4 68 88 73 98

running title: monomeric cyclin B-binding protein

SUMMARY

We designed a screen to identify starfish oocyte proteins able to bind monomeric cyclin B by affinity chromatography on a cyclin B splice-variant displaying low affinity for cdc2. We identified a 15 kDa protein previously described as a cdk-binding protein (Vogel et al., B. B. A. Mol. Cell Res. 1589, 219). Cybip is encoded by a single polymorphic gene and the native protein is matured by cleaving a signal peptide. We firmly establish that it is a true cyclin B-binding protein, since the recombinant protein binds recombinant cyclin B in absence of any cdk. Finally, we show that the microinjection of GST-cybip, and of anti-cybip antibody, in maturing starfish oocytes, inhibits H1 kinase and MPF inactivation, and first polar body emission.

INTRODUCTION

Following the demonstration that MPF, purified from starfish maturing oocytes, was an heterodimer composed of one molecule of Cdc2 and one molecule of Cyclin B [1], cyclins have been shown to be the essential regulatory subunits of cyclin-dependent kinases (CDKs). In starfish and in Xenopus prophase-arrested oocytes, MPF is present as an inactive pre-MPF, a heterodimer in which the Tyrosine 15 and the Threonine 14 of p34cdc2 are maintained phosphorylated, as the result of a balance between sustained Myt1 kinase activity and low Cdc25 phosphatase activity [2,3]. Strickingly in starfish, the activation of the prophase pool of pre-MPF is sufficient to allow progression through the whole first meiotic cell cycle, even in the absence of newly-synthesized cyclin B [4]. Even so, the concentration of cyclin B is generally considered as a limiting factor, while p34cdc2 is present in excess, both in somatic and embryonic cells: the whole pool of cyclin B is thought to be complexed with Cdc2 in pre-MPF or MPF, while part of p34cdc2 molecules remain monomeric, some of them being able to undergo activating phosphorylation on Threonine 161 [5]. But even T161-phosphorylated Cdc2 molecules are not active as H1-kinase in the absence of associated cyclin B. The significance of the unbalance between concentrations of cyclin B and Cdc2, and also of the co-existence of differentially regulated Cdc2 molecules remain largely elusive.

Recently, we have identified in sea urchin a splice-variant of cyclin B mRNA (cyclin Bsv), of which the 8^{th} intron is not cleaved [6]. The result in the protein sequence is the complete removal of the C-terminal alpha helix, which is replaced by the intron-encoded sequence. Similar variants, found also in several additional models including starfish as we report in the present paper, are characterized by a greatly reduced affinity for p34cdc2 *in vivo*. While they are unable to compete with normal cyclin B for binding to Cdc2, the over-expressed variant impedes H1 kinase activation and severely delays entry into M phase [6].

This suggested that it could sequester an activator of the pre-MPF, able to bind even monomeric cyclin B.

In an attempt to identify ligands of monomeric cyclin B, we performed unsuccessful two-hybrid screenings, and affinity chromatography on recombinant cyclin B and cyclin Bsv. This last experiment led to identification of cybip, a low-molecular mass cyclin B-binding protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Handling of animals.

Starfishes, *Marthasterias glacialis*, were collected by diving in the bay of Banyuls-sur-mer (France). Preparation of prophase blocked oocytes and induction of meiotic divisions by 1-methyladenine were as previously described [4].

Recombinant proteins.

Cyclin B and cyclin Bsv were produced in an insoluble form in Bl21 and purified from inclusion bodies by gel filtration in 6 M GuCl and coupled to Affigel 10 (Biorad). Cybip B and C were expressed as GST-fusion proteins. They were obtained in soluble form by cultivation of the bacteria at 25° C and purification of the cell extracts on glutathione-sepharose according to the manufacturer instructions (Pharmacia).

Affinity chromatography and sequencing.

M-phase extracts were prepared from Marthasterias glacialis oocytes treated for 40 min with 1-methyladenine. Oocytes were dissolved in 20 volumes of homogenization buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 5 mM phenylphosphate, 0.5 mM sodium vanadate, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.2 % Nonidet P 40, 1 mM benzamidine, 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°

C. The homogenates were sonicated, centrifuged at 100,000 g for 30 min. The extract was mixed with the affinity matrix (20 volumes to 1 volume respectively), incubated for 2 h at 4° C, washed and eluted, by normal homogenization buffer, then with NaCl concentration increased to 0.5 M, then 1 M plus 10% glycerol, and finally with 6 M urea and 20 mM Tris pH 7.4.

Protein sequencing was performed at the CRBM laboratory in Montpellier (France), with a Procise sequencer (Applied Biosystem) on the proteins from urea elution, after preparative SDS-PAGE, proteolysis by trypsin and HPLC fractionation.

cDNA cloning.

Degenerated oligonucleotides based on the peptidic sequences obtained by microsequencing were used for RT-PCR amplification of a Cybip DNA fragment (primers: gaYaaRtaYgaRgcNaaYga and gtNgtNgtRtaRcaYtcNcc). The full length cDNA was obtained by RACE-PCR extension of this fragment (Smart RACE, Clonetch), with primer: gagtattggctcgtcgctttgttccctg for 3' RACE and primer: catgccccagcgtccgtcatagtagttg for 5' RACE.

