

Summary

Control of the exit from mitosis by the protein phosphatase Cdc14

Very little has been known on the Cdc14 phosphatase from the identification of the temperature-sensitive *cdc14* mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in 1981, until the last few months. The sequence of the *CDC14* protein, known since 1992, indicated a protein phosphatase signature. Analysis of the phenotype of the *cdc14* mutant pointed out to an essential function of the phosphatase taking place somewhere during the end of mitosis, after separation of the sister chromatids but before inactivation of the Cdc2-cyclin B complex that controls mitosis in all eukaryotic cells. Recent studies conducted by four different research groups have now precisely documented Cdc14 function. Two targets of the phosphatase Cdc14 have thus been uncovered, namely Sic1 and Hct1/Cdh1, both of which had been previously implicated in inhibiting the Cdc2-cyclin B complex and inactivating mitotic cyclins. Cdc14 function is intimately dependent on its intracellular localization, since Cdc14 has been found to be sequestered within the nucleolus during most of the cell cycle and released from it precisely at the time needed to attain its targets, Sic1 and Hct1/Cdh1, at the end of mitosis.

ADRESSES

A. de Almeida, M. Charbonneau: Équipe « Cycle cellulaire de la levure », UMR Cnrs/ENS n° 5665, École normale supérieure, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

I. Raccurt: Centre commun d'imagerie de Laennec, Université Claude-Bernard-Lyon I, rue Guillaume-Paradin, 69008 Lyon, France.

Contrôle de la sortie de mitose par la protéine phosphatase Cdc14

Annabelle de Almeida, Ingrid Raccurt,
Michel Charbonneau

Entre l'identification du mutant thermosensible cdc14 de la levure Saccharomyces cerevisiae, en 1981, et la fin de l'année 1998, en passant par le clonage du gène en 1992, on avait appris assez peu de choses sur Cdc14. On savait que Cdc14 était une protéine phosphatase chargée d'accomplir une tâche essentielle en fin de mitose, après la séparation des chromatides sœurs en anaphase et avant l'inactivation du complexe universel de contrôle de la mitose, MPF (M-phase promoting factor). Cependant, quatre articles viennent d'être publiés entre décembre

1998 et avril 1999, qui nous renseignent maintenant sur la fonction et le mode de régulation de cette protéine phosphatase. Cdc14 a pour cible deux protéines, Sic1 et Hct1, qui sont directement impliquées dans l'inhibition du complexe MPF et la dégradation des cyclines mitotiques. Cette fonction directement liée à l'activité catalytique de Cdc14 dépend également de remaniements importants dans sa localisation intracellulaire, puisque celle-ci est séquestrée dans le nucléole pendant la plus grande partie du cycle cellulaire et en est libérée au moment où elle doit déphosphoryler ses cibles en fin de mitose.

L'étude d'organismes eucaryotes génétiquement manipulables (*Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, etc.) est devenue depuis quelques années une approche très appréciée pour connaître les fonctions des protéines au sein de nos propres cellules. Une telle approche génétique nous permet de comprendre les dérèglements dans le contrôle du cycle cellulaire intervenant dans les cellules cancéreuses. Elle nous autorise également à progresser vers une connaissance plus approfondie des mécanismes moléculaires fondamentaux régissant le monde vivant. La protéine Cdc14 a été initialement identifiée chez la levure du boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, l'organisme le plus utilisé comme modèle génétique des cellules eucaryotes [1]. A sa température restrictive de croissance (34-37°C), le mutant thermosensible *cdc14-1* s'arrête en fin de mitose (phase M), plus précisément en anaphase-télophase. Ainsi, les deux lots chromosomiques répliqués pendant la phase S précédente (phase de réplication de

l'ADN) sont physiquement séparés. Cependant, dans le mutant *cdc14* la cellule-mère et la cellule-fille sont encore attachées l'une à l'autre, la cytokinèse (ou division cellulaire) n'ayant pu se mettre en place (figure 1). Le clonage du gène *CDC14* a montré, par homologie de séquence, qu'il codait pour une protéine phosphatase à double spécificité, capable de déphosphoryler des résidus sérine/thréonine ou tyrosine [2], un fait confirmé plus tard grâce à des méthodes biochimiques [3].

