

Dynamique de localisation de la kinase mitotique Aurora-A et caractérisation de la protéine passagère TD-60 au cours de la mitose.

Fabienne Sirot

▶ **To cite this version:**

Fabienne Sirot. Dynamique de localisation de la kinase mitotique Aurora-A et caractérisation de la protéine passagère TD-60 au cours de la mitose.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011481

HAL Id: tel-00011481
https://theses.hal.science/tel-00011481

Submitted on 27 Jan 2006

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

THESE

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : ***Biologie Cellulaire***
(arrêtés ministériels du 05 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Présentée et soutenue publiquement par

Fabienne SIROT

Le 12 décembre 2005

DYNAMIQUE DE LOCALISATION DE LA KINASE MITOTIQUE AURORA-A ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE PASSAGERE TD-60 AU COURS DE LA MITOSE

COMPOSITION DU JURY :

Président : Professeur Johannes GEISELMANN
Rapporteur : Docteur Danièle HERNANDEZ-VERDUN
Rapporteur : Professeur Germain GILLET
Examinateur : Docteur Mohamed BENHAROUGA
Directeur de thèse : Docteur Fabienne HANS

Thèse préparée à l'Institut Albert Bonniot
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation
(Unité INSERM 309)

RESUME

De nombreuses kinases participent au bon déroulement de chaque étape du cycle cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, les kinases Aurora-A et Aurora-B, structuralement très proches, exercent des rôles fondamentaux durant la mitose. Aurora-A est une protéine localisée au niveau des centrosomes, impliquée dans le cycle de division du centrosome et la formation du fuseau mitotique. Aurora-B est une protéine passagère localisée sur les centromères et qui migre, en anaphase, sur le sillon de division et se concentre en cytocinèse sur le corps résiduel. Aurora-B est responsable de la phosphorylation massive, en mitose, du résidu Serine 10 de l'histone H3. Par un système de pseudo-génétique, j'ai ciblé, dans l'extrémité amino-terminale de Aurora-A, le domaine responsable de sa localisation centrosomique. Ces expériences ont également montré que les domaines catalytiques de Aurora-A et Aurora-B possèdent tous deux un signal de localisation centromérique. Mais, à l'inverse de Aurora-B, le domaine catalytique de Aurora-A ne se transfère pas des centromères vers le sillon de division en anaphase. Ces travaux montrent également que Aurora-A est capable d'assurer une partie des fonctions mitotiques de Aurora-B. J'ai, par ailleurs, identifié et cloné la séquence de la protéine passagère TD-60 de Xenopus laevis. J'ai exprimé des domaines protéiques de la protéine xTD60, afin de générer un anticorps spécifique de TD-60 de xénope. Des expériences de co-sédimentation de complexes protéiques d'extraits mitotiques d'œufs de xénope et des expériences d'immunolocalisation cellulaire nous permettent d'envisager pour xTD-60 des fonctions plus larges que celles attribuées aux protéines passagères.

Mots clés : mitose, kinases Aurora, protéines passagères, TD-60, pseudo-génétique, *Xenopus laevis*.

Many kinases control cell cycle progression. In eukaryotic organisms, Aurora-A and Aurora-B kinases have highly similar structures and play fundamental roles during mitosis. Aurora-A kinase localizes on centrosomes and is involved in centrosome cycle and mitotic spindle formation. Aurora-B kinase belongs to the chromosomal passenger protein family : it localizes on centromeres and move to the spindle midzone in anaphase and concentrates on the contractile ring in cytokinesis. Aurora-B is responsible for the mitotic phosphorylation of histone H3 Serine 10 residue. By using a pseudo-genetic approach in human cells, we target, inside the N-terminal region of Aurora-A, the domain involved in the centrosomic localization of Aurora-A. These experiments also demonstrate that both catalytic domains of Aurora-A and Aurora-B contain a signal of centromeric localization. However, in opposite to Aurora-B, the catalytic domain of Aurora-A is not able to transfer from centromeres to spindle midzone in anaphase. Moreover, these results show that Aurora-A partly restores the mitotic functions of Aurora-B. In addition, we have identified and cloned the gene coding for the passenger protein xTD-60 of Xenopus laevis. We have expressed several truncated forms of xTD-60, in order to produce specific antibodies against xTD-60. Co-sedimentation experiments of xenopus eggs mitotic extracts proteins and cellular immunolocalization experiments provide new informations allowing to consider for xTD-60 other functions than those associated to passenger proteins.

Key words : mitosis, Aurora kinases, chromosomal passenger proteins, TD-60, pseudo-genetic approach, *Xenopus laevis*.

REMERCIEMENTS

Il est venu le temps d'écrire ces mots. Je me suis toujours dit que ce serait un moment agréable que de venir dire merci à ceux qui ont partagés les années, les mois, les semaines, voire quelques heures pour certains, de cette aventure que j'ai menée. Ces mots, je les écris comme ils me viennent. Ils sont, comme ceux qui liront ces pages, un symbole.

Merci au Docteur Stefan Dimitrov pour m'avoir ouvert les portes de sa petite « entreprise » il y a de cela 4 ans.

Merci au Docteur Fabienne Hans pour avoir guidé mes premiers pas dans cette atmosphère de travail et pour ses multiples corrections.

Merci au Professeur Michel Robert-Nicoud pour sa disponibilité au cours de la rédaction de ce manuscrit et ses précieuses relectures.

Merci au Docteur Danièle Hernandez-Verdun et au Professeur Germain Gillet pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci au Professeur Hans Geiselmann et au Docteur Mohamed Benharouga pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à Patrick Witomski pour ses mots posés qui ont eu raison de l'aboutissement de ce travail.

Merci aux Docteurs Robert Margolis et Dimitrios Skoufias de l'Institut de Biologie Structurale pour leur collaboration à ce travail de thèse.

Merci à la région Rhône-Alpes pour son financement au cours de ces 3 années de thèse, sans qui il m'aurait été difficile de mener à bien ce travail.

Merci à celles qui ont partagé ma barque dans le laboratoire : Laetitia et son expérience qui m'a aidé à me retrouver et à aller de l'avant, Flore et sa vision toujours souriante des manips, Marlène et sa façon constructive d'appréhender les choses.

Merci à Véronique pour sa sagesse d'esprit, ses conseils avertis et fondés. Tu m'auras appris à suivre mes choix et à les accepter.

Merci à Gaelh pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses discussions si enrichissantes. Tu as toujours les bonnes idées au bon moment. Tu m'as apporté une nouvelle réflexion sur mon travail et sur moi-même et je t'en remercie.

Merci à mes co-locataires de bureau : Alex et tes mots réconfortants quand ça devenait si difficile, Sabrina et Angéline pour votre fraîcheur d'esprit et mes débuts que j'ai revécus à travers vous.

Merci à mes compagnons d'aventure que j'ai si souvent usés avec mes histoires de labo : Taki et cette impression que je te connais depuis toujours, Mister Dro et ses détentes ircéennes, Bouchon et ses attentions, Virgile à qui j'ai tenu parole après 3 ans, Jim et ses apparitions toujours si mystérieuses, Fabien ce petit prince, Aurélien mon Top5 protecteur à distance, CorbN, Cosa, et tous ceux qui ont traversé mon petit chemin de vie.

Merci à ceux qui, par leur mots, m'auront apporté aide, apaisement et réconfort dans les moments où je doutais : mon Ibé adorée, Ed, Perle, Lou, So, Pak', Nina et Bruno, Frob, Mister West le virologiste et tous ceux de l'autre forum …

Merci à toi Loïc pour ces années partagées, qu'elles aient été tendres ou douloureuses. J'ai beaucoup appris de ces moments passés auprès de toi et ils revivent à travers notre Maé.

Merci à toi Maé, mon ange, mon bonheur. Tes sourires, tes rires, tes « gring gring » sur le nez, tes « je t'aime maman » m'auront aidé à tenir. Tu es ma raison d'être, celle qui me soulève un peu plus chaque jour, le prolongement naturel de ce lien que je tisse entre ta mamie du ciel et moi. Ton innocence est ta beauté, fais en ta force.

Merci à toi mon homme pour être, tout simplement. Tu es ma force, j'aurais tenu les derniers instants grâce à ta main et ton admiration. Merci pour ta patience au regard de mes cycles sourires/pleurs et ta disponibilité de cœur. Les débuts sont parfois difficiles. Notre vie commence dès à présent.

A ce grand frère et cette grande sœur, qui liront peut être un jour ce travail.
Qu'ils sachent qu'ils me manquent.

Et mon dernier merci ira là haut, comme un souffle. Aussi puissant que cette main que j'ai serrée si fort, aussi intense que ce regard des derniers instants, aussi douloureux que tout ce que tu as vécu. Tu vois, je suis arrivée à boucler la boucle, pour toi, je te l'avais promis, j'ai tenu bon. Je referme enfin ce livre. Tu t'es battue avec toute ta sagesse, j'ai tenté de mettre ma petite pierre sur cet édifice qu'est la maladie avec tout mon courage.
Que ces mots partis avec toi résonnent pour longtemps encore au fond de moi.

A tous, un tendre merci de fée …

" L'aurore boréale est un météore lumineux qui paraît accidentellement la nuit, dans le nord du ciel, tantôt comme une vague répandue près de l'horizon, et semblable à l'aurore; d'autres fois sous la forme d'une nuée sombre d'où partent des fusées phosphoriques qui parcourent et illuminent en un moment toute l'atmosphère. Quand a lieu une aurore boréale, des rayons lumineux dansent dans le ciel. Il semble que des êtres fantastiques jonglent avec des boules de feu. "

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS 1

TABLE DES TABLEAUX 5

ABREVIATIONS 7

CONTEXTE SCIENTIFIQUE 10

Chapitre 1 : Le cycle cellulaire.....11

I . Les différentes phases du cycle cellulaire 11

A. L'interphase..... 13

B. La division cellulaire 13

a. La mitose.....14

b. La cytocinèse 15

C. Déroulement et contrôle du cycle cellulaire 16

II . Structure et dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire.....18

A. Du nucléosome à la fibre de chromatine de 30 nm 18

a. Le nucléosome 18

b. Le nucléofilament et la fibre de chromatine de 30 nm.....20

B. La chromatine interphasique 21

C. Les chromosomes mitotiques..... 23

a. Les différentes hypothèses d'organisation du chromosome mitotique 23

b. Les acteurs protéiques impliqués dans la condensation des chromosomes 24

c. Profil de phosphorylation des histones en mitose.....25

i La phosphorylation de l'histone H3 en sérine 10 et sérine 28.....25

ii La phosphorylation de CENP-A en sérine 7 26

III . Assemblage et stabilisation du fuseau mitotique 27

A. Les microtubules : constituants du fuseau mitotique..... 27

B. Le centrosome : centre organisateur des microtubules 29

a. Structure et fonction du centrosome 29

b. Le cycle de division du centrosome 30

C. Le fuseau mitotique 31

a. Nucléation des microtubules à partir du centrosome.....31

b. Stabilisation du fuseau mitotique 32

i L'effet chromatine.....32

ii Les mouvements des chromosomes induits par le fuseau mitotique.....33

IV . Conclusion 34

Chapitre 2 : Les kinases mitotiques de la famille Aurora.....36

I . Description générale des sérine/thréonine kinases Aurora.....36

A. Les kinases Aurora au cours de l'évolution. 36

B. Structure des kinases mitotiques Aurora. 38

a. Structure primaire. 38

b. Structure tri-dimensionnelle. 40

C. Profil d'expression et de localisation des kinases Aurora..... 41

a. Aurora-A : une protéine centrosomique. 41

b. Aurora-B : une protéine passagère. 42

c. Aurora-C 43

II . Aurora-A : une kinase mitotique centrosomique. 43

A. Fonctions mitotiques de Aurora-A 44

a. Aurora-A, le centrosome et le fuseau mitotique 44

b. Rôles de Aurora-A au cours de la mitose. 46

B. Pouvoir oncogènique de la kinase Aurora-A..... 46

C. Voies de régulation de l'activité enzymatique de Aurora-A 48

a. Régulation par phosphorylation 48

i La clé de la régulation : auto-phosphorylation du résidu Thr288 48

ii Autres sites de phosphorylation 48

iii Aspects structuraux de la régulation positive par TPX2.....49

iv Modèle d'activation de la kinase Aurora-A 50

b. Régulation négative de Aurora-A par dégradation 51

III . Conclusion 52

Chapitre 3 : Les protéines passagères 54

I . Aurora-B et le complexe des protéines passagères..... 54

A. Les membres de la famille des protéines passagères..... 54

a. La protéine INCENP 54

b. La protéine Survivine 56

c. La protéine Boréaline.....56

d. La kinase mitotique Aurora-B 57

B. Le complexe des protéines passagères 57

C. Les fonctions du complexe des protéines passagères 60

a. Condensation des chromosomes 60

b. Point de contrôle du fuseau mitotique.....61

c. Déroulement de la cytocinèse 63

II . TD-60 : une protéine passagère peu connue 64

A. Caractéristiques générales de TD-60 64
B. TD-60 : un facteur d'échange de nucléotide guanine ?..... 65
III . Conclusion 66
OBJECTIFS 67
RESULTATS 70
Chapitre 1 : Caractérisation des domaines fonctionnels de la kinase mitotique Aurora-A.....71
I . Contexte général de travail..... 71
II . Le système de pseudo-génétique en cellules humaines..... 71
A. Principe de l'ARN interférence 71
B. Principe du système de pseudo-génétique..... 73
III . Le système de pseudo-génétique appliqué à la kinase Aurora-B.....75
A. Phénotype de cellules HeLa en absence de Aurora-B 75
B. Mise au point du système de pseudo-génétique..... 77
a. Construction du vecteur d'expression pcDNA-HA-AurB* 77
b. Le système de pseudo-génétique appliqué à Aurora-B 79
c. Conclusion 80
IV . Identification des domaines fonctionnels de Aurora-A par un système de pseudo-génétique modifié 81
A. Constructions de mutants de délétion de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A 82
B. Essai de caractérisation des domaines fonctionnels de Aurora-A par pseudo-génétique classique 83
C. Caractérisation des domaines fonctionnels de Aurora-A par un système de pseudo-génétique modifié 83
a. Localisation cellulaire de HA-Aurora-A exogène.....83
b. Localisation cellulaire de HA-AurADN30 et HA-AurADN80 84
c. Localisation cellulaire du domaine catalytique de Aurora-A (mutant HA-AurADN120).....84
V .Conclusions..... 87
Chapitre 2 : Caractérisation de TD-60 chez *Xenopus laevis*.....88
I . Identification de la séquence de TD-60 de xénope..... 88
A. Recherche *in sillico* dans les banques de données 88

B. Comparaison de séquence des protéines TD-60 humaine et xénope.....91
II . Production et caractérisation d'un anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminale de xTD-60.....93
A. Clonage, expression et purification de la partie carboxy-terminale de xTD-60.....93
B. Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.193Cter.....95
III . Production et caractérisation d'un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60.....96
A. Clonage, expression et purification de la partie amino-terminale de xTD-60 96
B. Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.160Nter.....97
IV . TD-60 et le complexe des protéines passagères.....99
A. Analyse biochimique du complexe de protéines passagères.....99
B. Essais kinases.....101
a. Phosphorylation de xTD-60 par les kinases Aurora 101
b. Recherche de sites de phosphorylation 103
V .Profil de localisation cellulaire de xTD-60.....104
DISCUSSION 107
Chapitre 1 : Discussion relative à l'identification des domaines fonctionnels de Aurora-A 108
I . Identification du domaine de localisation centrosomique de Aurora-A 108
II . Localisation centromérique du domaine catalytique de Aurora-A 109
III . Fonctionalités des domaines catalytiques de Aurora-A et Aurora-B.....109
Chapitre 2 : Discussion relative à TD-60.....112
I . Analyse de la séquence de xTD-60.....112
II . Caractérisation des anticorps dirigés contre xTD-60.....114
A. Le sérum anti-xTD-60.193Cter.....114
B. L'anticorps anti-xTD-60.160Nter.....115
III . TD-60 : une protéine passagère uniquement ?.....116
A. xTD-60 et le complexe de protéines passagères INCENP/Aurora-B.....116

B. La phosphorylation de l'extrémité amino-terminale de xTD-60 116
C. Profil de localisation de xTD-60 dans des cellules de xénope.. 117
IV . Modèle de dynamique de localisation de TD-60 118
ANNEXE..... 120
Travaux de purification et de cristallisation des kinases Aurora..... 120
I . Clonage et expression des protéines recombinantes Aurora 121
II . Purification des protéines recombinantes Aurora par chromatographie d'affinité..... 122
III . Purification des protéines recombinantes Aurora par FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)..... 123
A. Concentration des protéines recombinantes..... 123
B. Purification des protéines HIS-AurA et HIS-AurADK sur colonne de gel filtration..... 124
IV . Essais de cristallographie de la protéine Aurora-A et de son domaine catalytique..... 125
A. Cristallogenèse : principe 125
B. Obtention de cristaux du domaine catalytique de Aurora-A 126
V .Criblage haut débit d'inhibiteurs spécifiques des kinases Aurora 128
BIBLIOGRAPHIE..... 129