Isoform RT-PCR analysis.

Total RNA was prepared from oocytes of different starfishes using the Rneasy midi kit (Qiagen). RT-PCR were performed on each batch with the one step Titan kit (Boehringer), using a first primer common to all Cybip isoforms (aacagcagtaagccttttgctgagcattagg), and a second primer specific for one of the three isoforms (Cybip-A: acgtctgcatttattttcaccgaccc, Cybip-B: ttgattggcatgattggaaaacca, Cybip-C: gtttttgcccatccctcctccagca)

Genomic DNA analysis.

Starfish sperm (50 mg) was homogenized on ice in 950 ml of extraction buffer (0.8 M GuCl, 1mM Tris HCl pH 8, 1mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM NaOH), then incubated with 40 mg/ml proteinase K overnight at 63°C. After centrifugation at 12,000 g for 15 min., the

supernatant was added to 5 volumes of ethanol, the precipitated DNA recovered with a glass rod and dissolved in sterile water. Each genomic DNA sample was tested for the presence of the three Cybip isoforms with the same method and primers as in the RT-PCR experiments.

Immunological procedures.

Polyclonal antibodies were raised in rabbits against synthetic peptides (Neosystem, Strasbourg, France) corresponding to different parts of cybip (with an additional terminal cystein for coupling purpose): MIHKLVLILSC (signal peptide), IGMIGKPAKC (cybip B specific), LPIPPPADPIDC (cybip C specific), CRWGMYNVKGRDARV (invariant sequence), and affinity purified on the same peptides. Antibodies against *Marthasterias glacialis* Cyclin B (CTSSTVMDLADQMC), Cyclin Bsv (CLVASYPQLKKKIV) and the PSTAIRE region of CDKs (CEGVPSTAIREISLLKE) were produced and affinity purified in the same way. Other polyclonal antibodies were produced in rabbits and affinity purified against recombinant proteins produced in *E. coli*: sea urchin (*Sphaerechinus granularis*) CDK5, *Schizosaccharomyces pombe* p13suc1.

Binding experiments.

Purified Cybip-GST or p13suc1 were diluted (50 µg in 1 ml) in IP buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM phenylphosphate, 1 mM sodium vanadate, 0.1 % Triton X100, 1 mM benzamidine, 0.1 mg/ml SBTI) and incubated for 2 h at 4° C with 20 µl of affinity beads (cyclin B or cyclin Bsv or BSA coupled to Affigel). After washing with IP buffer, the beads were fixed with SDS-PAGE sample buffer, for western blot analysis.

In pull-down experiments, glutathione-sepharose beads were loaded with purified Cybip-GST (10 mg / ml bead) in binding buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM benzamidine, 10 µg/ml leupetin) during 1 h at 4° C. After washing

with the same buffer, 20 µl aliquots of beads were incubated with 1 ml starfish extracts for 2 h at 4° C, then washed with homogenization buffer and fixed with SDS-PAGE sample buffer.

Immunofluorescence and microinjections.

The jelly coat and vitelline or fertilization membrane were removed by a 20 min pronase treatment (0.5 mg/ml in sea water), followed by three rinses in bovine serum albumin (0.1% in sea water). Oocytes were extracted for 1 h in extraction buffer (20% glycerol, 50 mM MES, pH 6.7, 10 mM EGTA, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP40) then fixed in cold methanol/glycerol (75/25 %) for at least 1 h. Anti-alpha tubulin (monoclonal, Amersham, dil. 1/100) or anti-Cybip C (40 µg/ml) was applied overnight at 4°C and secondary antibody for 2 h at room temperature. Observations were made with an Olympus confocal microscope.

Microinjections of purified recombinant proteins or antibody (10 mg/ml) were performed essentially according to Hiramoto [7].

Accession numbers.

Cyclin B splice variant mRNA, AJ512968; Cybip A, AJ512965; Cybip B, AJ512966; Cybip C, AJ512967.

RESULTS

A 15 kDa protein was purified by affinity chromatography on cyclin B. Its gene is polymorphic

We cloned from *Marthasterias glacialis* cDNA a cyclin B splice variant lacking highly conserved residues required for binding to cdc2 (paper in preparation). The recombinant protein was used, in parallel with wild type cyclin B, to identify ligands of monomeric cyclin B by affinity chromatography. A protein with a relative molecular mass of 15-16 kDa, was specifically retained. Peptide microsequencing yielded 4 amino acid

sequences which allowed RT-PCR, then RACE-PCR cloning of the corresponding cDNA. According to individuals, 3 different amplification products belonging to the same family were obtained, with short sequence variations but a significant identity at the amino acid level (figure 1). While this work was in progress, two of these three sequences were reported as *Marthasterias glacialis* p15-CDK-BP A and B [8], with p15-CDK-BP B corresponding to a protein previously purified from starfish oocytes and described as a CDK-binding protein [9]. The authors described the two isoforms as encoded by two related genes, and suggested that the properties of the encoded proteins were different. We designed a series of experiments to discriminate between a multigenic family, or a single gene with allelic variations.