Cdc14 est une protéine nucléolaire

Nous avons tout d'abord montré que la quantité de protéine Cdc14 est constante au cours du cycle cellulaire (figure 1). Nous avons alors analysé la localisation intracellulaire de Cdc14, un élément susceptible de nous éclairer sur son mode de régulation. Des études en immunofluorescence indirecte nous montrent que Cdc14 est localisée dans le nucléole pendant la plus grande partie du cycle cellulaire (figure 2). Une telle localisation est attestée par le

NOTE ORIGINALE

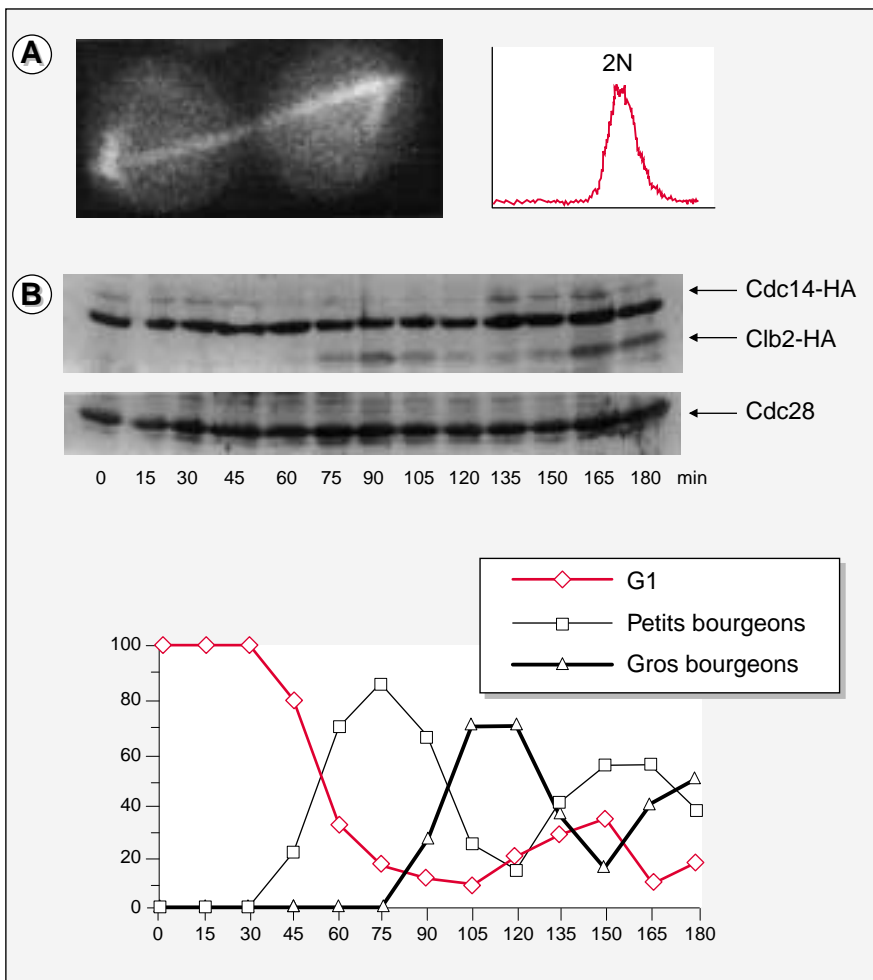


Figure 1. **Phénotype d'arrêt du mutant *cdc14-1* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et taux endogènes de *Cdc14* au cours du cycle cellulaire.** **A.** À la température restrictive de 37°C, les cellules mutantes *cdc14* s'arrêtent en anaphase-télophase de la mitose. La cellule-mère et la cellule-fille sont incapables de se séparer. Le profil de FACS (fluorescence activated cell sorting) de cellules mutantes dont l'ADN a été marqué par l'iodure de propidium indique un contenu 2N des chromosomes. **B.** Des cellules d'une souche sauvage de levure contenant une copie unique de *CDC14*-HA et une copie unique de *CLB2*-HA ont été synchronisées en phase G1 grâce au facteur alpha (phéromone sexuelle) puis relâchées dans le cycle cellulaire après lavage du facteur alpha. Des aliquotes ont été prélevées à différents temps après lavage afin de mesurer les taux endogènes de *Cdc14*-HA et de *Clb2*-HA sur des Western blots incubés avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope HA (hémagglutinine). En parallèle, une observation au microscope et une coloration de l'ADN par le DAPI ont permis de déterminer les pourcentages de cellules non divisées (phase G1, losanges), de cellules avec des bourgeons de petite et moyenne taille (phases S + G2 + début de mitose, carrés) et de cellules avec des bourgeons de grande taille (milieu et fin de mitose, triangles). À 120 min, *Clb2*, la cycline mitotique majeure, est dégradée, marquant ainsi la sortie de mitose, coïncidant avec le déclin rapide du nombre de cellules en division. *Clb2* est réaccumulée par les cellules au cours de l'entrée synchrone des cellules dans le cycle suivant. *Cdc28*, dont les taux endogènes ne varient pas au cours du cycle cellulaire, sert de contrôle interne.