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Le cycle cellulaire et ses points de contrôle 12
Figure 2 : L'interphase et les différentes phases de la mitose observées par immunofluorescence dans des cellules HeLa. 15
Figure 3 : Cellules en fin de cytocinèse : description du sillon de division. 16
Figure 4 : Structure tri-dimensionnelle de l'octamère d'histones (A) et du nucléosome (B)..... 19
Figure 5 : Schéma général des différents niveaux d'organisation de la chromatine : modèle "en boucle". 21
Figure 6 : Organisation de la chromatine interphasique en territoires chromosomiques 22
Figure 7 : Les états de condensation de la chromatine dans un noyau cellulaire eucaryote en interphase. 23
Figure 8 : Exemples de modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones de coeur du nucléosome. 25
Figure 9 : Structure et dynamique du microtubule. 28
Figure 10 : Structure du centrosome. 30
Figure 11 : Le cycle de division du centrosome 31
Figure 12 : « Effet chromatine » et rôle de la GTPase Ran dans l'assemblage du fuseau mitotique. 33
Figure 13 : Mouvement du chromosome au cours de la mitose 34
Figure 14 : Phénotype de mutants aurora chez D. melanogaster à l'origine de la dénomination des protéines Aurora 36
Figure 15 : Structure primaire des kinases Aurora. 39
Figure 16 : Structure tri-dimensionnelle du domaine catalytique des kinases Aurora-A (A) et Aurora-B (B). 40
Figure 17 : Profil de localisation cellulaire de la protéine kinase Aurora-A humaine au cours de la mitose. 42
Figure 18 : Profil de localisation cellulaire de la protéine kinase Aurora-B humaine au cours de la mitose. 43
Figure 19 : Etats conformationnels de Aurora en absence et en présence de TPX2. 49
Figure 20 : Voie d'activation Ran-dépendant de la kinase Aurora-A. 50
Figure 21 : Les domaines de régulation par la voie de dégradation de la kinase Aurora-A 52

Figure 22 : La famille des kinases Aurora et des protéines passagères. 53
Figure 23 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine passagère INCENP. 55
Figure 24 : Structure tri-dimensionnelle de la protéine passagère Survivine sous sa forme dimérique. 56
Figure 25 : Modèle d'interaction du complexe des protéines passagères Aurora-B, INCENP, Survivine. 59
Figure 26 : L'attachement des microtubules aux chromatides sœurs par l'intermédiaire des kinétochores. 62
Figure 27 : Structure tri-dimensionnelle de RCC1 : vue longitudinale (A) et transversale (B). 65
Figure 28 : Le processus d'ARN interférence. 73
Figure 29 : Le système de pseudo-génétique en cellules humaines. 74
Figure 30 : Effet de l'élimination de la kinase Aurora-B par ARN interférence sur le déroulement de la mitose dans des cellules HeLa. 76
Figure 31 : Détection spécifique des protéines Aurora-B endogène et exogène dans le système de pseudo-génétique en cellules humaines. 78
Figure 32 : L'expression d'une protéine Aurora-B exogène restaure le déroulement correct de la mitose dans des cellules dépourvues d'Aurora-B endogène. 79
Figure 33 : Domaines fonctionnels de la kinase Aurora-B. 81
Figure 34 : Schéma des mutants de délétion de l'extrémité amino-terminale de la kinase Aurora-A. 82
Figure 35 : Identification des domaines fonctionnels de la kinase mitotique Aurora-A. 86
Figure 36 : Domaines fonctionnels de la kinase Aurora-A. 87
Figure 37 : Identification de la séquence nucléotidique de TD-60 de xénope. ... 89
Figure 38 : Alignement des séquences peptidiques de hTD-60 et xTD-60. 92
Figure 39 : Production de la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter. 94
Figure 40 : Caractérisation du sérum anti-xTD-60.193Cter. 95
Figure 41 : Production d'un anticorps dirigé contre l'extrémité amino-terminale de xTD-60. 97
Figure 42 : Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.160Nter immunopurifié. 99

Figure 43 : Analyse biochimique par sédimentation sur gradient de glycérol des complexes de protéines passagères dans des extraits mitotiques d'oeufs de xénope. 101
Figure 44 : Phosphorylation de xTD-60 par les kinases Aurora-A et Aurora-B..103
Figure 45 : Prédiction de sites de phosphorylation de l'extrémité amino-terminale de xTD-60. 104
Figure 46 : Profil de localisation cellulaire de xTD-60 dans des cellules de tissus embryonnaires de xénope. 106
Figure 47 : Les acides aminés impliqués dans l'interaction de Aurora-B avec INCENP. 111
Figure 48 : Comparaison de séquences des protéines TD-60 humaine, murine et de xénope. 113
Figure 49 : Régions des motifs structurés de type RCC1 potentiellement reconnues par le sérum anti-xTD-60.193Cter.....115
Figure 50 : Modèle de dynamique de localisation de TD-60. 119
Figure 51 : Profil d'élution des protéines recombinantes HIS-AurA (A), HIS-AurB (B) et HIS-AurADK (C) purifiées sur colonne d'affinité Ni^{2+}. 123
Figure 52 : Profil d'élution des protéines HIS-AurA (A) et HIS-AurADK (B) sur colonne Superdex 200 et analyse par SDS-PAGE des fractions d'élution. 125
Figure 53 : Cristaux de HIS-AurADK obtenus par la méthode de diffusion de vapeur (hanging drop). 127

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste et fonctions des principales kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, d'après (Nigg, E.A. 2001). 17
Tableau 2 : Nomenclature des kinases Aurora (Nigg, E.A. 2001). 37
Tableau 3 : Principaux partenaires (en rouge) et substrats (soulignés) de la kinase mitotique Aurora-A (Katayama, H. *et al.* 2003). 44
Tableau 4 : Principaux substrats de la kinase mitotique Aurora-B 57

ABREVIATIONS

Aa : acides aminés

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

APC/C : Anaphase Promotor Complex/Cyclosome

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : ARN interférence

ARNm : ARN messager

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BTAK : Breast Tumor Activated Kinase

CENP-A : Centromere Protein A

CENP-E : Centromere Protein E

Cdks : Cyclin Dependant Kinases

CMF : Circular Mitotic Figure

Cter : Carboxy-terminal

dsARN : double strand ARN

DTT : DiThioThréitol

EGTA : Ethylene Glycol Tetra-Acetate

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization

γ-TuRC : γ-Tubuline Ring Complex

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GEF : Guanosine Exchange Factor

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

HA : HémAglutinine

HP1 : Heterochromatin Protein 1

H3 : Histone H3

IAP : Inhibitors Apoptosis Protein

INCENP : Inner Centromere Protein

IP : Iodure de Propidium

Ipl1 : Increase In Polyploïdie 1

IPTG : IsoPropyl β-D-ThioGalactopyranose

kDa : kilo Dalton

MAP : Microtubule Associated Protein

MCAK : Mitotic Centromere Associated Kinesin

MgcRacGAP : Male Germ Cell Rac GTPase Activating Protein

MPF : Maturation Promoting Factor

MT : MicroTubule

Neks : NUMA Related Kinases

Nt : NucléoTide

Nter : Amino-terminal

pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerization Chain Reaction

Plks : Polo-like kinases

PP1 : Protéine Phosphatase 1

RCC1 : Regulator of Chromosome Condensation 1

RISC : RNA Induced Silencing Complex

rpm : rotations par minute

RT PCR : Reverse Transcription PCR

siARN : silencing interference ARN

Ser : Sérine

TACC : Transforming Acid Coiled Coil

TCA : Acide Tri-chloro-acétique

TD-60 : Telophase disc 60 kDa

Thr : Thréonine

TPX2 : Targeting Protein for XKLP2

SMC : Structural Maintenance of Chromosomes

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chapitre 1 :Le cycle cellulaire

Tous les eucaryotes supérieurs sont constitués d'un nombre important de cellules qui se multiplient par division cellulaire. Les premières observations de la division cellulaire datent d'un siècle et demi avec la célèbre proposition de Rudolf Virchow en 1858 ***« omnis cellula e cellula »*** : toute cellule provient d'une cellule. Le concept de « cycle cellulaire » découle des travaux de Howard et Pelc (1953). Ils découvrent que l'ADN est synthétisé durant une période réduite de la vie de la cellule et démontrent que les processus de division cellulaire et de duplication des chromosomes sont deux processus temporellement dissociés.

Une brève introduction des différentes phases du cycle cellulaire fera l'objet de la première partie de ce chapitre. J'aborderai, dans une seconde partie, la structure et la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire. Pour finir, je décrirai les mécanismes d'assemblage du fuseau mitotique en mitose. Le but de ce premier chapitre est de montrer comment les kinases mitotiques Aurora régulent, contrôlent et synchronisent de nombreuses étapes du cycle cellulaire.

I . Les différentes phases du cycle cellulaire

Une cellule qui n'est pas en cycle de division est dans un état quiescent ou phase Go. Lorsqu'elle est stimulée par des facteurs de croissance, la cellule initie un cycle cellulaire. Il permet à partir d'une cellule mère d'obtenir deux cellules filles contenant le même patrimoine génétique. Un cycle cellulaire comporte deux grandes parties : l'interphase et la division cellulaire (ou phase mitotique) (Figure 1).

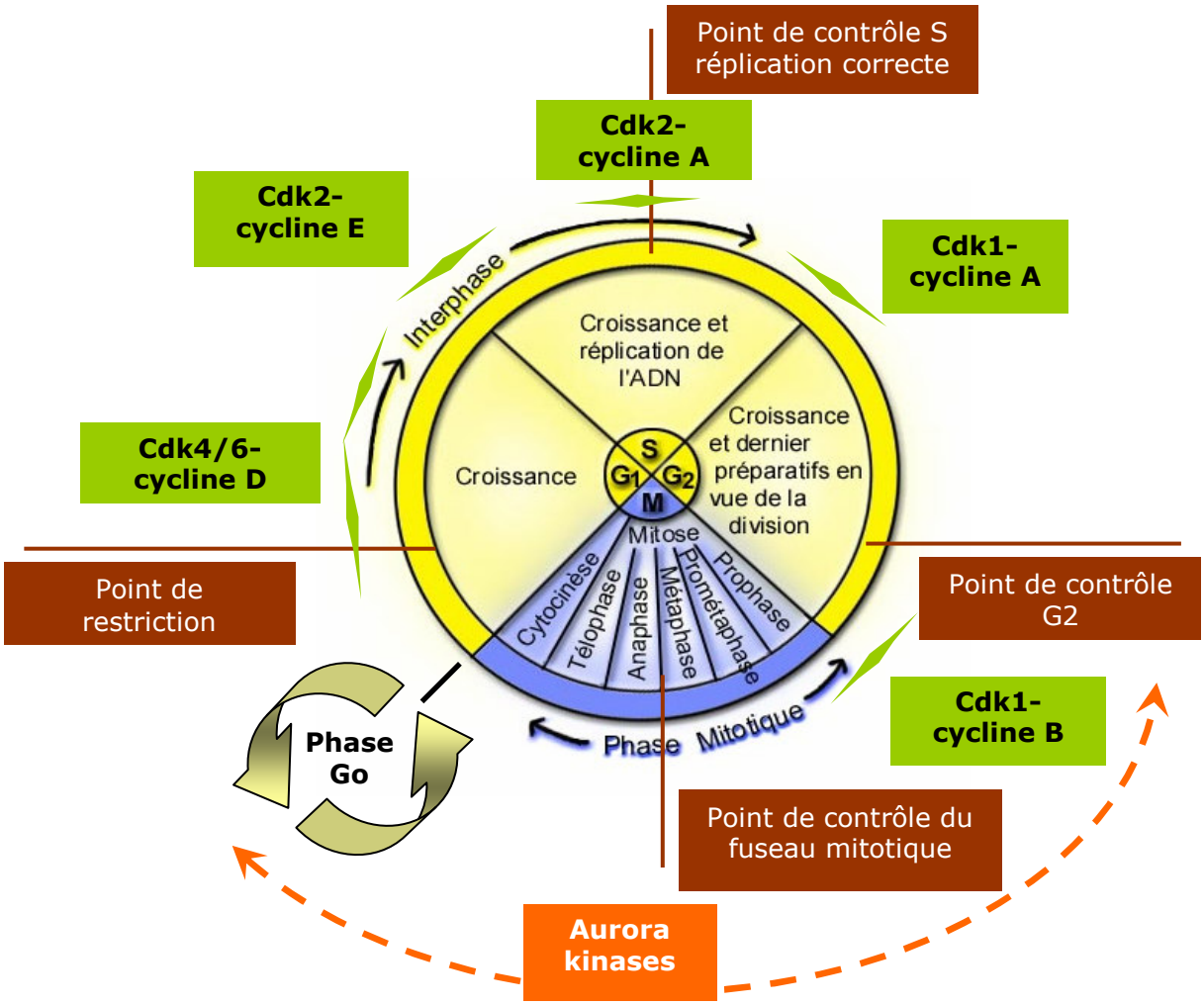


Figure 1 : Le cycle cellulaire et ses points de contrôle

L'interphase en jaune regroupe les 3 phases G1, S et G2 au cours desquelles la cellule croît et duplique son ADN. La mitose en bleu comporte 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, la anaphase et la télophase. La cytocinèse (ou cytodiérèse) conduit à la division « physique » des deux cellules filles. Plusieurs points de contrôle, à différentes étapes du cycle cellulaire, permettent à la cellule mère de vérifier l'intégrité du patrimoine génétique et sa répartition équitable entre les deux cellules filles. Différentes kinases mitotiques qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire sont indiquées. Modifié d'après :
http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/Images/etapedemitose.jpg

A. L'interphase

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

La phase G1 (G pour gap) est la phase la plus longue du cycle cellulaire au cours de laquelle la cellule est en pleine croissance. La cellule reçoit des signaux dits mitogènes qui l'autorisent à passer une barrière de non-retour, le point de restriction, au-delà de laquelle la présence de facteurs de croissance n'est plus nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Elle synthétise essentiellement les constituants qui lui seront nécessaires pour la réplication de l'ADN.

La phase S : Cette phase de synthèse d'ADN, qui se déroule selon un mécanisme de réplication semi-conservatif, permet la duplication de la totalité de l'information génétique. A la fin de la phase S, tous les chromosomes possèdent deux chromatides sœurs qui restent physiquement attachées l'une à l'autre grâce aux complexes protéiques « cohésines ». La cellule entame également la duplication de son centrosome au cours de cette phase (Figure 11).

La phase G2 : Durant cette période de croissance finale, la cellule se prépare à entrer dans la phase de division cellulaire et synthétise la plupart des protéines nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire.

B. La division cellulaire

La division cellulaire comprend la mitose et la cytocinèse. La mitose est marquée par un cycle de condensation/décondensation des chromosomes associé à un cycle de phosphorylation/déphosphorylation des histones H1 (Gurley, L.R. *et al.* 1978) (Bradbury, E.M. *et al.* 1973) et H3 (Hans, F. and Dimitrov, S. 2001). La mitose se divise en cinq étapes de la prophase à la télophase (Figure 2). Une réorganisation importante du cytosquelette interphasique a également lieu au cours de la mitose. Elle mène à la formation du fuseau mitotique (Wittmann, T. *et al.* 2001). La cytocinèse est, quant à elle, l'étape finale de la division cellulaire. Elle conduit à l'individualisation des deux cellules filles.

a.La mitose

- Prophase (Figure 2B) **:** C'est au cours de la prophase que la chromatine commence à se condenser. De nombreux changements ont lieu dans le cytoplasme. Les centrosomes, dupliqués en interphase, se séparent et entament leur migration à deux pôles diamétralement opposés dans le noyau. Ils formeront les futurs pôles du fuseau mitotique. La réorganisation des composants du cytosquelette interphasique conduit en périphérie de l'enveloppe nucléaire à la formation du fuseau mitotique à partir des centrosomes, dont l'activité nucléante augmente. L'enveloppe nucléaire commence à se désagréger.

- Prométaphase (Figure 2C) **:** Au cours de la phase tardive de la prophase, ou prométaphase, la membrane nucléaire se désagrège complètement sous forme de petites vésicules membranaires. La condensation des chromosomes continue. Le fuseau mitotique s'organise dans toute la cellule. Il est constitué de microtubules polaires, astraux et kinétochoriens. Ces derniers capturent les chromosomes au niveau de leurs centromères par l'intermédiaire d'une structure protéique appelée le kinétochore. C'est le début des mouvements de congression des chromosomes (Nicklas, R.B. and Arana, P. 1992) (Kapoor, T.M. and Compton, D.A. 2002).

- Métaphase (Figure 2D) **:** Elle est caractérisée par une condensation maximale des chromosomes. Les chromatides sœurs sont alors physiquement liées l'une à l'autre uniquement grâce aux cohésines centromériques. Chaque chromatide de chaque paire de chromosomes est reliée à un pôle opposé du fuseau mitotique par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens. A la fin des mouvements de congression, les chromosomes sont alignés sur un même plan, la plaque métaphasique.

- Anaphase (Figure 2E) **:** L'anaphase marque la séparation des chromosomes à deux chromatides en deux lots égaux de chromosomes à une chromatide et le début de leur décondensation. En effet, chacune des deux chromatides sœurs d'un même chromosome sont tirées vers un pôle opposé de la cellule par les microtubules kinétochoriens, qui se dépolymérisent à mesure de la progression de la migration des chromosomes. Les microtubules polaires quant à eux s'allongent pour préparer la future séparation des deux cellules filles.