First, we designed specific primers to amplify each isoform separately, and raised antibodies against peptides specific for two of the proteins, and one antibody against a peptide sequence common to all three proteins (see material and methods). Then, we compared the results of RT-PCR and western blots of oocytes from several females. Individuals bearing all three isoforms were never found, and almost all combinations of two isoforms were found (figure 1B, table I). Finally, antibodies recognized each time only the isoforms, and all the isoforms, that had been predicted by RT-PCR experiments (see figure 1C for examples). Taken together, these experiments suggest that p15 does not belong to a multigenic family, but is encoded by one single gene with at least three allelic forms.

We tried to amplify a partial sequence from individual genomic DNAs, with primer pairs specific for each isoform. As for RT-PCR experiments, amplification of the three isoforms from one individual was never obtained (table I), and two males out of fourteen displayed only one isoform, confirming that p15 does not belong to a multigenic family but is encoded by a polymorphic gene. Alignment of PCR products shows that the chosen amplified sequence contained one intron, very similar from one allele to another (not shown).

The 15 kDa protein is a cyclin-binding protein.

Vogel et al. identified p15 as a cks/suc1 distant homolog, which retained several heterologous cdks by affinity chromatography (CDK4, 5, 8, amongst others). We verified that Cdc2 (or at least a PSTAIR-containing CDK) as well as endogenous cdk5, were retained on cyclin B and cyclin Bsv columns (figure 2A). But the possibility that p15 was also retained as a consequence of binding to these CDKs was unlikely, since the relative abundance of p15 was far greater than that of CDKs on the column. Moreover, we found that bacterially produced recombinant p15-GST was significantly and specifically retained on bacterially-produced cyclin B and cyclin Bsv (figure 2B), thus in complete absence of any CDK: this shows that p15 is a Cyclin-Binding Protein. As a control in this experiment, we loaded on the cyclin B columns a solution containing bacterially-produced $p13^{suc1}$, a peptide well known as a Cdc2/cdk2-binding protein [10-12], [1]: as shown on figure 2B, p13 was not retained on cyclin B. For this reason, and to avoid a confusion with p15-cki (Ink4) or with cks, we propose to rename p15CDK-BP cybip (for Cyclin-Binding Protein). Thus, cybip A and B correspond to p15CDK-BP A and B respectively, and cybip C to the new allelic form we microsequenced in the first place.

Figure 2B also shows that the two bacterially-produced cybip alleles bind equally to the recombinant cyclins, suggesting that their affinities for cyclin B are equivalent. This observation was strengthened by the fact that both isoforms were recovered from homogenates of different females (not shown).

As the three antibodies we had raised were found inefficient for immunoprecipitation, we performed cybip-GST pull-down to confirm the association of oocyte extract cyclin B and GST-tagged cybip. Figure 2C shows that cyclin B was equally detected on cybip B and cybip C bound to glutathion beads.

The N-terminus of cybip ORF encodes a signal peptide, which is cleaved in the mature protein.

Signal-Peptide prediction (SignalIP V2.0, [13,14]) identified a signal peptide with a 99.7% probability of cleavage in the mature protein. A peptide corresponding to this N-terminal sequence was used to produce and affinity purify a specific antibody which did not recognize the native protein in whole homogenates, nor the material retained by affinity on Cyclin B (not shown), confirming that the signal peptide is cleaved whatever the expressed allele.

Some programs predicted that Cybip should be exported after addressing to the membrane and cleavage. We analyzed by western-blotting the 100,000 g supernatant and pellet fractions of homogenates made in two different extraction buffers and in presence or absence of detergents. Figure 2D shows that most of the cybip protein was found in the 100,000 g supernatant, even in the complete absence of detergent. Moreover, in gel filtration on a Superose 6 FPLC column, cybip was eluted in the low-molecular mass fractions (not shown). This shows that the majority of cybip protein is cytosolic and probably not associated with cyclin B.

Cybip accumulates on the metaphase spindle and cleavage furrow.

For immunofluorescence, we first checked by western blots oocytes from several starfishes for the presence of the various allelic forms. The results presented here were obtained from a female expressing isoform C. Results did not vary according to the isoforms present in the oocytes (not shown). Immunofluorescence of maturing oocytes showed a concentration of the protein on the mitotic apparatus, and at the animal pole cortex surrounding the outer pole of the spindle. At the time of first polar body emission, cybip was observed concentrated as a ring corresponding to the cleavage furrow (figure 3A-B) and this

localization persisted after cytokinesis. The same figure was observed with a primary antibody specific for the isoform C and with an antibody recognizing all three isoforms (figure 3C-D).

Cybip is involved in H1 kinase deactivation at the end of M phase.

In order to avoid competition between isoforms, we worked on starfishes producing cybip isoform C (cybipC), and with the corresponding antibody and recombinant GST-chimeric protein.