fait que l'on observe une co-localisation de *Cdc14* avec des protéines connues pour être des protéines nucléolaires, telles que *Nop2* et *Gar1* (figure 2), ainsi que *Nop1* et *Sir2* [4, 5]. Pendant la mitose, cependant, *Cdc14* est libérée du nucléole et est alors relocalisée vers le reste du noyau, en particulier au niveau du fuseau de division (figure 2). Cette particularité a été également décrite par deux autres équipes [4, 5].

Net1 retient *Cdc14* dans le nucléole

Nous avons noté que la surproduction de *Cdc14*, lorsqu'elle était réalisée sous le contrôle du promoteur inducible fort, *GAL1*, entraînait un arrêt du cycle cellulaire. De telles cellules deviennent très allongées et finissent par s'arrêter majoritairement en phase G1 du cycle cellulaire (figure 3) [6]. De plus, nous avons observé, en microscopie électronique à transmission, que la surexpression de *CDC14* provoque l'apparition de structures nucléolaires anormales (figure 3).

Afin de découvrir les mécanismes dans lesquels la protéine phosphatase *Cdc14* est impliquée, nous avons alors mis sur pied la stratégie génétique suivante. Puisqu'un excès de *Cdc14* dans la cellule est toxique, il devait alors être possible en surproduisant simultanément la cible de *Cdc14* de neutraliser l'excès de *Cdc14* et permettre ainsi la survie des cellules surexprimant *CDC14*. Pour trouver cette cible, il nous a fallu sélectionner à partir d'une banque d'ADN génomiques de levure transformée dans une souche surexprimant *CDC14* (figure 3). L'analyse d'un fragment d'ADN génomique de levure isolé à plusieurs reprises au cours de ce criblage génétique a montré que le gène *YJL076W* était responsable de la suppression du phénotype de surexpression de *CDC14*.

Des données très récentes sont venues confirmer que *Yj1076w* était directement impliquée dans la régulation de l'activité de *Cdc14*. En effet, la protéine codée par l'ORF (*open reading frame*) *YJL076w* a été isolée simultanément par trois autres