- Télophase (Figure 2F) **:** Les chromosomes achèvent leur décondensation et les enveloppes nucléaires des cellules filles se reconstituent. Le fuseau mitotique se dépolymérise progressivement.

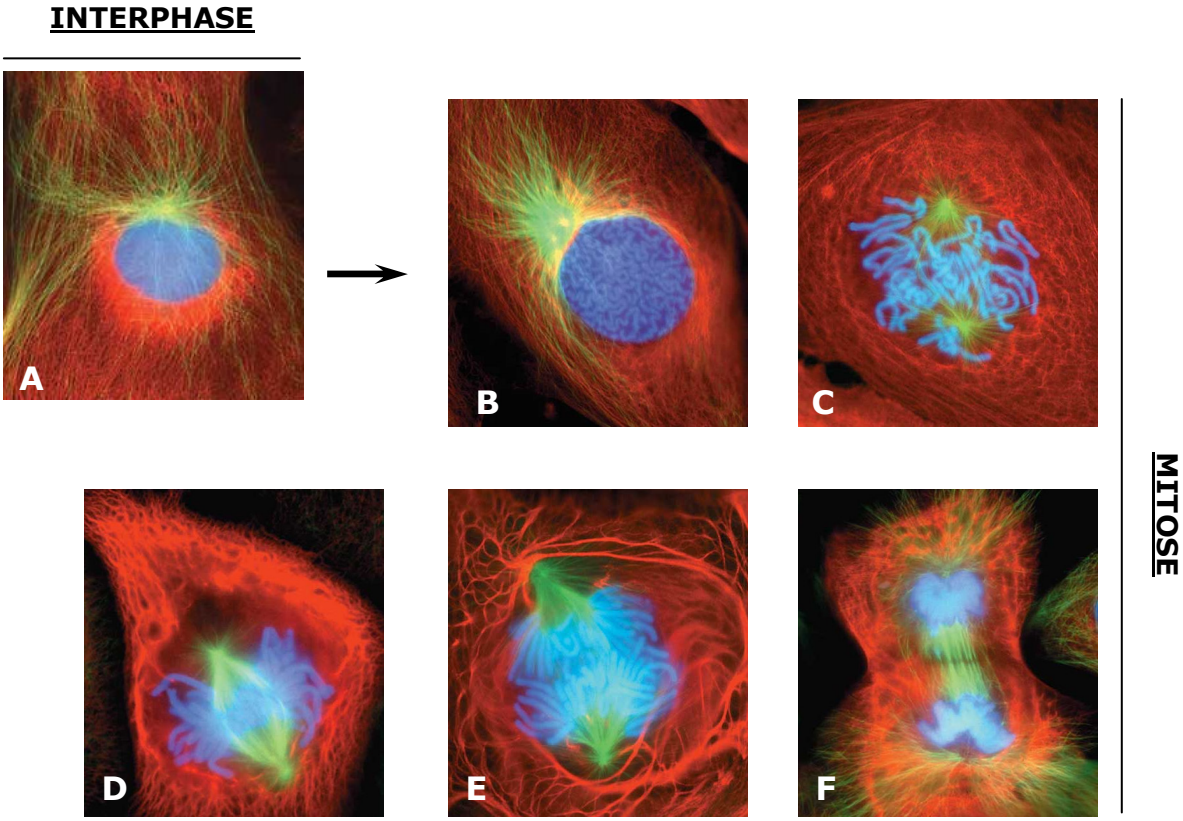


Figure 2 : L'interphase et les différentes phases de la mitose observées par immunofluorescence dans des cellules HeLa.

(**A**) L'interphase, (**B**) la prophase, (**C**) la prométaphase, (**D**) la métaphase, (**E**) l'anaphase et (**F**) la télophase sont observées par marquage immunofluorescent : l'ADN en bleu, les microtubules en vert, l'actine en rouge (voir le texte pour les explications). D'après http://www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/12.5(a_à_f).jpg

b.La cytocinèse

La cytocinèse est le processus qui permet la séparation physique des deux cellules filles en fin de mitose. Un anneau contractile, constitué principalement de filaments d'actine et de myosine, se forme autour de la membrane plasmique. Il conduit à l'apparition d'un sillon de division marqué par l'invagination de la membrane cytoplasmique, dans un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau

mitotique. L'anneau contractile se resserre progressivement jusqu'à former un corps résiduel en toute fin de cytocinèse. Il disparaît lors de l'individualisation complète des deux cellules filles (Glotzer, M. 2003) (Figure 3).

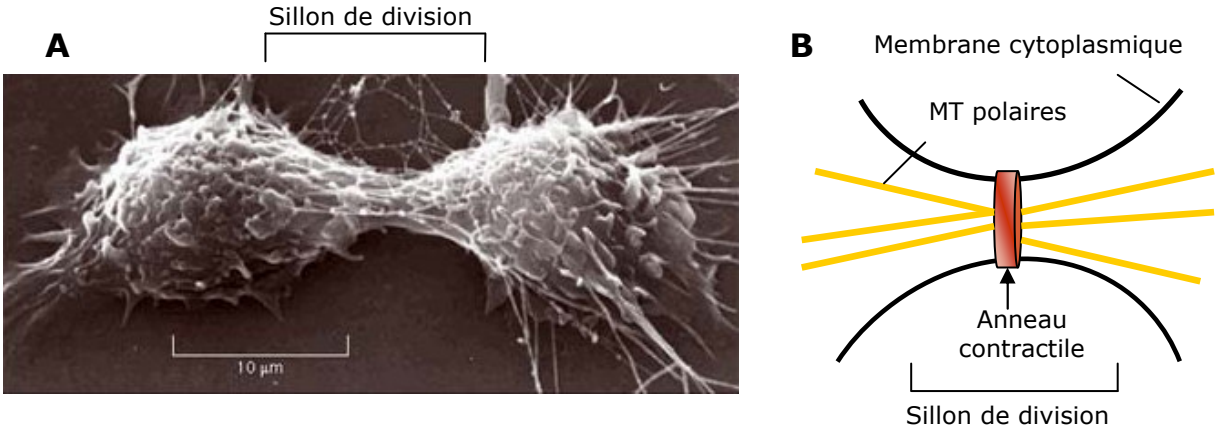


Figure 3 : Cellules en fin de cytocinèse : description du sillon de division.

(**A**) Cliché de microscopie électronique de deux cellules en fin de division cellulaire et (**B**) schéma simplifié du sillon de division entre deux cellules filles. L'anneau contractile, constitué de filaments d'actine et de myosine, entoure la membrane plasmique et permet la constriction des microtubules (MT) polaires afin d'individualiser les deux cellules filles. Modifié d'après : http://www.classwire.com/RessourceCenter?pubId=103&bookId=170&chapter=19&packId=38.

En fin de mitose, les deux cellules filles peuvent à nouveau entrer dans un cycle de division cellulaire ou rester en phase de repos Go (Figure 1)

C. Déroulement et contrôle du cycle cellulaire

Le déroulement du cycle cellulaire est extrêmement régulé et contrôlé afin de vérifier l'intégrité du patrimoine génétique et d'en assurer sa transmission correcte (Abraham, R.T. 2001) (Clarke, D.J. and Gimenez-Abian, J.F. 2000) (Castro, A. *et al.* 2003) (Musacchio, A. and Hardwick, K.G. 2002) (Figure 1). De nombreuses kinases, activées séquentiellement et en interconnexion les unes avec les autres, participent au bon déroulement de chaque étape du cycle cellulaire (Nigg, E.A. 2001) (Tableau 1).

Famille de kinases mitotiques	Fonction
Cdks	Régulation du cycle cellulaire : Cdk4/6 – cycline D : phase G1 Cdk2 – cycline E : transition G1 / S Cdk2 – cycline A : phase S Cdk1 – cycline A : transition S / G2 Cdk1 – cycline B : transition G2 / mitose
Plks	Maturation des centrosomes Ségrégation des chromosomes
Neks	Séparation des centrosomes Condensation des chromosomes mitotiques
Aurora	Régulation du cycle du centrosome Phosphorylation mitotique de H3 Cytocinèse Point de contrôle du fuseau mitotique

Tableau 1 : Liste et fonctions des principales kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, d'après (Nigg, E.A. 2001).

Les kinases majoritaires qui synchronisent et régulent le cycle cellulaire sont les Cyclin dependant kinases (Cdks) (Norbury, C. and Nurse, P. 1990). Ces kinases agissent en association avec les cyclines, de petites protéines activatrices (Pines, J. 1995) (Murray, A.W. 2004). Différentes combinaisons de couples Cdk / Cycline assurent le contrôle et les transitions correctes des différentes phases du cycle cellulaire (Figure 1). D'autres familles de protéines kinases découvertes plus récemment interviennent dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi les Polo-like kinases (Plks), les NIMA-related kinases (Neks) et les kinases Aurora sont impliquées dans le cycle de division du centrosome en interphase et dans la condensation et la ségrégation des chromosomes en mitose (Nigg, E.A. 2001) (Tableau 1).

Une amplification anormale ou une mauvaise répartition du matériel génétique au sein des deux cellules filles aboutit à des proliférations cellulaires non contrôlées ou à la mort cellulaire par apoptose (Jallepalli, P.V. and Lengauer, C. 2001). C'est pourquoi de nombreux points de contrôle de l'intégrité du matériel génétique ponctuent le cycle cellulaire. Parmi eux, le point de contrôle du fuseau mitotique permet la transition métaphase/anaphase (Figure 1), uniquement si tous les chromosomes sont correctement alignés sur la plaque métaphasique. Les kinases Aurora, dont les fonctions mitotiques seront décrites dans ce manuscrit, sont impliquées dans ce point de contrôle important de la division cellulaire.

II . Structure et dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire

Pour être contenu dans le volume nucléaire, le matériel génétique est organisé en une structure compacte composée d'ADN et de protéines histones : la chromatine (Felsenfeld, G. and Groudine, M. 2003). Afin d'assurer la transmission fidèle du matériel génétique aux deux cellules filles, la chromatine, extrêmement dynamique, subit au cours du cycle cellulaire un cycle de condensation/décondensation massives.

Après avoir présenté les principales données concernant la structure et la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire, je montrerai que l'activité enzymatique des kinases Aurora est associée à l'assemblage des chromosomes mitotiques.

A. Du nucléosome à la fibre de chromatine de 30 nm

a.Le nucléosome

Le nucléosome est le premier niveau de compaction de l'ADN. Chaque nucléosome est constitué d'un octamère d'histones de cœur, autour duquel s'enroule 146 paires de bases d'ADN en 1.65 tours (Luger, K. *et al.* 1997).

L'octamère d'histones de coeur contient les histones H2A, H2B, H3 et H4 présentes chacune en deux exemplaires (Arents, G. *et al.* 1991).

Les histones sont des petites protéines basiques extrêmement conservées au cours de l'évolution et riches en résidus arginines et lysines. Les histones de coeur possèdent un domaine central très structuré, appelé « histone fold » qui comprend 3 hélices α, séparées par deux boucles (Wang, B.C. *et al.* 1994) (Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. 1999). Les domaines « histone fold » des histones H3 et H4 s'organisent en tétramères $(H3\text{-}H4)_2$ sur lesquels vient interagir de chaque coté un dimère (H2A-H2B) pour former l'octamère d'histones. La structure de l'octamère d'histones a été caractérisée par les travaux de Arents *et al.* (1991) à une résolution de 3.1 Å et celle du nucléosome par ceux de Luger *et al.* (1997) à 2.8 Å (Figure 4). Les extrémités N-terminales des histones, dont la structure tridimensionnelle reste encore méconnue, représentent quant à elles environ 20 % du poids moléculaire de la protéine totale. Elles sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles.

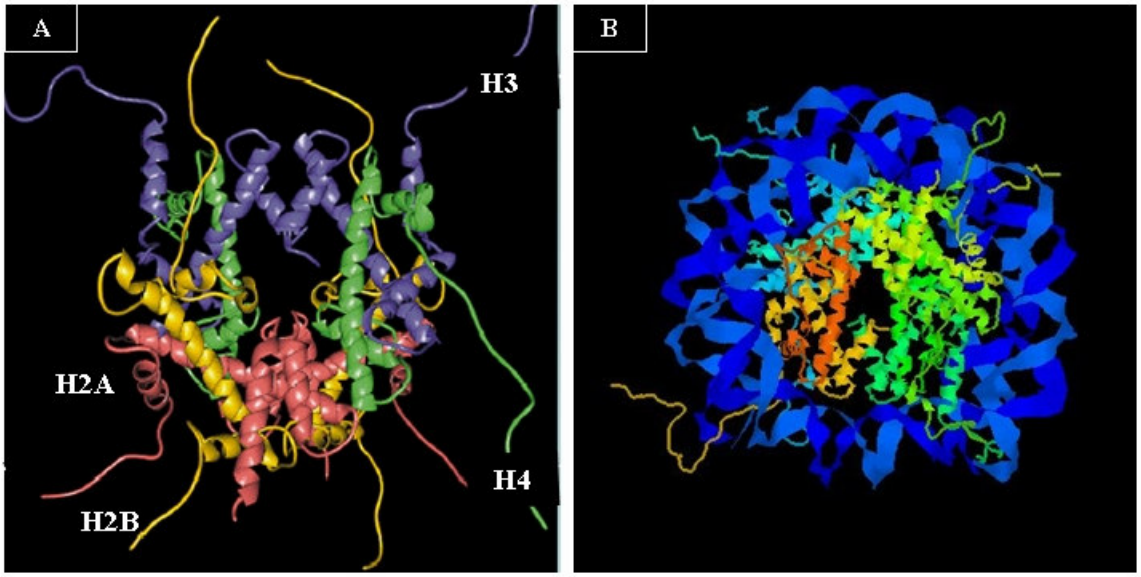


Figure 4 : Structure tri-dimensionnelle de l'octamère d'histones (A) et du nucléosome (B).

(**A**) Les quatre histones de coeur H2A (rouge), H2B (jaune), H3 (bleu) et H4 (vert) s'organisent en octamère. (**B**) Les extrémités N-terminales des histones, peu structurées par rapport au domaine central « histone fold » constitué d'hélices α, pointent vers l'extérieur de la structure nucléosomique. Modélisation par le programme Rasmol d'après PDB ID : 1EQZ (Luger, K. *et al.* 1997).

De nombreux variants des histones H2A, H2B et H3 ont été caractérisés comme des protéines structuralement proches des histones de cœur. Ces variants sont capables de former des nucléosomes avec des propriétés physico-chimiques et structurales légèrement différentes de celles d'un nucléosome conventionnel (Malik, H.S. and Henikoff, S. 2003).

Le rôle des variants d'histones fait l'objet de nombreuses études. CENP-A, variant de l'histone H3, est localisé exclusivement aux régions centromériques des chromosomes (Sullivan, K.F. *et al.* 1994). CENP-A intervient dans l'assemblage des kinétochores et représente la signature fonctionnelle des centromères (Cleveland, D.W. *et al.* 2003). Il a été montré que ce variant joue un rôle dans la condensation des chromosomes et l'achèvement de la mitose (Zeitlin, S.G. *et al.* 2001) (Kunitoku, N. *et al.* 2003). Le variant H2A.Z quant à lui est enrichi au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromérique et semble impliqué dans le recrutement des protéines passagères (Rangasamy, D. *et al.* 2003) et dans la ségrégation des chromosomes (Rangasamy, D. *et al.* 2004).

b.Le nucléofilament et la fibre de chromatine de 30 nm

La succession des nucléosomes (Figure 5A) forme ce que l'on appelle le nucléofilament (Kornberg, R.D. and Lorch, Y. 1999). En microscopie électronique, ce nucléofilament qui correspond à la chromatine décondensée apparaît sous la forme d'un collier de perles de 11 nm de diamètre, correspondant au diamètre d'un nucléosome (Figure 5B). Certains travaux suggèrent que le nucléofilament pourrait former par des enroulements successifs une fibre de 30 nm (Figure 5C), en présence de l'histone H1 et dans certaines conditions de concentrations ioniques (Thoma, F. *et al.* 1979), selon un modèle dit « en solénoïde ». Mais d'autres modèles d'organisation de la fibre de chromatine de 30 nm sont proposés sans pour autant que la structure de cette fibre soit clairement établie (Widom, J. and Klug, A. 1985) (van Holde, K. and Zlatanova, J. 1995) (Bednar, J. *et al.* 1998). Au-delà de 30 nm, les niveaux supérieurs de compaction de la chromatine restent encore très peu connus. Ce manque de connaissance s'explique principalement par la difficulté d'extraire la chromatine à l'état natif et par l'absence de technique de microscopie adéquate.