GST-cybipC was purified on gluthation-sepharose, then concentrated at 10 mg/ml (230 μM). The final concentration of the protein in the cell after microinjection was approximately 6.4 μM, thus probably far over the physiological concentration. Control microinjections of similar GST concentrations were without effect on the progression of cell cycle. Cybip C microinjected oocytes underwent maturation when triggered by 1-methyladenine, the natural hormone inducing maturation in starfish. Cybip apparently did not change the dose nor the timing of response to the hormone (not shown), and thus did not interfere with MPF activation. First polar body was never emitted, even after 5 hours when oocytes began to die. DNA staining performed at 3 hours post hormone addition showed that chromosomes remained condensed and rather dispersed at animal pole (figure 3E). In contrast in controls both polar bodies had been emitted and the pronucleus was reformed (figure 3F). Similar results were obtained after microinjection of the antibody specific for the C isoform, except that chromosomes were reproducibly grouped at animal pole (figure 3G). H1 kinase activity was also maintained high in GST-cybipC-microinjected maturing oocytes (figure 3H), as well as in oocytes that were microinjected with anti-cybipC antibody (not shown), whereas controls showed the usual reduction and final disappearance of activity at first and 2nd polar body emission. We also checked, by cytoplasmic transfers, that GST-cybip C microinjected

oocytes retained a high MPF level 3 hours after hormonal stimulation, at difference to GST microinjected controls (not shown). Western blot analysis of cybip during meiosis completion and early development, up to the blastula stage, showed no difference in its abundance or electrophoretic mobility (not shown).

DISCUSSION

In this paper, we show that proteins implicated in cell cycle progression can bind cyclin B, even in the absence of cdks: a similar observation has already been made concerning cdc25, the H1-kinase activating phosphatase [15], in an experiment which has not been confirmed later [16]. As shown on figure 2, a PSTAIR-containing cdk, probably Cdc2, and also CDK5 are retained both on cyclin B and Cyclin Bsv, from starfish oocyte cytosol. While the amount of these cdks is far lower than the amount of cybip retained on the same column, we cannot rule out the possibility that they can bind directly cybip, as was previously suggested [8,9]. But the present demonstration that bacterially-produced GST-cybip binds specifically recombinant cyclin B and cyclin Bsv definitively shows that cybip is at least a cyclin B-binding protein, and that the cybip-binding sequence in cyclin B is not the C-terminal alpha helix, lacking in the variant. Actually, cyclin Bsv seems to have more affinity for cybips than normal cyclin B (fig. 2B).

We also show that cybip is encoded by a polymorphic gene, but we did not find any functional difference among allelic isoforms, at least between isoforms B and C, for which we had obtained both antibodies and recombinant proteins. Moreover, the fact that any combination of isoforms can be found in genomic DNA from a starfish population, and that one or two isoforms can be absent in a given individual, suggests that, if the function of cybip is essential, the essential properties of all isoforms are identical.

An intriguing observation is that the N-terminus of all isoforms is predicted to be a signal peptide, and appears to be effectively cleaved in the cell; moreover, while the protein is predicted with a high probability to be externalized, we found it in the cytosolic fraction, absolutely devoided of membranes.

We did not reach our first aim to identify activators of pre-MPF able to bind monomeric cyclin B: clearly, cybip is not involved in the mechanisms which lead to dephosphorylation of the T14 and Y15 of Cdc2. Indeed, our current observations, both in immunofluorescence and in microinjection experiments, suggest an involvement of cybip in exit from M phase. While the detergent-resistant fraction of the protein is localized both on the spindle and in the animal cortex during metaphase, it is found mainly on the cleavage furrow at telophase-cytokinesis : this suggests that part of the microtubule-bound fraction was destroyed, or changed localization upon M phase exit. The localization of cybip on the spindle and at spindle poles, then on furrow is in agreement with a regulatory or structural role in M-phase exit and polar body formation. Indeed, we show that microinjection of either an excess of recombinant protein or the antibody impedes both polar body formation and cyclin B-dependent H1-kinase inactivation. This common effect of the protein in excess and the antibody directed against the same protein, strongly suggests that the function of cybip with regard to cyclin B is regulated by binding to a third partner protein "X". The formation of the trimere cyclin B-cybip-"X" would lead to cyclin B destruction, either because cybip is an inhibitor of cyclin B degradation (the dimer cyclin B-cybip cannot be degraded), and "X" inhibits cybip; or because cybip is an activator of cyclin B degradation, whose function requires binding to "X", which could be a component of the poly-ubiquitination pathway, or of the 26S-proteasome for example.

REFERENCES

[1] J.C. Labbé, J.P. Capony, D. Caput, J.C. Cavadore, J. Derancourt, M. Kaghad, J.M. Lelias, A. Picard, M. Dorée, MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B, Embo J 8 (1989) 3053-3058.

[2] E. Okumura, T. Sekiai, S. Hisanaga, K. Tachibana, T. Kishimoto, Initial triggering of m-phase in starfish oocytes: a possible novel component of maturation-promoting factor besides cdc2 kinase, J Cell Biol 132 (1996) 125-135.

[3] E. Okumura, T. Fukuhara, H. Yoshida, S. Hanada, R. Kozutsumi, M. Mori, K. Tachibana, T. Kishimoto, Akt inhibits Myt1 the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transitions, Nature-Cell-Biology 4 (2002) 111-116.