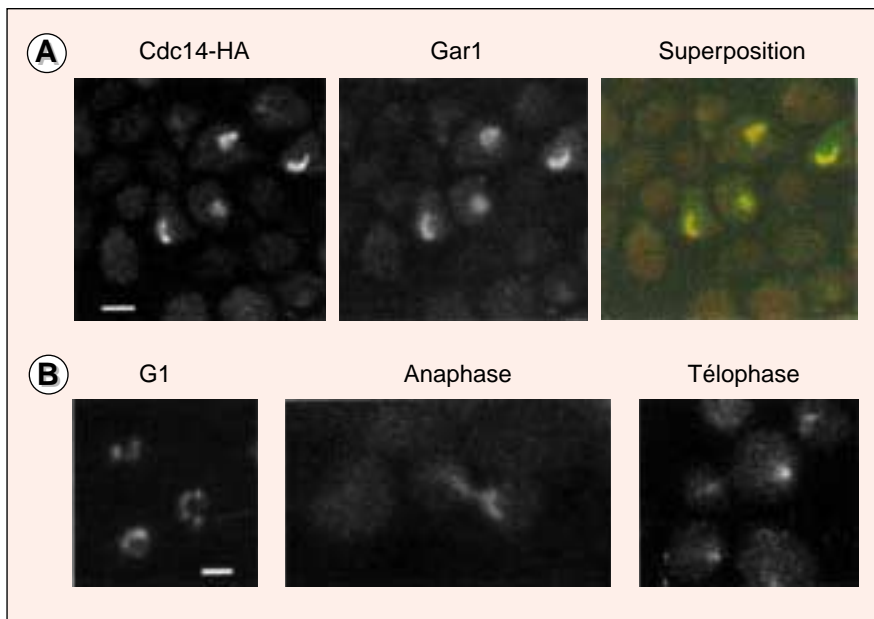


Figure 2. Cdc14 est localisée dans le nucléole pendant la plus grande partie du cycle cellulaire. **A.** Cdc14 co-localise avec Gar1, une protéine nucléolaire. Des cellules asynchrones, de type sauvage, ont été fixées, marquées séquentiellement avec des anticorps anti-HA (qui détecte Cdc14-HA) et anti-Gar1 puis observées en microscopie à fluorescence. Cdc14 et Gar1 sont localisées dans le nucléole ainsi que le montre la superposition des deux signaux (barre: 5 μ m). **B.** En fin de mitose, probablement au moment de la séparation des chromosomes en anaphase, Cdc14-HA (détectée par immunofluorescence comme en A) quitte le nucléole mais reste localisée tout le long du fuseau de division. Quelques minutes plus tard, le signal Cdc14-HA apparaît sous la forme de deux points aux extrémités distales des noyaux maintenant presque complètement séparés des cellules mère et fille.

équipes dans le contexte d'études sur Cdc14 et est maintenant appelée Net1 ou Cfi1 [4, 5, 7]. Les résultats de ces équipes nous indiquent que Net1 est impliquée à la fois dans la dégradation de la cycline mitotique Clb2 (via Tem1 et Cdc15) et dans le *silencing* nucléolaire [4, 7]. Des expériences de spectrométrie de masse et de co-immunoprécipitation nous révèlent que Cdc14 interagit physiquement avec Net1, ainsi qu'avec Sir2, une protéine nucléolaire impliquée dans le *silencing* [4, 7]. En fait, Net1 se comporte comme un inhibiteur de l'activité phosphatase de Cdc14 [4]. De plus, Net1 se révèle également être un substrat de Cdc14. Net1, qui est une phosphoprotéine peut être en effet déphosphorylée par Cdc14 [4]. Par ailleurs, Net1 a été isolée dans un criblage double-hybride avec Cdc14 comme

protéine appât [5]. Finalement, il a été montré que Net1 résidait dans le nucléole et était nécessaire à la localisation de Cdc14 dans le nucléole [4, 5]. Net1 est également impliquée dans le *silencing* nucléolaire qui prend place au niveau des répétitions d'ADNr [7].

Cdc14 active Sic1 et Hct1, deux inhibiteurs du complexe Cdk/cycline chargé du maintien des cellules en mitose

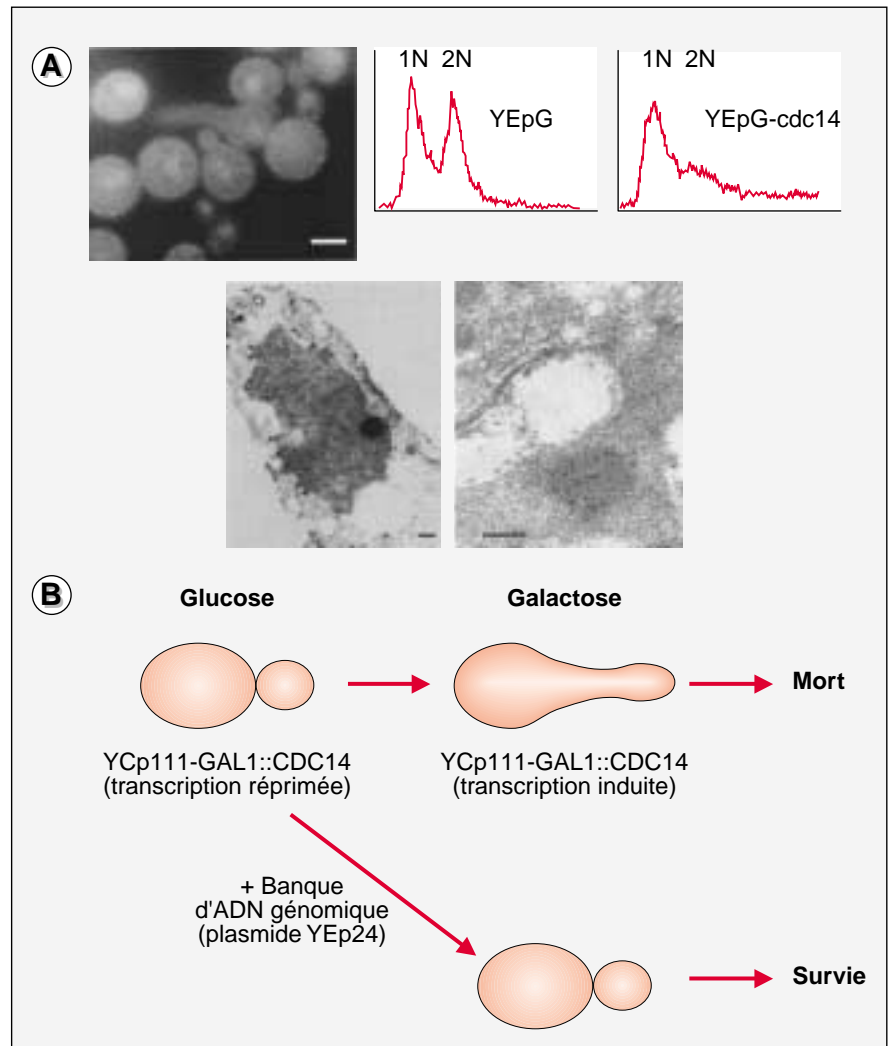
Une fois libérée du nucléole en fin de mitose (anaphase-télophase), Cdc14 déphosphoryle deux substrats, Hct1 et Sic1 [5, 6, 8]. Hct1 est un activateur de l'APC (*anaphase promoting complex*), un complexe universel de dégradation de certaines protéines contrôlant la sortie de mitose [9-11].