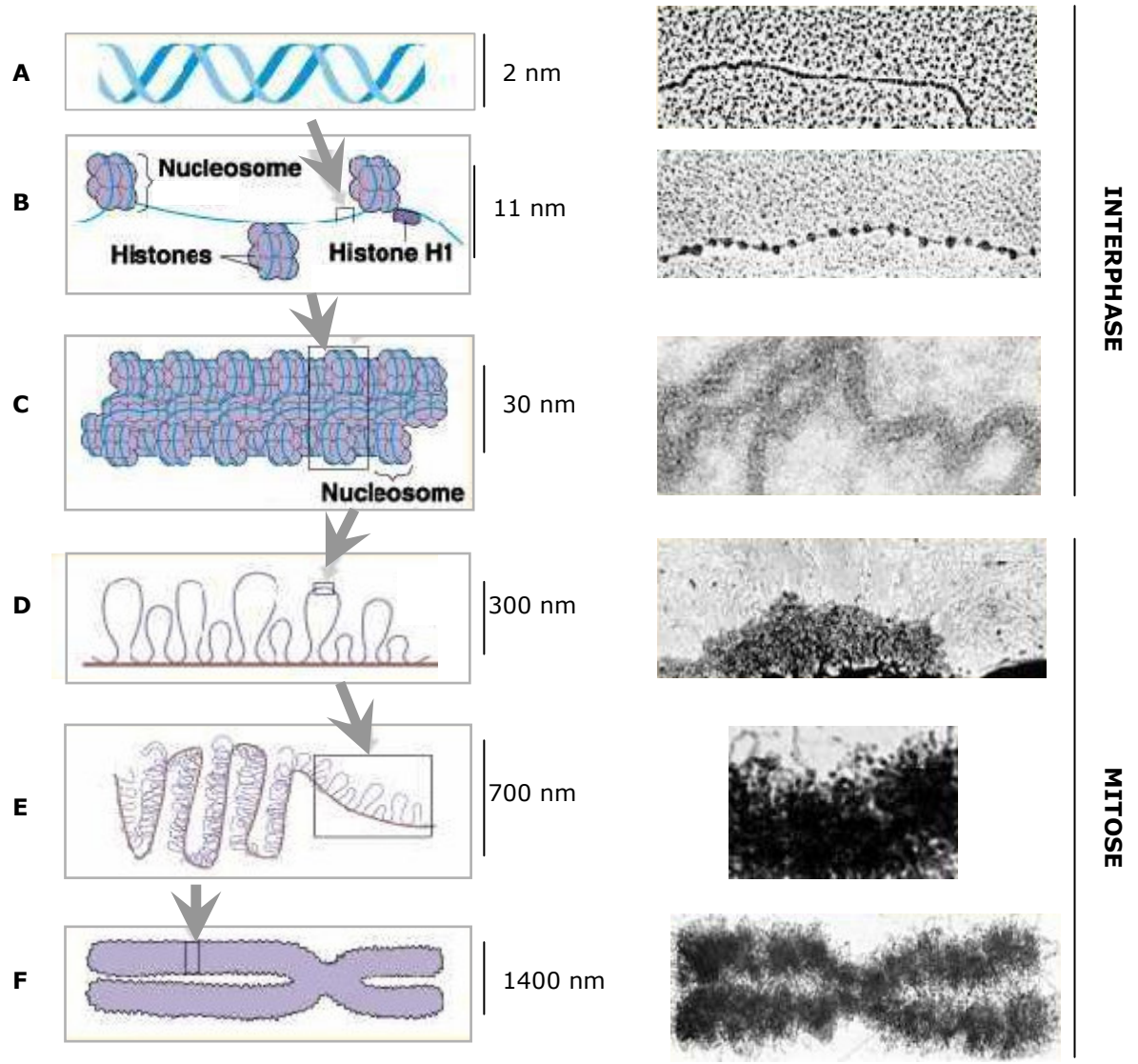


Figure 5 : Schéma général des différents niveaux d'organisation de la chromatine : modèle "en boucle".

La double hélice d'ADN (**A**) s'enroule autour d'octamères d'histones et forme le nucléosome, élément structural de base de la chromatine. L'enchaînement des nucléosomes constitue le nucléofilament (**B**). Le sur-enroulement des nucléofilaments constitue la fibre de 30 nm (**C**). Cette fibre pourrait subir plusieurs étapes successives d'enroulement (**D**,**E**), ce qui permettrait à l'ADN d'atteindre un degré de compaction maximal dans les chromosomes métaphasiques (**F**).
Modifié d'après http://fig.cox.miami.edu~cmallery/150/proceuc/chromosome.jpg

B. La chromatine interphasique

L'impossibilité d'observer des chromosomes en microscopie optique et électronique a conduit à penser à tort que la chromatine interphasique était

disposée aléatoirement dans le noyau. Le développement de techniques d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), et en particulier la technique de peinture chromosomique, a permis d'étudier l'organisation de la chromatine interphasique au sein du noyau. On sait désormais que les chromosomes sont présents dans le noyau sous forme de territoires distincts appelés territoires chromosomiques (Cremer, T. and Cremer, C. 2001) (Figure 6).

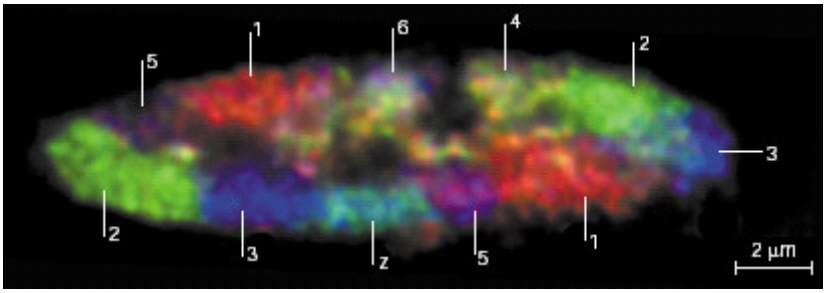


Figure 6 : Organisation de la chromatine interphasique en territoires chromosomiques

Section optique par microscopie confocale d'un noyau de fibroblaste de poulet immunomarqué par FISH. Certains territoires chromosomiques sont représentés (les numéros correspondent aux numéros des chromosomes) (Cremer, T. and Cremer, C. 2001).

D'autre part, l'observation en microscopie électronique d'un noyau de cellule eucaryote en interphase permet de distinguer deux états de compaction de cette chromatine interphasique : l'hétérochromatine et l'euchromatine (Figure 7). L'hétérochromatine, ou chromatine condensée, est localisée principalement à la périphérie du noyau et associée à la face interne de l'enveloppe nucléaire. Elle est observée également en amas isolés au centre du noyau, dans des régions périnucléolaires (Richards, E.J. and Elgin, S.C. 2002). L'euchromatine, ou chromatine décondensée, apparaît au microscope peu contrastée et localisée principalement dans des régions intermédiaires.

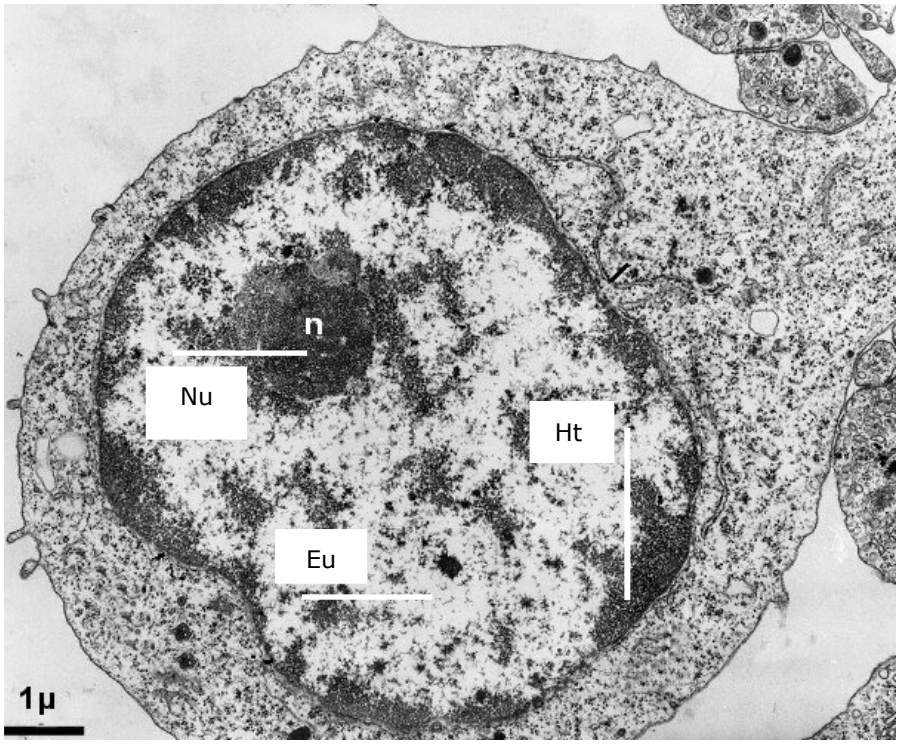


Figure 7 : Les états de condensation de la chromatine dans un noyau cellulaire eucaryote en interphase.

L'euchromatine (Eu), moins dense aux électrons, apparaît en clair. Les régions plus sombres sous la membrane nucléaire représentent l'hétérochromatine (Ht) et le nucléole (Nu).
Modifié d'après http://cell.sio2.be/noyau/images/nucleole2.jpg

C. Les chromosomes mitotiques

a.Les différentes hypothèses d'organisation du chromosome mitotique

C'est au cours de la mitose, en métaphase, que les chromosomes atteignent leur état de compaction maximale. L'architecture du chromosome mitotique n'étant pas résolue à l'heure actuelle, plusieurs modèles d'organisation existent (Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. 2001) (Swedlow, J.R. and Hirano, T. 2003).

La Figure 5 présente une organisation probable dite « en boucle » de la chromatine (Saitoh, Y. and Laemmli, U.K. 1994). Dans ce modèle, la fibre de

chromatine de 30 nm (Figure 5C) s'organiserait, par des étapes successives d'enroulements en larges boucles, en une fibre de chromatine de 300 nm de diamètre (Figure 5D) puis, en une fibre de 700 nm (Figure 5E) correspondant à la taille d'une chromatide de chromosome métaphasique (Figure 5F).

D'autres modèles d'étude proposent une organisation hélicoïdale de la chromatine (Manuelidis, L. and Chen, T.L. 1990) ou encore une organisation basée sur l'ancrage de la fibre de 30 nm sur des axes protéiques fins et rigides (Houchmandzadeh, B. and Dimitrov, S. 1999) (Almagro, S. *et al.* 2004).

b.Les acteurs protéiques impliqués dans la condensation des chromosomes

Deux classes de protéines non histones semblent participer au processus de condensation des chromosomes mitotiques : les protéines SMC (Structural maintenance of chromosomes) et la Topoisomérase de type II (Hirano, T. 2002) (Koshland, D. and Strunnikov, A. 1996).

- La famille des protéines SMC est constituée de cinq éléments. Ces protéines existent dans la cellule majoritairement sous la forme de complexes de haut poids moléculaire en s'associant à d'autres protéines non SMC (Hirano *et al.,* 1999). Un de ces complexes, le complexe 13S des condensines, se lie aux chromosomes en tout début de mitose et participe à la condensation de ces derniers. Toutefois son mode d'action reste encore méconnu (Schmiesing, J.A. *et al.* 2000). D'autres complexes SMC ont été caractérisés à ce jour. Ainsi les cohésines, constituées d'un hétérodimère SMC et de deux protéines non SMC, se fixent le long des chromosomes et participent, au cours de la mitose, à la cohésion des chromatides sœurs depuis la phase S jusqu'à l'anaphase (Hirano, T. 2002) (Swedlow, J.R. and Hirano, T. 2003)

- La Topoisomérase II est une enzyme dimérique abondante au sein du noyau. Elle induit une coupure double brin de l'hélice d'ADN, permettant ainsi la relaxation de molécules d'ADN sur-enroulées. La Topoisomérase II interviendrait lors de la condensation des chromosomes mitotiques en tant que « dérouleur » de l'ADN. Elle limiterait ainsi les contraintes topologiques qui résultent du surenroulement de la fibre de chromatine. Son activité semble également nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs en anaphase (Andreassen,

P.R. *et al.* 1997). Il a par ailleurs été mis en évidence une phosphorylation de la topoisomérase II par la kinase mitotique Aurora-B (Morrison, C. *et al.* 2002).

c.Profil de phosphorylation des histones en mitose.

Les extrémités amino-terminales des histones qui pointent en dehors de la structure nucléosomale (Figure 4) sont très accessibles et subissent différentes modifications post-traductionnelles : acétylation, phosphorylation, méthylation, poly-ADP-rybosylation ou ubiquitination (Figure 8).

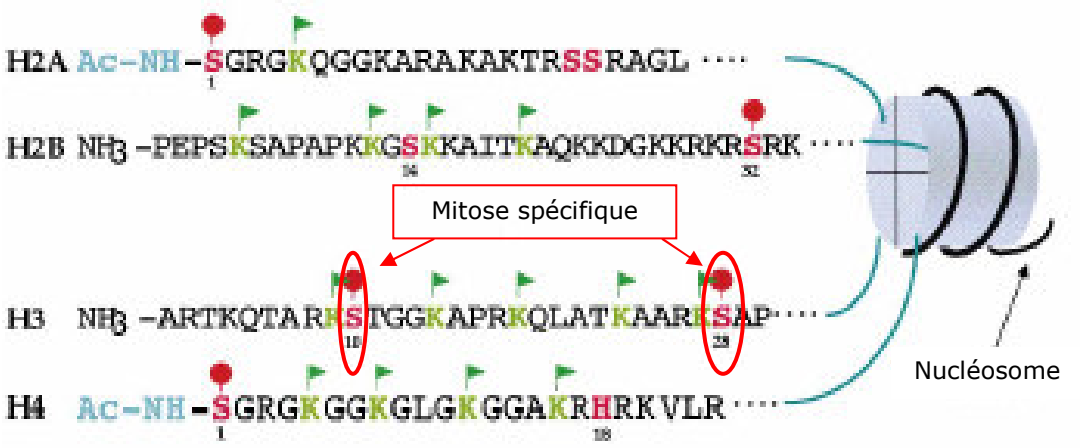


Figure 8 : Exemples de modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones de coeur du nucléosome.

Les phosphorylations sont indiquées par des ronds rouges, les acétylations par des triangles verts. Modifié d'après (Cheung, P. *et al.* 2000).

Les multiples combinaisons de modifications post-traductionnelles définissent un langage baptisé « code histone » qui serait à la base de processus très spécifiques de régulation de l'information génétique (Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000) (Cosgrove, M.S. *et al.* 2004). Par exemple, la phosphorylation des résidus en position Ser 10 et Ser 28 de l'histone H3 en mitose est associée au phénomène de condensation des chromosomes mitotiques.

i La phosphorylation de l'histone H3 en sérine 10 et sérine 28.

Il est bien établi depuis 30 ans que le niveau global de phosphorylation des histones fluctue de manière très marquée au cours du cycle cellulaire

(Bradbury, E.M. *et al.* 1973). Les travaux de Gurley *et al.* (1978) ont notamment caractérisé l'existence de pics de phosphorylation de l'histone H3 au cours de la mitose. Cette phosphorylation post-traductionnelle massive est spécifique de la mitose et affecte le résidu sérine 10 de toutes les molécules d'histone H3. Elle débute en fin de phase G2 au niveau de la chromatine centromérique, puis se propage le long des bras des chromosomes jusqu'à devenir maximale en métaphase (Hendzel, M.J. *et al.* 1997). L'extrémité amino-terminale de l'histone H3 possède un autre résidu sérine en position 28 qui est également phosphorylé lors de l'entrée en mitose de la cellule (Goto, H. *et al.* 1999).

Il est intéressant de remarquer que les résidus Ser 10 et Ser 28 sont phosphorylés suivant un ordre chronologique disctinct au cours de la mitose. Ces sites sont par ailleurs déphosphorylés par la protéine phosphatase de type 1 (PP1) (Hsu, J.Y. *et al.* 2000) (Murnion, M.E. *et al.* 2001) mais avec des degrés de sensibilité différents (Goto, H. *et al.* 2002).

Très conservée chez tous les eucaryotes, la signification fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle n'est cependant pas connue. Elle semble être liée au processus de condensation des chromosomes mitotiques (Wei, Y. *et al.* 1999) (Hans, F. and Dimitrov, S. 2001) (Prigent, C. and Dimitrov, S. 2003) et de cohésion des chromosomes (Kaszas, E. and Cande, W.Z. 2000). *In vivo,* il a été montré que les kinases mitotiques Aurora et plus particulièrement la protéine Aurora-B, sont les kinases responsables de cette phosphorylation de l'histone H3 au niveau du résidu Ser 10 (Hsu, J.Y. *et al.* 2000) (Crosio, C. *et al.* 2002) et du résidu Ser 28 (Goto, H. *et al.* 2002).

ii La phosphorylation de CENP-A en sérine 7

Chez l'homme, le résidu Ser 7 de la protéine CENP-A est phosphorylé en tout début de prophase et déphosphorylé en anaphase de façon similaire à H3 (Zeitlin, S.G. *et al.* 2001).

Le rôle fonctionnel de la phosphorylation de CENP-A en Ser 7 reste encore à définir mais cette modification pourrait intervenir dans le processus de ségrégation des chromosomes mitotiques et dans le déroulement de la cytocinèse. La kinase Aurora-B est la kinase mitotique impliquée dans cette phosphorylation (Zeitlin, S.G. *et al.* 2001).

III . Assemblage et stabilisation du fuseau mitotique

Au cours de la mitose, le fuseau mitotique s'assemble à partir du cytosquelette interphasique. Son rôle est d'assurer la transmission du patrimoine génétique dans les deux cellules filles.

A. Les microtubules : constituants du fuseau mitotique

Les microtubules sont constitués de deux familles de tubulines : les tubulines α et les tubulines β, qui forment des hétérodimères d'α/β-tubuline. Ils possèdent des propriétés intrinsèques d'auto-organisation exceptionnelles puisque au-dessus d'une concentration critique, et en présence de GTP, les hétérodimères d'α/β-tubuline peuvent à eux seuls former *in vitro* une structure hautement organisée : le microtubule (Desai, A. and Mitchison, T.J. 1997).