[4] A. Picard, M. Doree, The role of the germinal vesicle in producing maturation-promoting factor (MPF) as revealed by the removal and transplantation of nuclear material in starfish oocytes, Dev Biol 104 (1984) 357-365.

[5] V. De Smedt, R. Poulhe, X. Cayla, F. Dessauge, A. Karaiskou, C. Jessus, R. Ozon, Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes, J Biol Chem 277 (2002) 28592-28600.

[6] J.C. Lozano, P. Schatt, F. Marques, G. Peaucellier, P. Fort, J.P. Feral, A.M. Geneviere, A. Picard, A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin b splice variant, J Cell Biol 140 (1998) 283-293.

[7] Y. Hiramoto, A method of microinjection, Exp Cell Res 87 (1974) 403-406.

[8] L. Vogel, B. Baratte, L. Detivaud, L. Azzi, P. Leopold, L. Meijer, Molecular cloning and characterisation of p15(CDK-BP), a novel CDK-binding protein, Biochimica-Et-Biophysica-Acta-Molecular-Cell-Research 1589 (2002) 219-231.

[9] L. Azzi, L. Meijer, A.C. Ostvold, J. Lew, J.H. Wang, Purification of a 15-kda cdk4- and cdk5-binding protein, J Biol Chem 269 (1994) 13279-13288.

[10] J. Hayles, D. Beach, B. Durkacz, P. Nurse, The fission yeast cell cycle control gene cdc2: isolation of a sequence suc1 that suppresses cdc2 mutant function, Mol Gen Genet 202 (1986) 291-293.

[11] L. Brizuela, G. Draetta, D. Beach, p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase, Embo J. 6 (1987) 3507-3514.

[12] G. Draetta, L. Brizuela, J. Potashkin, D. Beach, Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by cdc2+ and suc1+, Cell 50 (1987) 319-325.

[13] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, Protein Eng 10 (1997) 1-6.

[14] H. Nielsen, A. Krogh, Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov mode. In: Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, AAAI Press, Menlo Park, California, 1998, pp. 122-130.

[15] K. Galaktionov, D. Beach, Specific Activation of cdc25 Tyrosine Phosphatases by B-Type Cyclins - Evidence for Multiple Roles of Mitotic Cyclins, Cell 67 (1991) 1181-1194.

[16] X.F. Zheng, J.V. Ruderman, Functional analysis of the P-Box, a domain in Cyclin-B required for the activation of cdc25, Cell 75 (1993) 155-164.

FIGURES

Fig. 1. Amino acid sequences of the 15 kDa protein isoforms and distribution among individual starfishes.

(A) Alignment of amino acid sequences of the three isoforms (A, B and C) and the peptides obtained by microsequencing (Pept.). Amino acids belonging to the signal peptide sequence are shown in italic. Those similar to the microsequencing data are shown as bold underlined characters. Asterisks indicate conserved similar amino acids. The length of the fourth peptide made uncertain the identification of its last amino acids which probably explain the mismatch in the final part (QQ vs. SS).

(B) Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification of RNA extracted from oocytes of 3 *Marthasterias glacialis* individuals (#5, #10 and #11), with primers specific for the 3 isoforms (A, B and C). The 1 % agarose gel was stained with ethidium bromide. Molecular weight markers were run on the 1st, 5th and 9th lane.

(C) Western blot analysis of oocyte samples for the same individuals as in (B) with antibodies specific for isoforms B, C or a common sequence. The part of the blots corresponding to proteins between 10 kDa and 20 kDa is shown.

Fig. 2. Binding properties of Cyclins and Cybip.

(A) An M-phase extract of *Marthasterias glacialis* oocytes was incubated with recombinant proteins immobilized on Affigel (Cyclin Bsv, Cyclin B, $p13^{suc1}$) or glutathione sepharose (GST-Cybip B and C), or immunoprecipitated with anti-CDK5 antibody (IP CDK5). After washing, the beads were submitted to SDS-PAGE and western-blot analysis by anti-PSTAIR (upper panel) or anti-CDK5 (lower panel). The migration positions of cdc2 and CDK5 from

the extract are indicated (since the anti-CDK5 antibody was raised against the whole protein, it also cross-reacts with cdc2).

(B) Recombinant Cybip B, C, and $p13^{Suc1}$ were incubated with immobilized Cylin B, Cyclin Bsv and BSA. An aliquot of the sample, taken before the beginning of incubation (sample), and the washed beads were submitted to SDS-PAGE and western-blot analysis by anti-Cybip (2 upper panels) or anti-$p13^{Suc1}$ (lower panel).

(C) An M-phase extract of *Marthasterias glacialis* oocytes was incubated with recombinant proteins immobilized on glutathione sepharose (GST, GST-Cybip B and C) or Affigel ($p13^{suc1}$). After washing, the beads were submitted to SDS-PAGE and western-blot analysis by anti-Cyclin B. For precise electrophoretic mobility comparison, the $p13^{Suc1}$ sample was diluted tenfold.