Hct1 active spécifiquement la dégradation des cyclines mitotiques, les partenaires de la protéine kinase universelle Cdk1 (Cdc2/Cdc28 chez la levure), tandis que Cdc20, un autre activateur de l'APC, est chargée de dégrader Pds1, une protéine impliquée dans la séparation des chromosomes [12, 13]. Sic1, quant à elle, est ce l'on appelle un CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) qui se lie au complexe Cdk1-cycline (Cdc28-Clb2 chez *S. cerevisiae*) et inhibe son activité kinase [14, 15]. Sic1 contrôle non seulement la transition G1/S [14], mais contribue de plus à l'inhibition de l'activité kinase de Cdc28-Clb2 en fin de mitose. En effet, Cdc14, une fois libérée du nucléole en anaphase, se lie à Sic1 et la déphosphoryle, ce qui a pour conséquence de la maintenir à l'état actif et de favoriser ainsi l'inhibition du complexe Cdc28-Clb2 [6]. La libération de Cdc14 du nucléole se traduit donc par l'activation, par déphosphorylation, de Sic1 et d'Hct1 dont l'action conjuguée inhibe l'activité kinase du complexe Cdc28-Clb2, provoquant ainsi la sortie de mitose (figure 4).

L'identification récente de deux gènes *CDC14* chez l'homme [16] laisse à penser que la protéine phosphatase Cdc14 joue un rôle clé dans l'inactivation du MPF (*M-phase promoting factor*) et la sortie de mitose chez tous les organismes eucaryotes. Cependant, du Cdc14 humain on ne connaît que son homologie de structure et de fonction avec la protéine Cdc14 de levure ainsi que sa localisation dans le noyau chez des cellules humaines en culture α ; sa fonction est par conséquent totalement inconnue [16], contrairement à la situation concernant la protéine Cdc14 de levure, ainsi que nous l'avons vu au cours de cet article. Cdc14 a également été identifiée chez le ver *Caenorhabditis elegans*, un autre modèle génétique très utilisé, et cette fois-ci un organisme eucaryote multicellulaire. Cependant, on ne connaît que la séquence de cette protéine, issue d'un programme de séquençage au hasard de *C. elegans* (les séquences nucléotidiques et en acides aminés figurent dans des banques de données) et aucune donnée sur Cdc14 de *C. elegans* ne figure encore dans la lit-

Figure 3. Identification du gène YJL076 en tant que suppresseur de la toxicité induite par la surexpression de CDC14.