Un microtubule est un cylindre creux dont la paroi est composée de 13 protofilaments. Chaque protofilament est lui-même constitué de polymères d'α/β-tubuline (Figure 9).

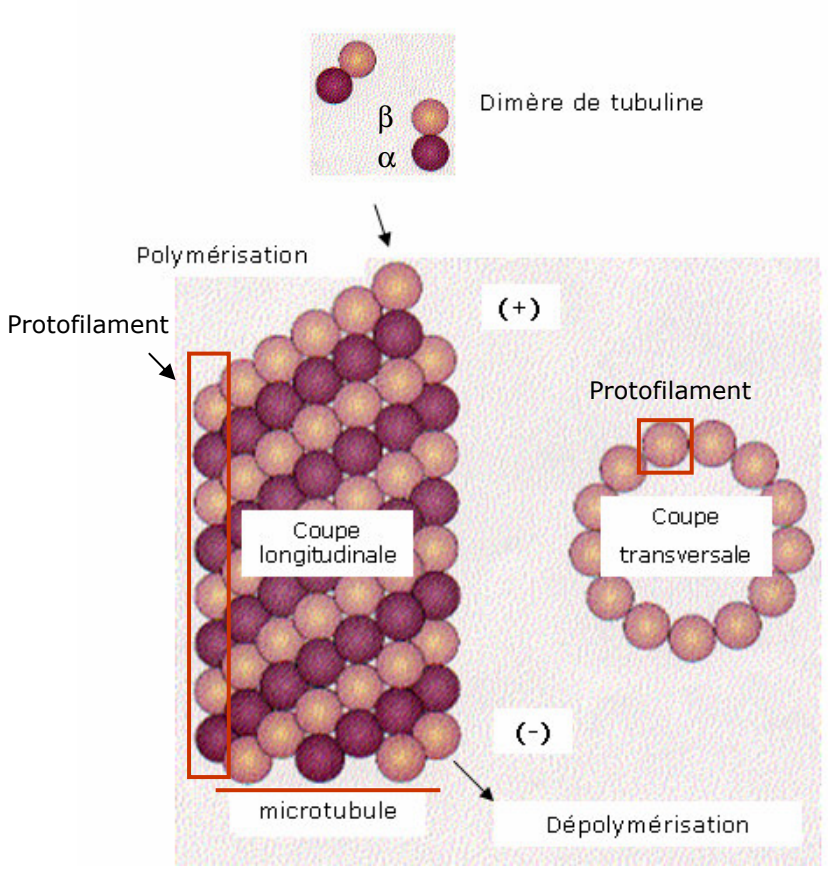


Figure 9 : Structure et dynamique du microtubule.

L'assemblage d'hétérodimères de tubuline (α et β) forme des protofilaments qui s'assemblent au nombre de 13 pour former le microtubule, cylindre creux de 24 nm de diamètre. L'auto-assemblage des microtubules implique l'hydrolyse de GTP. L'α-tubuline fixe le GTP mais ne l'hydrolyse pas, contrairement à la β-tubuline, ce qui crée une polarité du microtubule : la polymérisation se fait sur l'extrémité (+), la dépolymérisation sur l'extrémité (-). Modifié d'après http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/M/Microtubule.gif

Un microtubule possède des propriétés physico-chimiques très particulières. L'asymétrie générée par l'association toujours identique de l'hétérodimère α/β-tubuline dans la structure, crée une polarité dans le microtubule. La polymérisation est favorisée à l'extrémité (+) sur le dimère αGTP/β-GTP hydrolysable. La dépolymérisation a lieu au niveau de l'extrémité (-) sur le dimère αGTP/β-GDP non hydrolysable lui. Ces polymères de tubuline étant peu stables, le réseau microtubulaire est un système très dynamique et adaptable. Aucune protéine supplémentaire n'est requise pour la formation d'un microtubule *in vitro*, bien que celle-ci soit largement facilitée par la présence de

protéines de la famille des Microtubules Associated Proteins (MAP) (Sloboda, R.D. *et al.* 1976).

B. Le centrosome : centre organisateur des microtubules

Le centrosome est un organite cellulaire qui concentre en un seul lieu tout le matériel de nucléation des microtubules d'une cellule. Ce rassemblement de l'activité nucléante permet de polariser et d'organiser le cytosquelette microtubulaire en interphase et d'assembler le fuseau mitotique au cours de la mitose (Nigg, E.A. 2002).

a.Structure et fonction du centrosome

Le centrosome est un organite de petite taille (1 µm) composé de deux centrioles orthogonaux, comme l'indique la Figure 10. Un centriole est lui même formé de 9 triplets de microtubules. On distingue un centriole mère d'un centriole fille, par le fait que le centriole mère est porteur d'appendices protéiques sur son extrémité distale. Les centrioles sont entourés d'une matrice protéique spécifique, le matériel péricentriolaire (Doxsey, S. 2001).

Il est connu depuis près d'un siècle que le centrosome organise le réseau microtubulaire (Boveri, 1901). Par la suite, les travaux de Osborn *et al.* (1976) ont mis en évidence que le centrosome est le principal centre de nucléation des microtubules dans les cellules de mammifères. Ces auteurs ont montré qu'il existe une structure, les centrioles, qui résiste à la dépolymérisation des microtubules par certaines drogues. Les microtubules sont capables de polymériser à nouveau dans toutes les directions, à partir de ces centrioles après élimination de ces drogues.

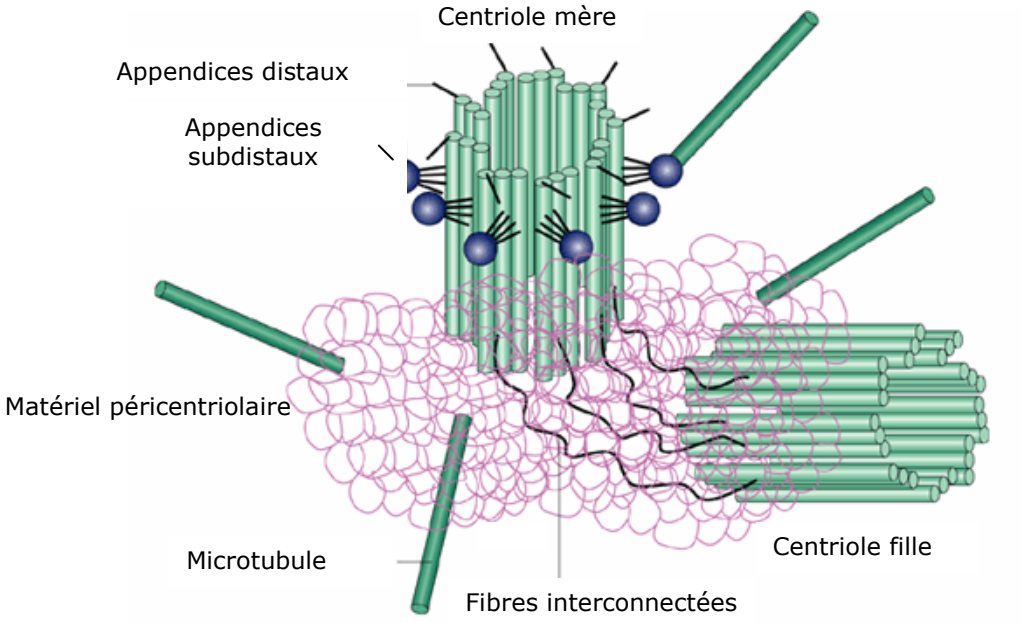


Figure 10 : Structure du centrosome.

Deux centrioles reliés entre eux par un matériel fibrillaire peu défini composent le centrosome. On distingue le centriole mère, qui possède des appendices protéiques, du centriole fille qui n'en possède pas. Les centrioles sont entourés par le matériel péricentriolaire, principal centre de nucléation des microtubules (Doxsey, S. 2001).

b.Le cycle de division du centrosome

Le cycle de division du centrosome est parallèle au cycle cellulaire (Figure 11) (Meraldi, P. and Nigg, E.A. 2002). L'activation du complexe des kinases Cdk2-cycline E en fin de phase G1 (Figure 1 et Figure 11) entraîne la duplication du centrosome qui débute par une séparation physique des deux centrioles (ou désorientation). Un procentriole se forme à proximité de chacun des centrioles pré-existants. Cette étape de duplication est synchronisée avec l'initiation de la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire. Au cours des phases S et G2, les procentrioles s'allongent et les deux centrosomes ainsi formés recrutent leur matériel péricentriolaire (phase de maturation). En début de mitose, les deux centrosomes se séparent et se localisent au niveau des deux pôles opposés de la cellule, à partir desquels sera dirigée la formation du fuseau bipolaire. Après la cytocinèse, chaque cellule fille hérite d'un seul centrosome.

Comme nous le verrons dans le prochain chapitre, les kinases mitotiques Aurora jouent des rôles majeurs dans le cycle de division du centrosome.

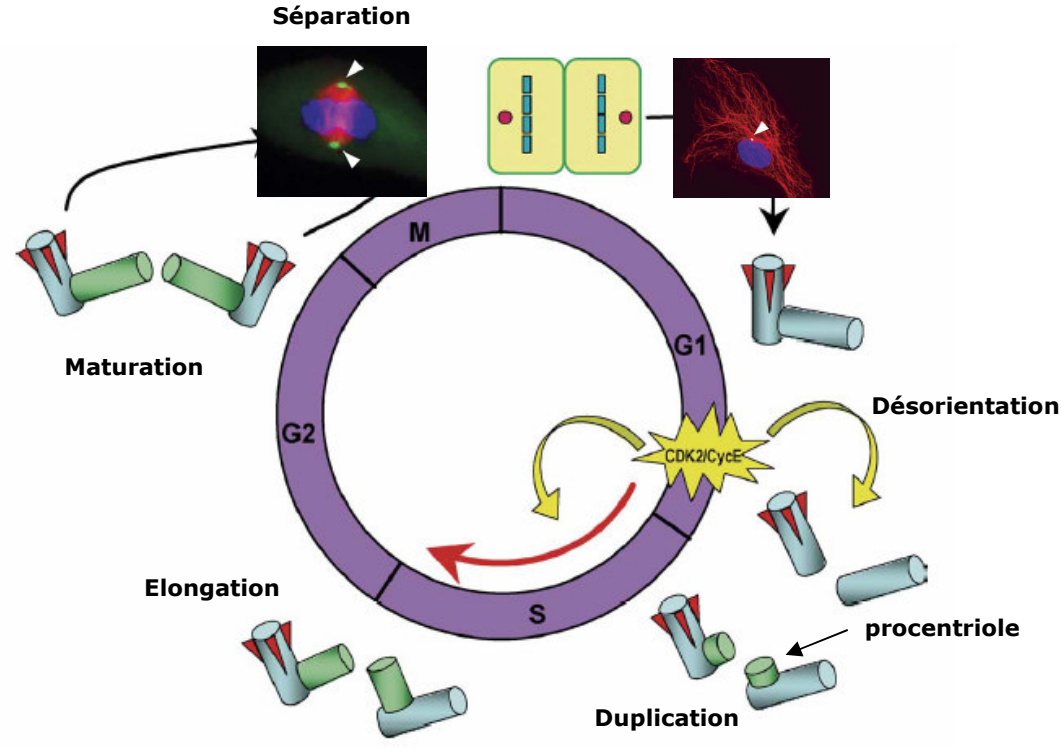


Figure 11 : Le cycle de division du centrosome

On appelle désorientation l'étape initiale qui consiste en l'éloignement des deux centrioles pour permettre leur duplication. L'élongation et la maturation du centrosome, et en particulier en terme de protéines du matériel péricentriolaire, se poursuit jusqu'en phase G2. C'est alors que commence la migration vers les pôles de la cellule en prévision de la mitose (Fukasawa, K. 2005).

C. Le fuseau mitotique

Le fuseau mitotique se forme en début de mitose par l'assemblage des microtubules à partir des centrosomes. Hormis les centrosomes, la chromatine d'une part et les protéines associées aux microtubules (MAP) et aux kinétochores (kinésines) d'autre part, sont importantes pour la stabilisation des microtubules et le maintien du fuseau mitotique.

a. Nucléation des microtubules à partir du centrosome

La fonction de nucléation des microtubules est assurée par la γ-tubuline qui est recrutée au niveau du matériel péricentriolaire du centrosome. Elle s'assemble en complexe protéique sous forme d'anneaux, les γ-Tubuline Ring

Complex (γ-TuRC), qui servent de matrice de nucléation des microtubules (Zheng, Y. *et al.* 1995). Les microtubules sont polymérisés à partir de ces structures γ-TuRC, de l'extrémité (-) rattachée au centrosome vers l'extrémité (+) (Bornens, M. 2002).

Certaines MAP sont également recrutées au niveau des centrosomes. C'est le cas des protéines TACC (Transforming Acid Coiled Coil) qui interviennent dans l'assemblage des microtubules astraux et interagissent avec l'extrémité (-) des microtubules à proximité des anneaux protéiques γ-TuRC (Raff, J.W. 2002).

b.Stabilisation du fuseau mitotique

i L'effet chromatine

La chromatine seule est capable d'induire l'assemblage de microtubules indépendemment de centres organisateurs (Khodjakov, A. *et al.* 2000) (Carazo-Salas, R.E. and Karsenti, E. 2003). Ainsi, dans des cellules dépourvues de centrosome, comme c'est le cas de cellules animales méïotiques, le fuseau mitotique peut se former correctement autour de la chromatine.

Il a été décrit chez *Xenopus laevis* que la concentration en Ran-GTP est localement très élevée autour des chromosomes mitotiques (Kalab, P. *et al.* 2002). Ce gradient de Ran-GTP est généré par la protéine Regulator for Chromosome condensation 1 (RCC1), associée à la chromatine, qui est le facteur d'échange des guanosines (GEF) de la protéine Ran (Carazo-Salas, R.E. *et al.* 1999) (Nemergut, M.E. *et al.* 2001) (Li, H.Y. *et al.* 2003). Ce gradient local de Ran-GTP induit la dissociation de complexes protéiques, composés d'Importine et de protéines effectrices du fuseau mitotique telles que Targeting Protein for XKLP2 (TPX2) (Wittmann, T. *et al.* 2000) (Figure 20). Comme nous le décrirons dans le prochain chapitre, TPX2 régule l'activité catalytique de la kinase mitotique Aurora-A.

Les microtubules kinétochoriens proches de la chromatine subissent cet « effet chromatine ». Ils sont stabilisés au voisinage des chromosomes ce qui permet et contribue à l'alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique. A l'inverse, les microtubules astraux ne subissent pas cet effet et sont constamment polymérisés et dépolymérisés (Figure 12).

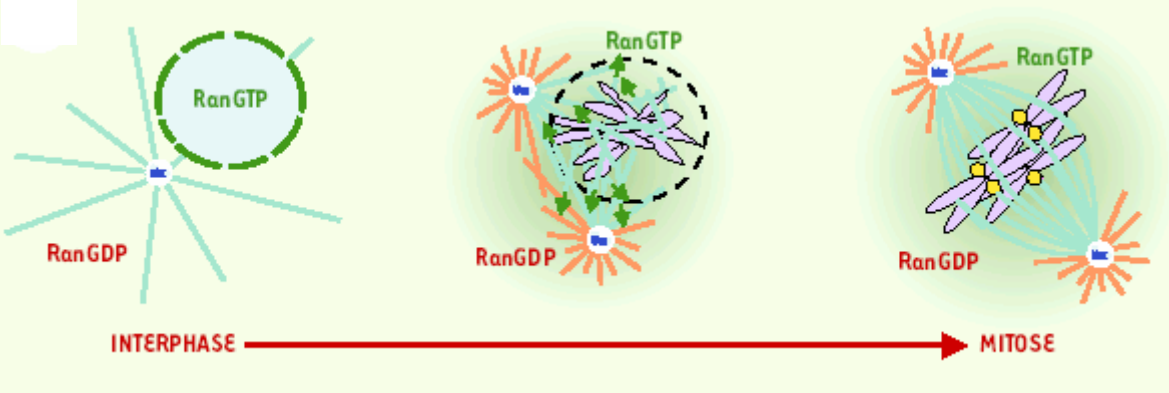


Figure 12 : « Effet chromatine » et rôle de la GTPase Ran dans l'assemblage du fuseau mitotique.

Lors de la rupture de la membrane nucléaire, une forte concentration de Ran-GTP est libérée à proximité des centrosomes et induit une augmentation de la quantité et de la longueur des microtubules polaires. La chromatine stabilise les microtubules polaires et kinétochoriens *via* RCC1 qui accentue ce gradient élevé de Ran-GTP au voisinage des chromosomes. Les microtubules stables sont en bleu, les microtubules astraux, non stabilisés par l'« effet chromatine » sont en orange (Carazo-Salas, R.E.a.S.B. 2002).

ii Les mouvements des chromosomes induits par le fuseau mitotique

La stabilisation globale des microtubules autour des chromosomes par l'« effet chromatine » jusqu'à la métaphase d'une part et la déstabilisation ponctuelle des microtubules au niveau des kinétochores par dépolymérisation à partir de l'anaphase d'autre part, sont essentielles pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes.