(D) Western blot from ultracentrifugation supernatants and pellets of oocyte extracts in 2 buffers, with or without detergent. Aliquots of oocytes from a single starfish were dissolved in SDS sample buffer (TH), or the homogenization buffer used for affinity chromatography (HB) with (+) or without (-) NP40, or the gel filtration buffer (GF) with (+) or without (-) CHAPS. After ultracentrifugation for 30 min at 200,000 g, aliquots of each supernatant and each pellet were dissolved in SDS sample buffer and used for western blot analysis with anti-Cybip antibody. The portion of the blot corresponding to proteins of molecular weight between 14 to 20 kDa is shown.

Fig. 3. Immunolocalization of Cybip and effect of Cybip or anti-Cybip microinjection on oocyte maturation.

M. glacialis oocytes were treated with detergent and fixed at 90 min post hormone addition (first polar body emission), followed by double staining with FITC for anti-tubulin (A,C) and Texas red for anti-cybip C (B) or anti-cybip common sequence (D). Scale bar= 20 µm.

Hoechst DNA-staining of *M. glacialis* mature oocytes, microinjected with GST-cybipC (A), GST (B) or anti-cybipC antibody (C). Oocytes were microinjected at the germinal vesicle stage, then induced to mature and fixed after 180 minutes. White arrow shows the two polar bodies (out of focus) and the black arrow the reformed pronucleus in a control GST-microinjected oocyte. Scale bar= 20 μm.

D: autoradiography of histone H1 phosphorylation in the presence of γ-32P ATP, by extracts of GST (ctrl) or GST-cybipC microinjected (inj.) oocytes fixed at various times after hormone addition (min). Control oocytes emitted first polar body at 80 min, and second polar body at 110 min.

Table I

Repartition of the three allelic forms in oocyte mRNA among 13 females and in genomic DNA among 14 males.

Alleles	AA	AB	AC	BB	BC	CC
In oocyte mRNA (number of females)	0	6	2	1	3	1
In genomic DNA (number of males)	0	4	2	2	6	0

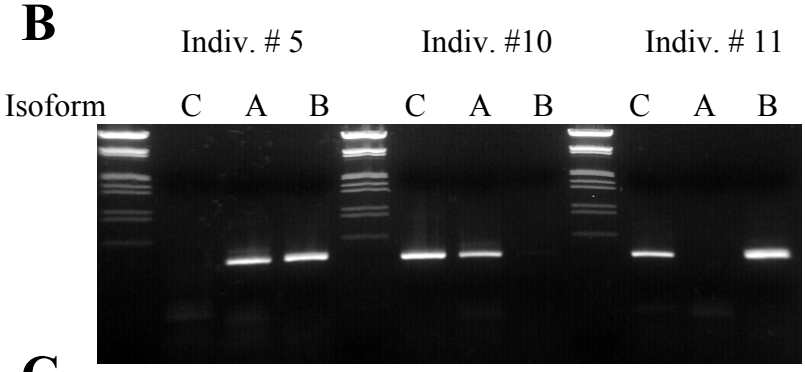
A

```
A       MIHKLVLILSVVATTSAFIFT-----DPIDCPKKYTYSFSRYSICLSPD
B       MIHKLVLILSVVATASALIGMIGKPAKPFDCPNRKTYASSQYSICLSPD
C       MIHKLVLILSVVATASAFLPIP-PPADPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPD
        ************** **           * ***    **   * ********
Pept.                                DPIDCPNKYTYSFSRYSICLSPD

A       KYEANDLASAQTYCKSIGSSLCSLGQMANAWRHKYYDGRWGMYNVKGRD
B       KYEANDLESAQAYCQSFGSSLCSLGQMASSWRHNYYDERWGMYNVKGRD
C       KYEANDLASAQTYCKSIGSSLCSLGQMANAWRHNYYDGRWGMYNVKGRD
        ******* *** ** * **********  *** *** ************
Pept.   KYEANDL        SIGSSLCSLGQMANAWR    DGRWGMYNVKGR

A       ARVSSCGTYTKSSGECYTTTTVIIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
B       ARVTPCRTYTISSGECYTSTPGFATGNRIIPNTPRPNAQQKAYCCS
C       ARVSSCGTYTKSSGECYTTTTVIIIPVNIIPNTPRPNAQQKAYCCS
        ***  * *** ******* *        ******************
Pept.         TYTISSGECYTTTTVIIIPVNIIPNTPRPNASSK
```