(A) Lorsque CDC14 est surexprimé sous le contrôle du promoteur GAL1 (forte expression induite lorsque l'on fait pousser les cellules en présence de galactose au lieu de glucose), la plupart des cellules arrêtent de se diviser et grossissent en s'arrondissant (cliché de gauche; barre: 3 µm). De telles cellules s'arrêtent en phase G1 du cycle cellulaire, un arrêt caractérisé par une accumulation de cellules possédant un contenu en ADN de leurs chromosomes équivalent à 1N, ainsi que le montre ce profil de FACS après marquage par l'iodure de propidium. Sur la photographie, quelques cellules présentent un bourgeon anormalement allongé, ce qui dénote un arrêt en fin de mitose, tandis que quelques autres cellules plus petites présentant un bourgeon de taille normale nous permettent d'évaluer les différences entre cellules normales et cellules surexprimant CDC14 bloquées en phase G1 ou en fin de phase M. L'observation en microscopie électronique de cellules surexprimant CDC14 nous révèle l'existence de structures anormales dans le nucléole. Une telle structure, visible sur le cliché de gauche sous la forme d'un granule nucléolaire dense aux électrons, contient la protéine Cdc14, révélée ici sur le cliché de droite après immunomarquage à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-HA dirigé contre la protéine Cdc14-HA et d'un anticorps anti-IgG de souris couplé à des billes d'or colloïdal (barre: 200 nm). **(B)** Un criblage génétique fondé sur l'identification de fragments d'ADN capables, lorsque surexprimés d'une banque fabriquée à partir d'ADN génomique de *S. cerevisiae* et clonée dans le plasmide YEp24 (2µm, multi-copies), de restaurer la croissance de cellules surexprimant CDC14 sur milieu galactose, comme expliqué ci-dessus, a permis d'isoler à nombreuses reprises le gène YJL076.



térature. Par ailleurs, un certain nombre d'autres protéines dont il a été discuté dans cet article existent également aussi bien chez la levure que chez l'homme, ainsi que dans d'autres organismes eucaryotes modèles. C'est bien entendu le cas des protéines du complexe Cdc28/Clb2 (Cdc2/cycline), de leurs inhibiteurs, les CKI, ainsi que des protéines du complexe APC qui contrôle l'inactivation des cyclines et des protéines impliquées dans la séparation des chromatides sœurs en anaphase [17].

Les résultats récents sur Cdc14 de *S. cerevisiae* ont également permis d'établir un concept nouveau concernant un rôle jusqu'alors totalement insoupçonné du nucléole dans le contrôle direct de la mitose [18]. À ce propos, il est intéressant de noter que des facteurs de croissance ont été localisés dans le nucléole chez certains mammifères [19] et que l'activation de p53 pourrait dépendre de la localisation dans le nucléole d'une protéine suppresseur de tumeur et de sa séquestration [20]. Il existe donc bien à l'heure

Remerciements

Nous remercions Michèle Caizergues-Ferrer pour l'anticorps anti-Gar1, Stéphane Ory pour son aide en microscopie à fluorescence et Nathalie Grandin pour ses commentaires sur ce manuscrit. Ce travail a été financé par l'Association pour la Recherche contre le Cancer (contrat n° 6162), les Comités Départementaux de l'Ardèche, la Drôme, la Loire et la Haute-Savoie de la Ligue Nationale contre le Cancer et la Région Rhône-Alpes (Programme « Apoptose et vieillissement »). A.A. a reçu une bourse doctorale du Ministère de l'Éducation Nationale.