Certaines protéines comme les moteurs moléculaires interagissent à la fois avec les microtubules et la chromatine et sont nécessaires à la formation du fuseau mitotique et aux mouvements des chromosomes *via* le fuseau mitotique (Hirokawa, N. *et al.* 1998) (Walczak, C.E. *et al.* 1998). Eg5 et CENP-E sont des moteurs moléculaires appartenant à la famille des kinésines. Ils sont localisés au niveau des kinétochores et possèdent une activité dépolymérisante des microtubules. La protéine Mitotic Centromere Associated Kinesin (MCAK) est également une kinésine impliquée dans la dépolymérisation ponctuelle des microtubules kinétochoriens (Wordeman, L. and Mitchison, T.J. 1995).

L'inhibition de MCAK dans des cellules empêche le mouvement des chromosomes en anaphase et aboutit à des défauts de ségrégation des chromosomes (Maney, T. *et al.* 1998).

Jusqu'en métaphase, les kinésines permettent l'alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique. A partir de l'anaphase, la dépolymérisation de l'extrémité positive des microtubules au niveau du kinétochore est associée aux déplacements des kinésines (CENP-E) et de la dynéine sur les microtubules (Cleveland, D.W. *et al.* 2003) (Figure 13). Comme nous le verrons par la suite, certains de ces moteurs moléculaires sont phosphorylés par les kinases mitotiques Aurora.

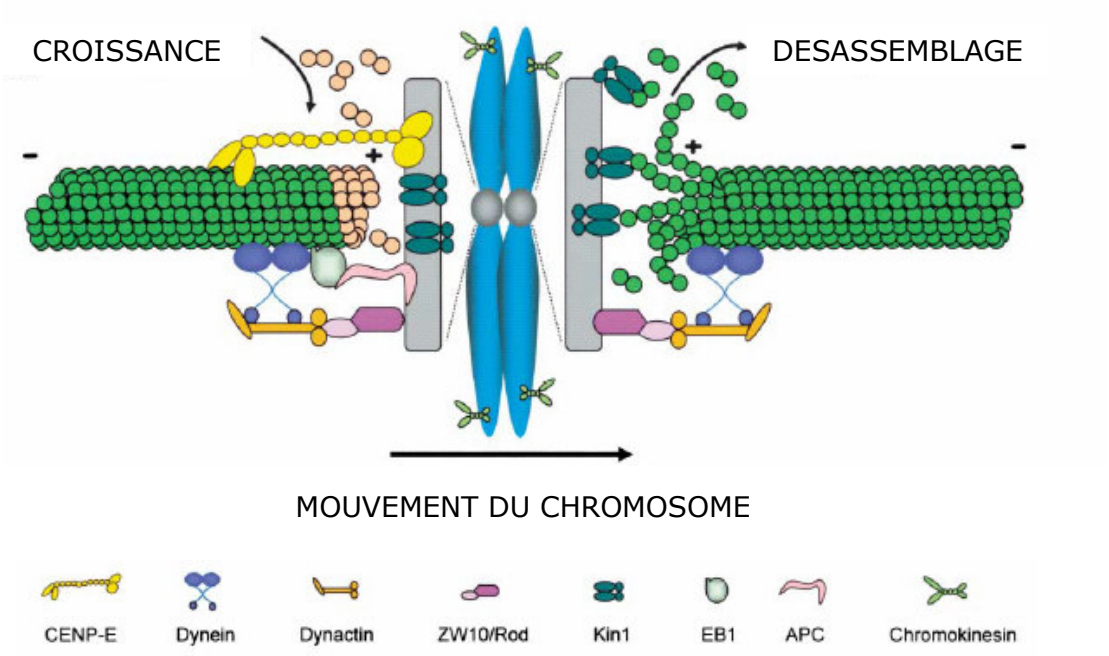


Figure 13 : Mouvement du chromosome au cours de la mitose

Différents moteurs moléculaires (la dynéine, les kinésines CENP-E ou MCAK) et de nombreux autres partenaires protéiques participent aux mouvements des chromosomes au cours de la mitose et notamment lors de leur positionnement correct sur la plaque métaphasique et de l'anaphase. L'association de cette machinerie protéique au niveau des kinétochores avec la dynamique de polymérisation / dépolymérisation de l'extrémité des microtubules permet le déplacement du chromosome (Cleveland, D.W. *et al.* 2003).

Au vu des données présentées dans ce premier chapitre, il est clair que les kinases mitotiques Aurora sont impliquées à différents stades de la régulation et du contrôle du cycle cellulaire. Ce sont des acteurs cruciaux de la séparation et

de la maturation des centrosomes, de la condensation et de la ségrégation des chromosomes, ainsi que de l'achèvement correct de la cytocinèse.

Une partie de mon travail de thèse ayant porté sur la kinase Aurora-A humaine, le second chapitre de cette introduction présentera les kinases Aurora d'une manière générale. Je détaillerai ensuite les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la protéine Aurora-A, afin de mieux comprendre ses rôles au cours du cycle cellulaire.

Chapitre 2 :Les kinases mitotiques de la famille Aurora

I . Description générale des sérine/thréonine kinases Aurora

A. Les kinases Aurora au cours de l'évolution.

Les premiers membres de la famille des kinases Aurora découverts sont la protéine Increase In Polyploïdie 1 (Ipl1) chez *Saccharomyces cerevisiae* et la protéine Aurora chez *Drosophila melanogaster*. Ipl1 a été identifiée au cours d'une recherche de mutants entraînant des défauts sévères de ségrégation des chromosomes mitotiques (Chan, C.S. and Botstein, D. 1993). Aurora a été nommée ainsi d'après le phénotype de mutants chez la drosophile (Glover, D.M. *et al.* 1995). En effet, en métaphase et en anaphase les chromosomes présentent un arrangement circulaire autour d'un fuseau mitotique monopolaire, rappelant la forme d'une aurore boréale (Figure 14).

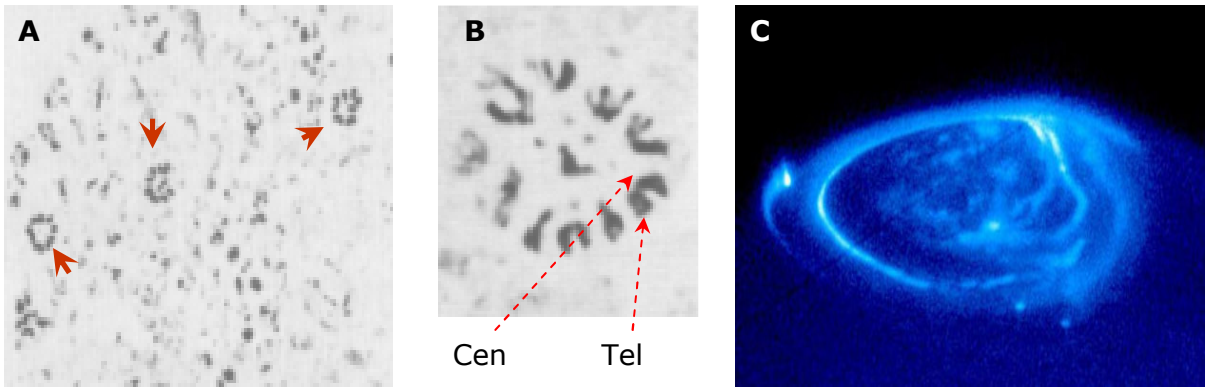


Figure 14 : Phénotype de mutants aurora chez D. melanogaster à l'origine de la dénomination des protéines Aurora

(**A**) Certaines cellules de larves de drosophile mutées sur le gène *aurora* présentent des figures circulaires mitotiques (CMF) signalées par une flèche rouge. (**B**) Dans ces structures, les chromosomes s'organisent circulairement autour d'un fuseau monopolaire, les centromères (Cen) s'orientant vers l'intérieur et les télomères (Tel) pointant vers l'extérieur du cercle (Glover, D.M. *et al.* 1995). (**C**) Ce phénotype rappelle les aurores polaires comme celle de la planète Jupiter.

Chez la levure, il n'a été identifié qu'un seul membre de cette famille de kinases. On en dénombre cependant deux chez *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster et Xenopus laevis*, et trois chez les eucaryotes plus évolués. Historiquement, de multiples appellations prêtant à confusion ont été attribuées à chacune de ces kinases lors de leurs découvertes. Bischoff et Plowman en 1999 puis Nigg en 2001 ont donc proposé une nomenclature unifiée. Ainsi, les kinases sont classées selon leurs degrés d'homologie de séquence et de leur profil de localisation cellulaire en trois groupes : Aurora-A, -B et -C (Tableau 2). Nous adopterons par la suite cette nomenclature.

Espèce	Aurora	Appellation	Référence
S. cerevisiae		Ipl1	Chan and Botstein, 1993
S. pombe		Ark1	Petersen *et al*., 2001
C. elegans	**Aurora-A**	Air1	Schumacher *et al*., 1998a
	Aurora-B	Air2	Schumacher *et al*., 1998b
D. melanogaster	**Aurora-A**	Aurora	Glover *et al*., 1995
	Aurora-B	Ia1	Reich *et al*., 1999
X. laevis	**Aurora-A**	pEg2	Roghi *et al*., 1998
	Aurora-B	Airk2	Adams *et al*., 2000
H. sapiens	**Aurora-A**	Aik	Kimura *et al*., 1997a
		Stk6	Kimura *et al*., 1997b
		Aurora2	Bischoff *et al*., 1998
		Ark1	Shindo *et al*., 1998
	Aurora-B	Aik2	Prigent *et al*., 1999
		Stk12/Aik2	Kimura *et al*., 1998
		Aim1	Katayama *et al.,* 1998
		Aurora1	Bischoff *et a*l., 1998
		Ark2	Shindo *et al.,* 1998
	Aurora-C	Aie2	Tseng *et al*., 1998
		Stk13	Bernard *et al*., 1998
		Aik3	Kimura *et al*., 1999

Tableau 2 : Nomenclature des kinases Aurora (Nigg, E.A. 2001).

B. Structure des kinases mitotiques Aurora.

a.Structure primaire.

Toutes les kinases Aurora montrent une organisation structurale très proche. Leur séquence primaire se subdivise en trois domaines principaux : un domaine catalytique central (bleu) encadré d'une extrémité amino- (brun) et carboxy-terminale (vert) (Figure 15A).

Le domaine catalytique central des kinases Aurora est composé de 250 acides aminés environ et est très conservé, avec un pourcentage d'identité allant de 67 à 76 % entre les protéines (Figure 15B). En revanche, les extrémités amino et carboxy-terminales des kinases Aurora sont très divergentes. Elles varient en séquence et en longueur selon le membre de la famille Aurora (Adams, R.R. *et al.* 2001).

Dans le domaine catalytique se situe une région d'activation de l'activité catalytique (A-loop), signature caractéristique des kinases Aurora. Il existe également deux boîtes de dégradation des protéines par le protéasome : la D-box dans le domaine kinase et la KEN-box dans la partie amino-terminale.

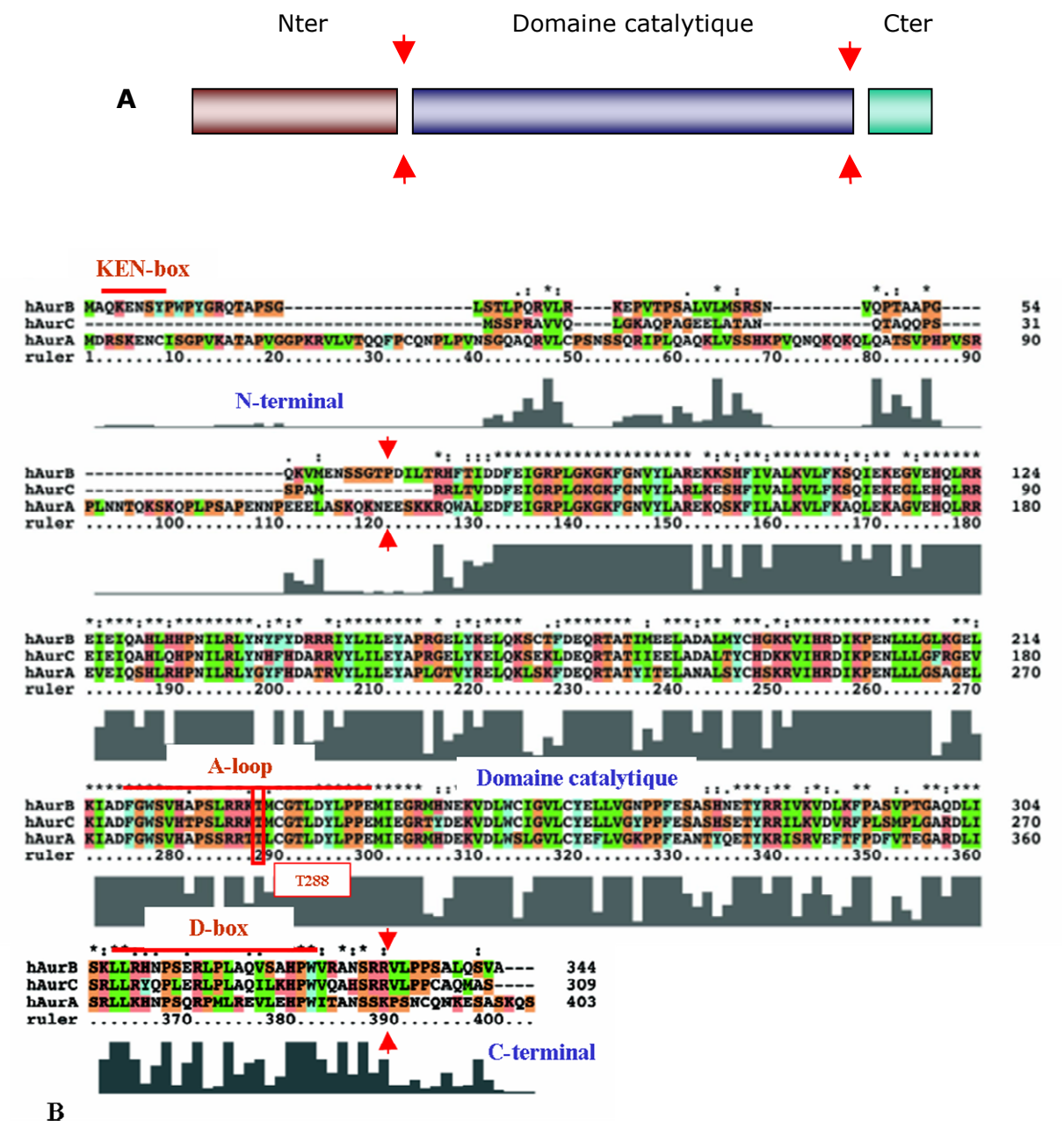


Figure 15 : Structure primaire des kinases Aurora.

Toutes les kinases mitotiques de la famille des Aurora possèdent un domaine catalytique central (en bleu) extrêmement conservé au cours de l'évolution et des extrémités amino- (en brun) et carboxy-terminales (en vert) très divergentes. (**B**) Chez l'homme, l'alignement des séquences des trois kinases Aurora-A, -B et -C fait apparaître ces domaines. La région d'activation (A-loop) et les boîtes de dégradation (D-box et KEN-Box) sont indiqués en rouge. Le résidu Thréonine 288 (T288) correspond au site d'auto-phosphorylation de Aurora-A. Les acides aminés de même couleur appartiennent à une même famille de résidus.

b.Structure tri-dimensionnelle.

Des travaux récents de cristallographie ont permis de résoudre la structure du domaine catalytique d'Aurora-A dans sa conformation active lié à l'ATP, à une résolution de 1.9 Å (Nowakowski, J. *et al.* 2002) (Figure 16A). Très dernièrement, la structure du domaine catalytique de Aurora-B (Figure 16B) a été caractérisée sous sa forme complexée avec le domaine IN-BOX de la protéine INCENP (Inner Centromere protein), un de ses partenaires cellulaires (Sessa, F. *et al.* 2005).

Ces travaux ont permis de montrer que les domaines catalytiques des protéines Aurora présentent un arrangement bilobaire typique : le lobe N-terminal est constitué essentiellement de feuillets β, le lobe C-terminal étant lui composé par la succession d'hélices α. Une « charnière » très courte constituée de deux feuillets β relie ces deux lobes et permet leurs mouvements l'un par rapport à l'autre (Figure 16A).