B



C

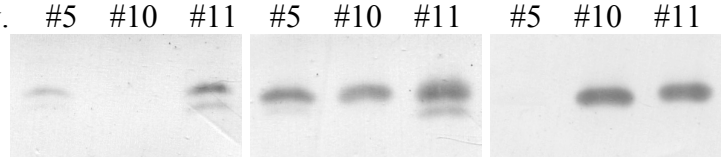


Figure 1

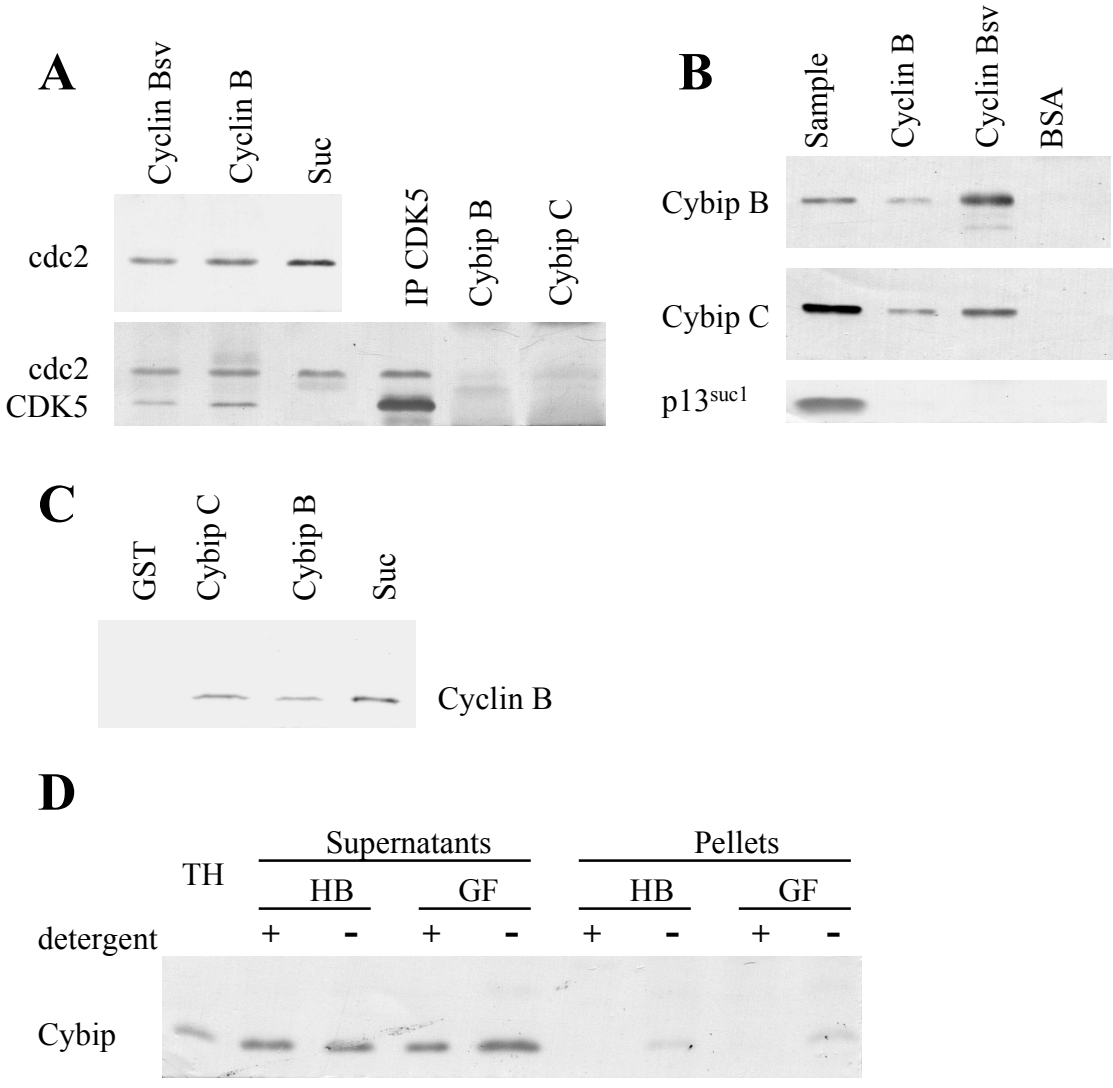

A
Cyclin Bsv
Cyclin B
Suc
IP CDK5
Cybip B
Cybip C
cdc2
cdc2
CDK5
B
Sample
Cyclin B
Cyclin Bsv
BSA
Cybip B
Cybip C
p13suc1
C
GST
Cybip C
Cybip B
Suc
Cyclin B
D
TH
Supernatants
Pellets
HB
GF
HB
GF
detergent
+ - + - + - + -
Cybip