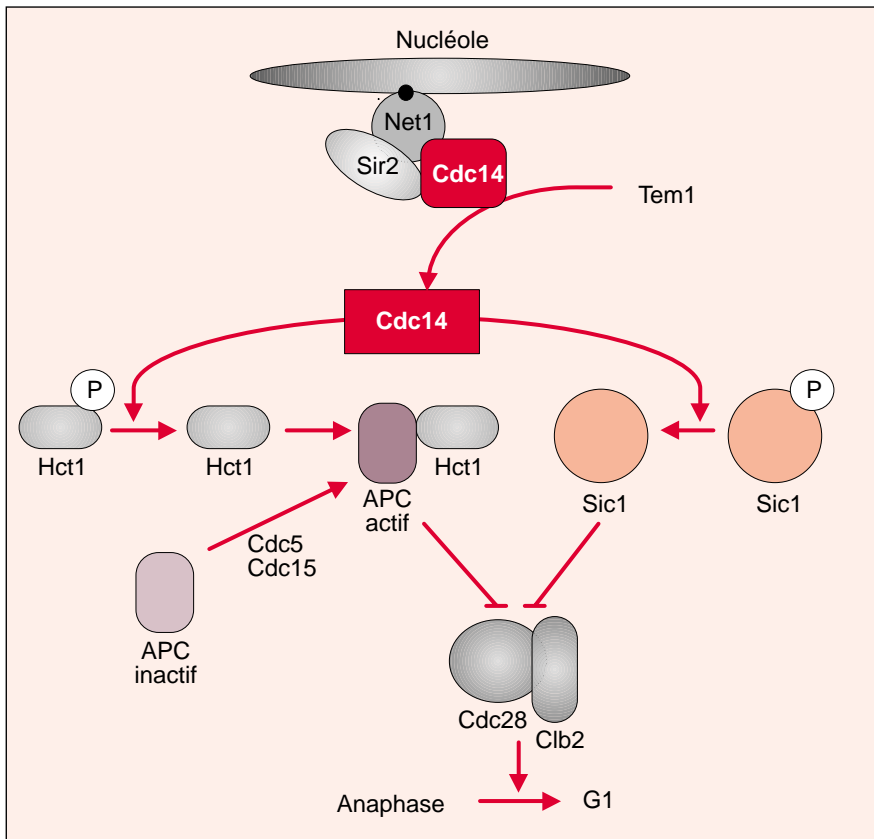


Figure 4. **Modèle proposé pour expliquer les mécanismes de contrôle de la sortie de mitose par la phosphatase Cdc14 sur la base de travaux récemment publiés [4-8].** Cdc14 est localisée dans le nucléole pendant la plus grande partie du cycle cellulaire grâce à ses interactions physiques avec Net1, qui se trouve alors dans un état hypophosphorylé. En anaphase, un réseau de signalisation contrôlé en particulier par Tem1 conduit à la phosphorylation de Net1, ce qui rompt son association avec Cdc14 et provoque le relargage de cette dernière du nucléole et sa redistribution au niveau du fuseau de division. Cdc14 trouve alors ses cibles, Hct1 et Sic1, les déphosphoryle, ce qui déclenche leur activation et provoque l'inhibition du complexe universel de contrôle de la mitose, Cdk-cycline. Hct1 est un activateur du complexe universel APC (anaphase promoting complex) qui comprend au moins 11 sous-unités et agit en tant que ligase E3 du complexe d'ubiquitination des protéines, complexe dont l'activité est réglée en partie par les protéines kinases Cdc5 et Cdc15. Sic1 est un inhibiteur de l'assemblage du complexe actif Cdk-cycline (Cdc28-Clb2). L'action concertée, déclenchée par Cdc14, de ces deux inhibiteurs du complexe Cdk-cycline provoque l'inactivation de ce complexe, un événement indispensable à la sortie de mitose et au passage en phase G1 du cycle cellulaire suivant.

actuelle une convergence de données montrant, chez des organismes eucaryotes éloignés les uns des autres, l'importance du nucléole en tant que réservoir pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire et en particulier de la mitose [18] ■

TIRÉS À PART

M. Charbonneau.

RÉFÉRENCES

- Pringle JR, Hartwell LH. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR, eds. *Molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: life and inheritance*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981: 97-142.
- Wan J, Xu H, Grunstein M. *CDC14* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1992; 267: 11274-80.

- Taylor GS, Liu Y, Baskerville C, Charbonneau H. The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *J Biol Chem* 1997; 272: 24054-63.
- Shou W, Seol JH, Shevchenko A, et al. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 1999; 97: 233-44.
- Visintin R, Hwang ES, Amon A. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 1999; 398: 818-23.
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 1998; 2: 709-18.
- Straight AF, Shou W, Dowd GJ, et al. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 1999; 97: 245-56.
- Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 1999; 9: 227-36.
- Hoyt MA. Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* 1997; 91: 149-51.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274: 1652-9.
- Alexandru G, Zachariae W, Schleiffer A, Nasmyth K. Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J* 1999; 18: 2707-21.
- Visintin R, Prinz S, Amon A. *CDC20* and *CDH1*: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 1997; 278: 460-3.
- Schwab M, Lutum AS, Seufert W. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 1997; 90: 683-93.
- Schwob E, Böhm T, Mendenhall MD, Nasmyth K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{SIC1} controls the G1 to S phase transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 1994; 79: 233-44.
- Borgne A, Meijer L. Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des cyclines: recherche et applications thérapeutiques potentielles. *Med Sci* 1999; 15: 496-503.
- Li L, Ernstring BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dickson JÉ. A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* 1997; 272: 29403-6.
- Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 1999; 97: 431-4.
- Garcia SN, Pillus L. Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 1999; 97: 825-8.
- Pederson T. Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol* 1998; 143: 279-81.
- Zhang Y, Xiong Y. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* 1999; 3: 579-91.