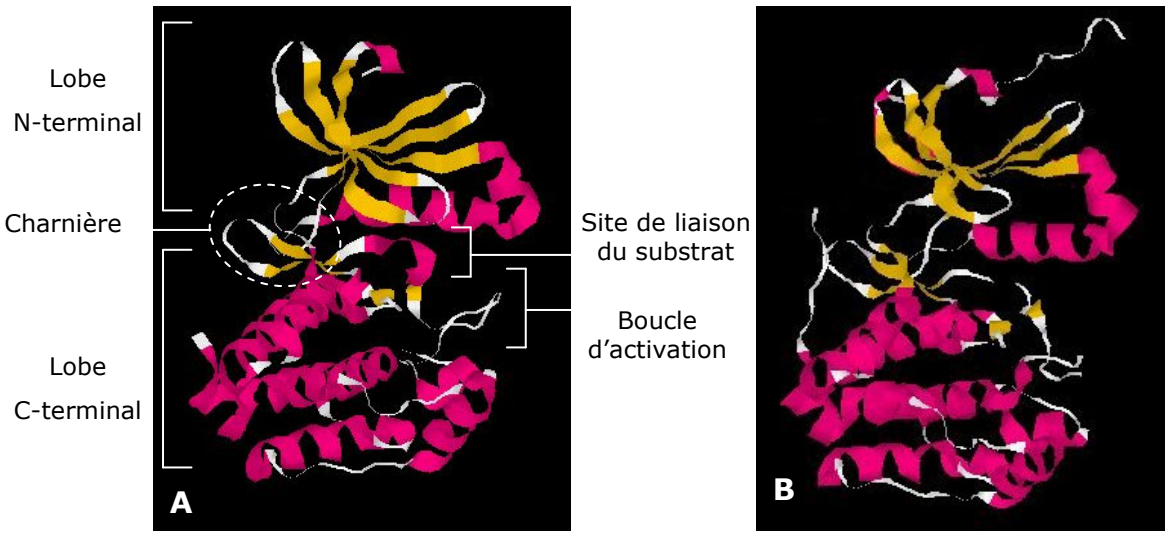


Figure 16 : Structure tri-dimensionnelle du domaine catalytique des kinases Aurora-A (A) et Aurora-B (B).

Les hélices α sont en rose et les feuillets β en jaune. Modélisation par le programme Rasmol d'après PDB ID : 1MQ4 pour Aurora-A (Nowakowski, J. *et al.* 2002) et 2BFX pour Aurora-B (Sessa, F. *et al.* 2005).

L'ensemble de ces données montre que les kinases Aurora-A et Aurora-B possèdent des domaines catalytiques extrêmement proches d'un point de vue structural. A ce jour, il n'a pas été obtenu de structure pour les extrémités amino- et carobxy-terminales des protéines Aurora.

C. Profil d'expression et de localisation des kinases Aurora.

De nombreux travaux ont mis en évidence une régulation de l'expression des Aurora dépendante du cycle cellulaire. Les protéines kinases Aurora sont exprimées essentiellement en phase G2 et en mitose (Kimura, M. *et al.* 1998) (Figure 1). Toutefois, le profil de localisation de la kinase Aurora-A est très différent de celui des kinases Aurora-B et Aurora-C, alors que, comme nous venons de le voir, ces protéines présentent des structures très homologues.

a.Aurora-A : une protéine centrosomique.

Chez les organismes supérieurs, Aurora-A se localise sur les centrosomes, dupliqués en fin de phase S, et jusqu'au début de la phase G1 du cycle cellulaire suivant (Carmena, M. and Earnshaw, W.C. 2003). Au cours de la mitose, la protéine s'associe également au fuseau mitotique (Figure 17) (Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. 1999) (Giet, R. and Prigent, C. 1999). Les travaux de Giet et Prigent (2001) ont montré que l'extrémité amino-terminale de Aurora-A renferme le domaine responsable de la localisation de la protéine au niveau des centrosomes.

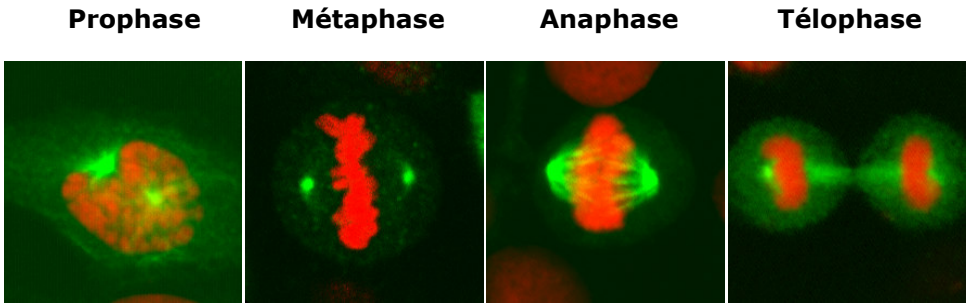


Figure 17 : Profil de localisation cellulaire de la protéine kinase Aurora-A humaine au cours de la mitose.

La kinase Aurora-A humaine, possédant un tag HA en N-terminal (construction pcDNA-HA-AurA), est surexprimée dans des cellules HeLa et immunodétectée par un anticorps anti-HA en vert. Les chromosomes sont marqués à l'iodure de propidium en rouge. Aurora-A se localise sur les centrosomes tout au long de la mitose et apparaît sur le fuseau mitotique en anaphase et jusqu'en fin de cytocinèse (*photos de Dimitrios Skoufias, Institut de Biologie Structurale, Grenoble*).

b.Aurora-B : une protéine passagère.

La kinase Aurora-B présente quant à elle un profil de localisation typique des protéines dites passagères, différent de celui de la kinase Aurora-A. Aurora-B est présente au niveau des centromères de la prophase à la métaphase (Figure 18). Elle quitte les chromosomes pour migrer vers le sillon de division en anaphase et se concentre au niveau du corps résiduel entre les deux futures cellules filles en fin de cytocinèse (Carmena, M. and Earnshaw, W.C. 2003). La famille des protéines passagères ainsi que leurs fonctions mitotiques seront décrites plus en détail dans le troisième chapitre de cette introduction.

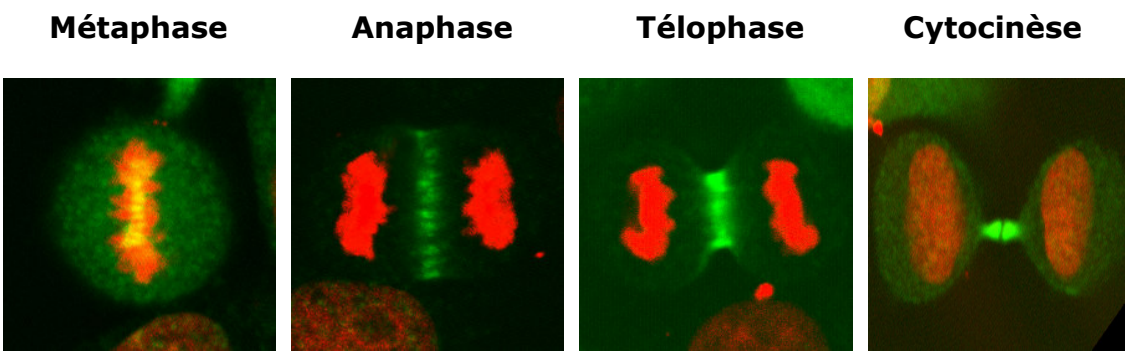


Figure 18 : Profil de localisation cellulaire de la protéine kinase Aurora-B humaine au cours de la mitose.

La kinase Aurora-B humaine, possédant un tag HA en N-terminal (construction pCDNA-HA-AurB), est surexprimée dans des cellules HeLa et immunodétectée par un anticorps anti-HA en vert. Les chromosomes sont marqués à l'iodure de propidium en rouge. Aurora-B se localise sur les centromères jusqu'en métaphase, puis migre vers le sillon de division en anaphase. En fin de cytocinèse, elle persiste sur le corps résiduel (*photos de Dimitrios Skoufias, Institut de Biologie Structurale, Grenoble*).

c.Aurora-C

Ce profil de localisation très spécifique des protéines passagères (relocalisation des chromosomes vers les microtubules polaires au cours de la mitose) est également décrit pour la troisième kinase Aurora-C (Sasai, K. *et al.* 2004) (Chen, H.L. *et al.* 2005). Son expression restant cependant majoritairement testiculaire (Kimura, M. *et al.* 1999), les fonctions de Aurora-C ne seront pas discutées dans ce manuscrit.

II . Aurora-A : une kinase mitotique centrosomique.

La kinase mitotique Aurora-A assure différents rôles tout au long du cycle cellulaire en s'associant à de nombreux partenaires dont la majorité sont également ses substrats de phosphorylation (Tableau 3) (Katayama, H. *et al.* 2003). Les principales fonctions mitotiques de Aurora-A sont décrites dans ce chapitre.

Partenaires / Substrats	Localisation cellulaire	Fonction
CENP-A	Chromosomes, centromères	Alignement des chromosomes
Eg5	Fuseau mitotique	Maturation des centrosomes
D-TACC	Centrosomes	Dynamique des microtubules
TPX2	Noyau et fuseau mitotique	Formation du fuseau Recrutement sur microtubules
AJUBA	Centrosomes	Engagement en mitose
AIP	Noyau	Dégradation
p53	Noyau	Suppression du pouvoir oncogènique
PP1	Noyau	Régulation de l'activité catalytique

Tableau 3 : Principaux partenaires (en rouge) et substrats (soulignés) de la kinase mitotique Aurora-A (Katayama, H. *et al.* 2003).

A. Fonctions mitotiques de Aurora-A

a.Aurora-A, le centrosome et le fuseau mitotique

La plupart des travaux menés chez divers organismes ont montré que la perturbation de la fonction de Aurora-A entraîne des anomalies centrosomales (Dutertre, S. *et al.* 2002). Aurora-A intervient dans les étapes de maturation et de séparation du centrosome et est considérée comme un « gardien des pôles de la cellule » (Marumoto, T. *et al.* 2005).

Lorsque la kinase Aurora-A est éliminée par des expériences d'ARN interférence, la morphologie des centrosomes est affectée (Schumacher, J.M. *et al.* 1998). Aurora-A permet le recrutement de la γ-tubuline et de composants du matériel péricentriolaire indispensables à l'organisation des sites de nucléation

des microtubules chez *C. elegans* (Hannak, E. *et al.* 2001). Des travaux ont montré que la protéine TACC, une protéine associée aux microtubules, est un substrat de Aurora-A. La surexpression d'un mutant catalytiquement inactif de Aurora-A ne permet pas le recrutement de TACC sur les centrosomes et aboutit à une diminution du nombre et de la longueur des microtubules astraux (Giet, R. *et al.* 2002). Ces données suggèrent que Aurora-A est impliquée dans la maturation des centrosomes (Terada, Y. *et al.* 2003).

L'expression de mutants de Aurora-A chez *D. melanogaster* (Glover, D.M. *et al.* 1995) et l'inhibition de son activité catalytique dans des extraits d'œufs de xénope (Roghi, C. *et al.* 1998) entraînent la formation d'un fuseau monopolaire, émanant d'une paire de centrosomes non séparés. L'identification de la kinésine Eg5 de *Xenopus laevis* comme substrat de Aurora-A (Giet, R. *et al.* 1999), suggère l'implication de la kinase dans l'étape de séparation des centrosomes.

La formation du fuseau mitotique bipolaire nécessite par ailleurs le recrutement de Aurora-A sur les microtubules polaires. Des travaux menés chez *Xenopus laevis* ont montré que la protéine TPX2, une MAP capable de lier les moteurs moléculaires, interagit directement avec Aurora-A et la transporte vers les pôles du fuseau mitotique (Kufer, T.A. *et al.* 2002) (Brunet, S. *et al.* 2004). La déplétion de Aurora-A comme celle de TPX2 dans des extraits d'œufs de xénope perturbe la stabilité du fuseau mitotique et aboutit à la formation de fuseaux multipolaires (Roghi, C. *et al.* 1998) (Giet, R. and Prigent, C. 2000). Ces données montrent que l'interaction Aurora-A/TPX2 est indispensable à la formation du fuseau mitotique.

Les rôles précis de Aurora-A dans le cycle de division du centrosome et dans la formation du fuseau mitotique restent difficiles à discerner. En effet, une mauvaise maturation ou séparation des centrosomes en début de mitose conduit nécessairement à la formation d'un fuseau mono- ou multi-polaire. Inversement, un fuseau non bi-polaire provient d'une anomalie au niveau du cycle du centrosome.

b.Rôles de Aurora-A au cours de la mitose.

Outre le fait que la kinase Aurora-A soit l'un des principaux acteurs du cycle centrosomal, des études récentes ont permis d'attribuer à Aurora-A d'autres fonctions tout au long de la mitose (Marumoto, T. *et al.* 2003).

La déplétion de Aurora-A par des expériences d'ARN interférence dans des cellules humaines HeLa synchronisées, perturbe la transition G2 / Mitose (Hirota, T. *et al.* 2003). La kinase Aurora-A est recrutée sur les centrosomes en début de phase S. Elle interagit avec AJUBA, une petite protéine à domaine LIM (Goyal, R.K. *et al.* 1999). Cette interaction active Aurora-A de façon concomitante à l'activation du Maturation Promoting Factor (MPF) et permet ainsi l'entrée en mitose de la cellule (Ma, C. *et al.* 2003).

Par ailleurs, l'élimination de Aurora-A par injection d'anticorps anti-Aurora-A dans des cellules en prométaphase aboutit à des chromosomes qui ne s'alignent pas correctement sur la plaque métaphasique (Marumoto, T. *et al.* 2003).

Enfin, des cellules qui surexpriment Aurora-A peuvent entrer en anaphase malgré la formation d'un fuseau mitotique défectueux, entraînant une mauvaise ségrégation des chromosomes à la transition métaphase/anaphase et conduisant à la formation de cellules multinuclées (Anand, S. *et al.* 2003). Ces anomalies de cytocinèse provoquées par le taux anormalement élevé de Aurora-A sont une conséquence du contournement du point de contrôle du fuseau mitotique, ce qui suggère un lien entre la kinase Aurora-A et le point de contrôle du fuseau mitotique (Marumoto, T. *et al.* 2003).

B. Pouvoir oncogènique de la kinase Aurora-A

A l'origine, la protéine Aurora-A a été nommée BTAK pour « breast tumor activated kinase », car le gène codant pour cette kinase est fortement amplifié dans les cellules tumorales du sein. Or, le gène *aurora-A* est situé sur l'amplicon 20q13, une région fréquemment impliquée dans les tumeurs malignes associées aux cancers colorectaux, du sein et de la vessie (Sen, S. *et al.* 1997). Il a ensuite été observé que 52 % des carcinomes colorectaux primaires (Bischoff, J.R. *et al.*

1998) et 12 à 18 % des cancers primaires du poumon et du sein (Zhou, H. *et al.* 1998), montrent également une amplification du gène codant pour Aurora-A (Nigg, E.A. 2002).

A ce jour, Aurora-A est le seul membre de la famille des Aurora kinases caractérisé comme oncogène (Dutertre, S. *et al.* 2002). La surexpression de Aurora-A dans des lignées fibroblastiques de rat Rat1 ou des cellules murines NIH3T3 conduit à la formation de tumeurs lorsque ces cellules sont transplantées dans des souris immunodéficientes *nude* (Bischoff, J.R. *et al.* 1998). Les fonctions d'Aurora-A nécessaires pour la transformation de ces cellules sont mal caractérisées. Il est démontré que dans la majorité des cellules cancéreuses, un nombre anormalement élevé de centrosomes est observé. Or la protéine suppresseur de tumeur p53 est impliquée elle aussi dans le cycle de division des centrosomes (Fukasawa, K. *et al.* 1996). De manière intéressante, Aurora-A est capable d'interagir et de phosphoryler p53 entrainant son inactivation et/ou sa dégradation (Liu, Q. *et al.* 2004) (Katayama, H. *et al.* 2004) (Chen, S.S. *et al.* 2002). Ainsi un modèle a été proposé pour tenter d'expliquer le lien entre surexpression de Aurora-A, aneuploïdie et anomalies centrosomiques, et p53 (Carmena, M. and Earnshaw, W.C. 2003). A la suite de la surexpression d'Aurora-A, les cellules pourraient poursuivre la mitose si le point de contrôle du fuseau mitotique est inactivé. Cela aboutirait à une tétraploïdie et à des centrosomes surnuméraires. Ces cellules, normalement induites en apoptose par p53, progressent en cycle de division et génèrent une descendance polyploïde en absence de p53 fonctionnelle (Meraldi, P. *et al.* 2002). Lors des mitoses suivantes, des fuseaux multipolaires apparaissent, aboutissant à une instabilité chromosomique et des aneuploïdies sévères (Giet, R. *et al.* 2005).

Un nombre anormalement élevé de centrosomes étant corrélé à une surexpression de la protéine Aurora-A dans de nombreux cancers (Zhou, H. *et al.* 1998) (Nigg, E.A. 2002), il est donc très difficile de savoir si l'amplification du nombre de centrosomes est une conséquence directe ou non de la dérégulation de l'expression de Aurora-A (Andrews, P.D. 2005).