Figure 2

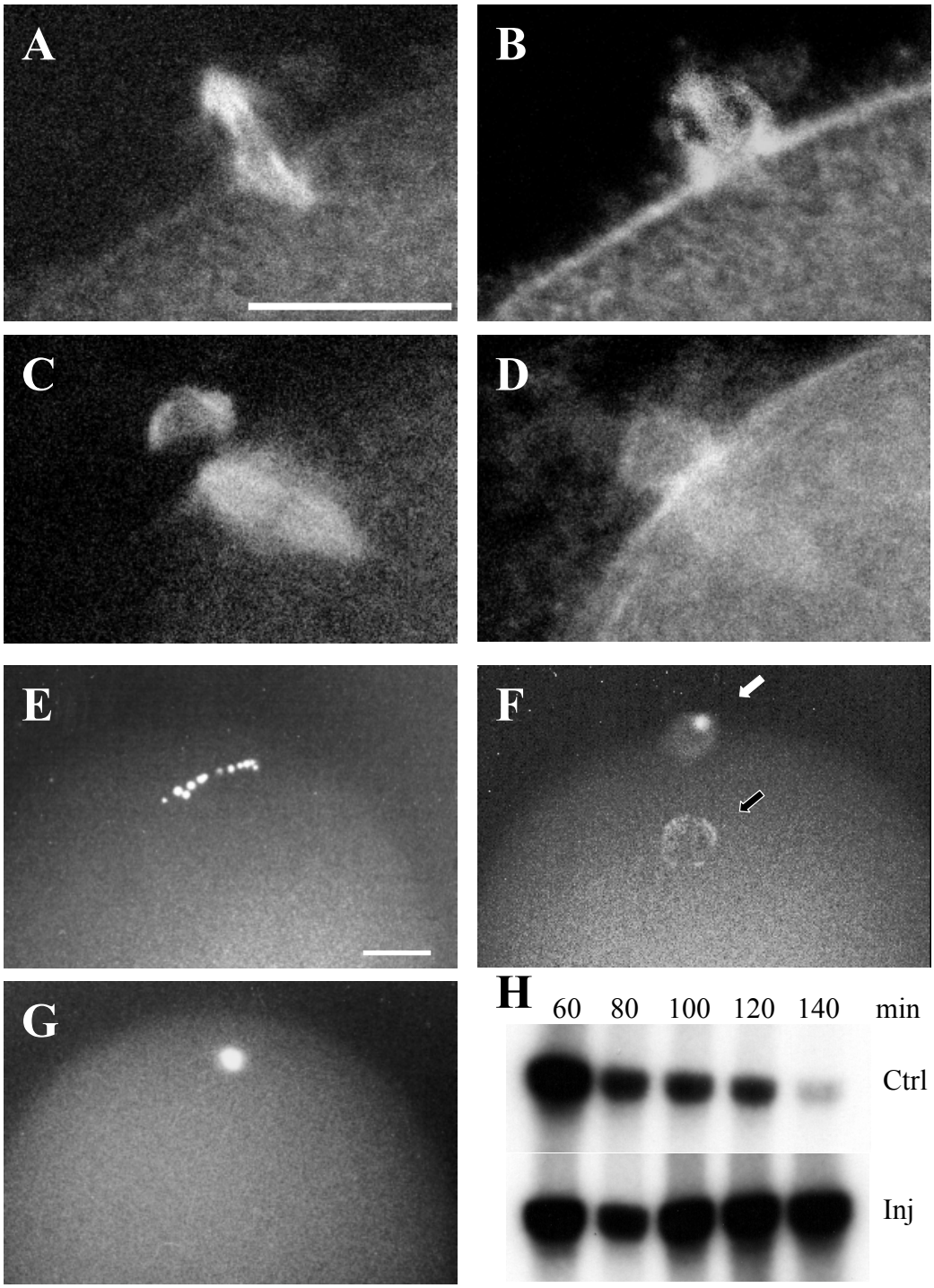


Figure 3

Résumé.

La cycline B est un des régulateurs clef du cycle cellulaire, associée à Cdc2 elle forme le MPF (Maturation Promoting Factor). Ce complexe contrôle la transition entre phases G2 et M du cycle cellulaire. Au laboratoire, un variant d'épissage de la cycline B d'oursin a été découvert. Il lui manque la partie C-terminale, dans laquelle certains résidus sont très conservés.

Au cours de ce travail, le même variant a été cloné chez l'étoile de mer. Ses partenaires ont été recherchés par criblage de banque en double hybride chez la levure ainsi qu'en chromatographie d'affinité. Cette dernière technique a permis d'isoler une protéine de 15kDa (P15) qui s'associe à la cycline B même en l'absence de Cdc2. Une particularité de cette protéine est d'exister sous trois formes alléliques. La P15 est localisée au niveau du fuseau de division. Des exprériences de micro-injections ont montré qu'elle joue un rôle dans la sortie de méiose, vraisemblablement en liaison avec la dégradation de la cycline B.

Parallèlement, le rôle des résidus manquant chez le variant d'épissage a été étudié par la mutagénèse du C-terminal de Clb2 de levure. Ces résidus sont importants pour la localisation de la cycline mais aussi pour son association correcte avec Cdc2.

Abstract.

The cyclin B is one of the key regulators of the cell cycle. When associated with Cdc2, it forms the MPF (Maturation Promoting Factor). This complex controls the transition between the phases G2 and M of the cell cycle. In the laboratory, a splice variant of sea urchin cyclin B has been discovered, it lacks some conserved amino acids in its C-terminal part.

During this work, the homologous starfish variant has been cloned. We searched its partners using two-hybrid library screening in yeast and affinity chromatography. This last technique allowed us to find a 15kDa protein (P15) that associated with cyclin B even in absence of Cdc2. This protein presents tree allelic forms. The P15 is localized on spindles during meiosis. Micro-injection experiments have shown that the protein is involved in the exit of meiosis, maybe linked to cyclin B degradation.

We also studied the function of the amino acids lacking in the splice variant. For this study, we mutagenized these amino acids in yeast Clb2. Our experiments showed the importance of these amino acids for cyclin localization and for its correct association with Cdc2.