C. Voies de régulation de l'activité enzymatique de Aurora-A

Il existe deux voies principales de régulation positive et/ou négative de l'activité catalytique de la kinase Aurora-A. Elle peut être régulée par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation de certains de ces résidus et par sa dégradation massive en sortie de mitose (Walter, A.O. *et al.* 2000).

a.Régulation par phosphorylation

i La clé de la régulation : auto-phosphorylation du résidu Thr288

La phosphorylation mitotique du résidu thréonine 288 de la kinase Aurora-A humaine, situé au sein de la boucle d'activation (Figure 15 et Figure 16), constitue l'un des évènements majeurs de son activation (Walter, A.O. *et al.* 2000), la forme phosphorylée d'Aurora-A étant plus active que sa forme déphosphorylée. Des travaux récents ont démontré qu'il s'agit d'un événement d'auto-phosphorylation, favorisé par la présence de partenaires substrats de la kinase Aurora-A (Eyers, P.A. *et al.* 2003). Il est clairement établi que l'activité catalytique de la kinase Aurora-A est régulée négativement par la protéine phosphatase de type 1. Aurora-A interagit avec PP1 (Katayama, H. *et al.* 2001), entraînant ainsi une déphosphorylation de la thréonine T288 (Walter, A.O. *et al.* 2000).

ii Autres sites de phosphorylation

Il existe par ailleurs d'autres sites de phosphorylation de la kinase Aurora-A humaine : les sérines 51 et 342 (Littlepage, L.E. *et al.* 2002). La phosphorylation du résidu Ser342 régulerait négativement l'activité de Aurora-A. En effet, la Ser342 se situe à proximité du site de liaison à la phosphatase PP1. Une fois phosphorylée, cette Ser342 pourrait affecter l'interaction des deux protéines. La phosphorylation du résidu Ser51, localisée dans la partie amino-terminale de la protéine, serait impliquée dans la régulation de la dégradation de Aurora-A. Toutefois, il n'a pas encore été établi si ces phosphorylations

secondaires résultent d'une auto-phosphorylation ou si elles sont dépendantes d'une ou plusieurs autre(s) kinase(s).

iii Aspects structuraux de la régulation positive par TPX2

Chez *X. laevis*, les travaux de Eyers et *al*. (2003 et 2004) mettent en évidence l'effet activateur de la protéine TPX2 sur la kinase pEg2. TPX2 stimule l'autophosphorylation de Aurora-A au niveau du résidu Thr 288 (Eyers, P.A. *et al.* 2003) (Eyers, P.A. and Maller, J.L. 2004) (Bayliss, R. *et al.* 2003) (Figure 19).

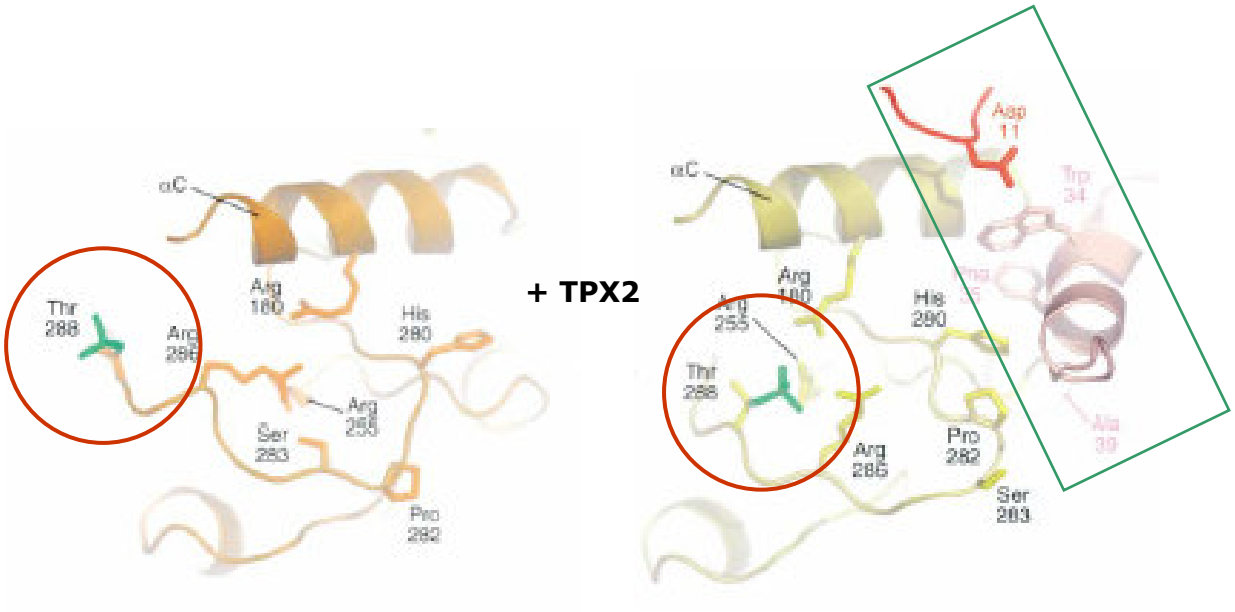


Figure 19 : Etats conformationnels de Aurora en absence et en présence de TPX2.

La fixation de TPX2 (encadré en vert) sur Aurora-A entraîne une réorganisation de la boucle d'activation. Ceci permet la rotation du résidu Thr288 (entouré en rouge) vers l'intérieur du site catalytique, à proximité de l'hélice αC du lobe N-terminal de la structure de Aurora-A (Bayliss, R. *et al.* 2003).

Lorsque Aurora-A n'interagit pas avec TPX2, le résidu Thr288 se trouve accessible à la protéine PP1 qui le déphosphoryle. L'interaction entre TPX2 et Aurora-A entraîne un mouvement de la chaîne polypeptidique de la boucle d'activation. Le résidu Thr288 se retrouve positionné à l'intérieur de la structure

de la protéine, entre les deux lobes du domaine catalytique de Aurora-A. De ce fait, il est moins accessible à PP1.

iv Modèle d'activation de la kinase Aurora-A

Un modèle de régulation de l'activité de la kinase Aurora-A, faisant intervenir l'effet chromatine, Aurora-A et l'effecteur TPX2, a été décrit très dernièrement (Tsai, M.Y. *et al.* 2003) (Bayliss, R. *et al.* 2003) (Bayliss, R. *et al.* 2003) (Giet, R. *et al.* 2005). La Figure 20 en résume les principaux aspects.

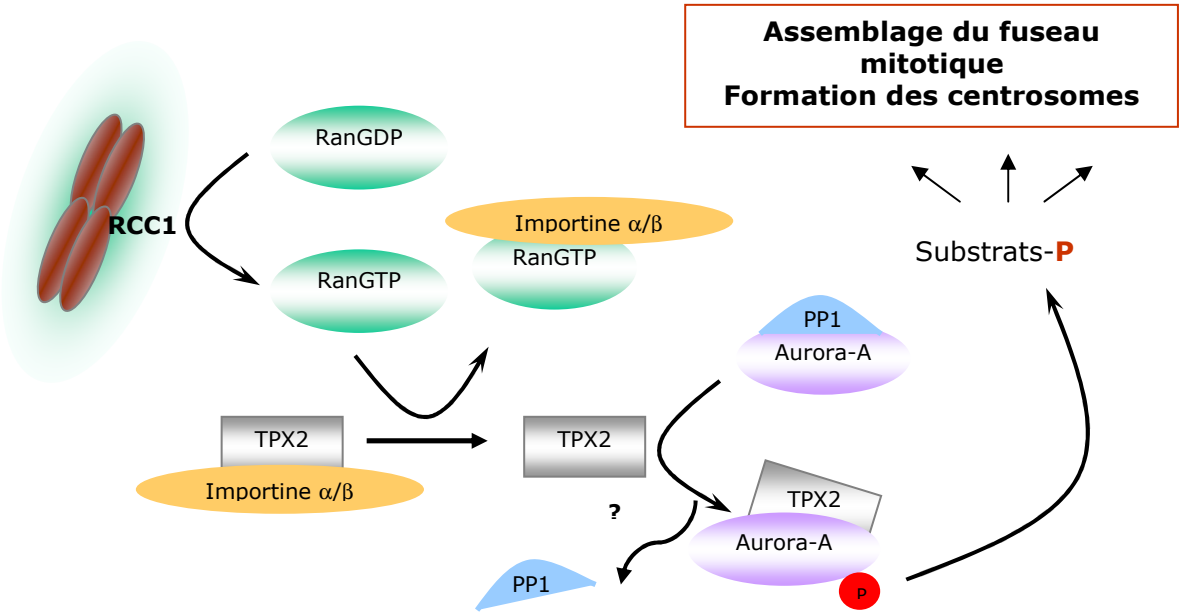


Figure 20 : Voie d'activation Ran-dépendant de la kinase Aurora-A

Le gradient de RanGTP généré au niveau des chromosomes par RCC1 permet de libérer TPX2 de son complexe avec les Importines α et β. L'interaction TPX2/Aurora-A et le recrutement de TPX2 au niveau des microtubules en formation, inhibent la phosphatase PP1. Aurora-A phosphorylée sur son résidu Thr288 est activée et phosphoryle les substrats impliqués dans la formation des centrosomes et l'organisation du fuseau bipolaire (Tsai, M.Y. *et al.* 2003) (Blagden, S.P. and Glover, D.M. 2003) (Giet, R. *et al.* 2005).

La protéine Regulator for Chromosome Condensation 1 (RCC1), qui est localisé sur les chromosomes mitotiques, génère un gradient de Ran-GTP (Li, H.Y. *et al.* 2003). La forte concentration de Ran-GTP autour des chromosomes conduit à la dissociation des complexes Importine α/β-TPX2. TPX2 libéré peut interagir avec les microtubules d'une part et Aurora-A d'autre part. L'interaction

TPX2/Aurora-A stimule l'activité catalytique de Aurora-A par auto-phosphorylation en Thr 288. Une fois activée, Aurora-A phosphoryle en retour TPX2 mais également d'autres effecteurs protéiques impliqués dans l'assemblage du fuseau mitotique, comme la kinésine Eg5 (Giet, R. *et al.* 1999), et dans la formation des centrosomes comme la protéine TACC (Giet, R. *et al.* 2002) Tableau 3.

b.Régulation négative de Aurora-A par dégradation

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'augmentation du niveau d'expression de Aurora en phase G2 et en mitose restent encore méconnus. Toutefois, la soudaine disparition de Aurora-A en fin de mitose semble régulée par l'ubiquitination de la protéine par le complexe Cdh1-APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) puis sa dégradation par le protéasome (Honda, K. *et al.* 2000) (Castro, A. *et al.* 2002). En effet, l'inhibition des protéasomes dans des cellules HeLa humaines conduit à l'accumulation de protéine Aurora-A poly-ubiquitinylée. La forme phosphorylée sur le résidu Thr288 de Aurora-A stimule sa dégradation (Walter, A.O. *et al.* 2000) (Honda, K. *et al.* 2000).

Outre le fait que Aurora-A possède la petite séquence KEN (KEN box) impliquée dans la reconnaissance de la protéine par la ligase APC/C, la dégradation de Aurora-A implique deux autres domaines particuliers : la boîte de destruction, ou D-box et la région activatrice de la D-box, ou A-box (Figure 21).

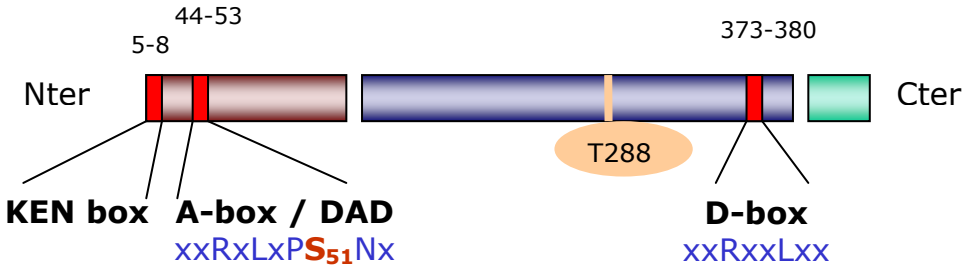


Figure 21 : Les domaines de régulation par la voie de dégradation de la kinase Aurora-A

La protéine Aurora-A possède trois domaines intervenant dans sa dégradation en fin de mitose par le complexe Cdh1-APC/C : la KEN box et la D-box, impliquées dans la reconnaissance de Aurora-A par le complexe du protéasome et la A-box (ou DAD), nécessaire à l'activation de cette reconnaissance. Le résidu Ser51 de la A-box active la dégradation de Aurora-A quand il est phosphorylé.

La D-box est présente sur de nombreux substrats d'APC/C et contient la séquence consensus RxxL reconnue par le complexe du protéasome. Elle est située en C-terminal du domaine catalytique des kinases Aurora (Castro, A. *et al.* 2002). Cette D-box est sous la dépendance, exclusivement pour la protéine Aurora-A, d'une A-box ou DAD (D-box activating domain), située elle en N-terminal de la séquence. La A-box semble confèrer sa fonctionnalité à la D-box (Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. 2002). Il est important de remarquer que la A-box contient le résidu Ser51 qui est phosphorylé pendant la mitose et intervient dans l'activation de la destruction de la kinase lorsqu'il est déphosphorylé (Littlepage, L.E. *et al.* 2002).

III . Conclusion

La protéine Aurora-A, principalement localisée sur les centrosomes, régule le cycle de division du centrosome, la formation du fuseau mitotique et remplit également d'autres fonctions mitotiques.

La protéine Aurora-B, en plus d'appartenir à la grande famille des kinases Aurora, appartient à la famille des protéines passagères, tout comme INCENP, Survivine, Boréaline et TD-60 (Adams, R.R. *et al.* 2001) (Figure 22).

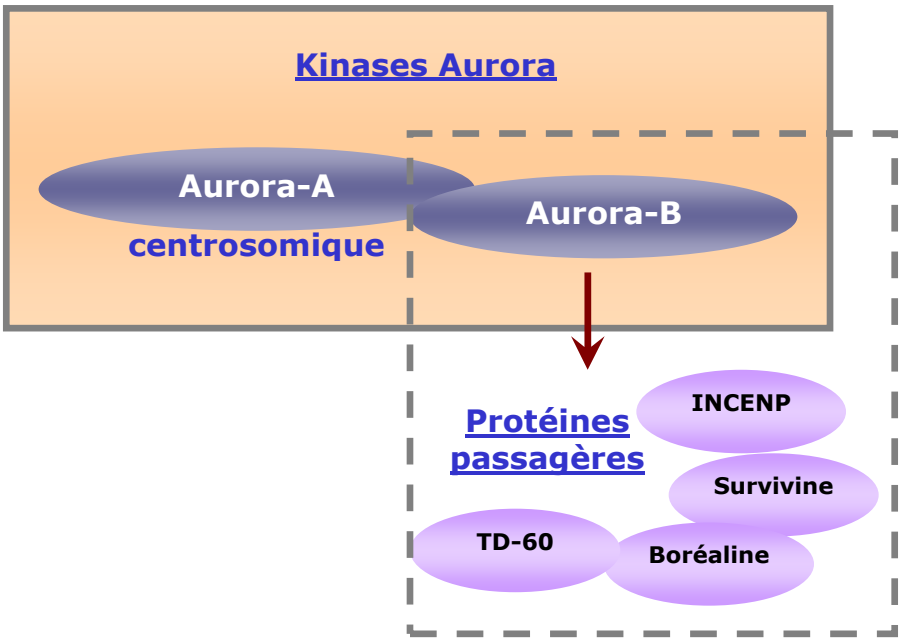


Figure 22 : La famille des kinases Aurora et des protéines passagères.

Aurora-A est une protéine centrosomique alors que Aurora-B est une protéine passagère, au même titre que INCENP, Survivine, Boréaline et TD-60.

Comme Aurora-A, les protéines passagères sont impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire. Elles interviennent dans la coordination des mouvements du fuseau mitotique et des chromosomes mitotiques (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). La deuxième partie de mon travail de thèse ayant porté sur la caractérisation de la protéine TD-60 de *Xenopus laevis*, ce troisième chapitre d'introduction présentera les différents membres de cette famille de protéines passagères (Aurora-B, INCENP, Survivine, TD-60 et Boréaline) et détaillera les fonctions qu'elles assument au cours du cycle cellulaire.

Chapitre 3 :Les protéines passagères

A l'heure actuelle, la famille des protéines passagères comprend cinq protéines : INCENP, Survivine, Aurora-B, TD-60 et Boréaline (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). Ces protéines possèdent toutes le même profil de localisation cellulaire au cours de la mitose. Elles s'accumulent au niveau des centromères en prophase et métaphase pour migrer ensuite vers le sillon de division en début d'anaphase et sur le corps résiduel en fin de cytocinèse (Figure 18).

I . Aurora-B et le complexe des protéines passagères

A. Les membres de la famille des protéines passagères

a.La protéine INCENP

Le premier membre de cette famille à avoir été décrit est la protéine INCENP (pour inner centromere protein) (Cooke, C.A. *et al.* 1987). Cette protéine de haut poids moléculaire (120 kDa) lie fortement les chromosomes mais se délocalise sur le cytosquelette à la transition métaphase/anaphase. Son rôle présumé est le recrutement et le transfert de protéines impliquées dans la mise en place du sillon de division, *via* les chromosomes mitotiques (Adams, R.R. *et al.* 2001).

La protéine INCENP présente différents domaines, chacun impliqué dans une fonction bien définie (Ainsztein, A.M. *et al.* 1998) (Figure 23). Le domaine amino-terminale (environ 400 acides aminés) confère à la protéine INCENP sa capacité à se lier aux chromosomes, au niveau de l'hétérochromatine centromérique. Plus précisément, le motif Cen permet sa localisation sur les centromères et son transfert vers le fuseau mitotique en anaphase. Le motif HP1 intervient directement dans son interaction avec la protéine centromérique HP1 (Hétérochromatine Protein 1) (Mackay, A.M. *et al.* 1993).

Une séquence très conservée d'une centaine d'acides aminés localisée dans le domaine carboxy-terminal et nommée IN-BOX, a été définie comme

étant le domaine d'interaction entre INCENP et la protéine kinase Aurora-B (Adams, R.R. *et al.* 2000) (Sessa, F. *et al.* 2005).

La séquence intermédiaire est structurée (longue hélice ou coiled-coil) et semble jouer le rôle de charnière afin de faciliter les mouvements des extrémités amino- et carboxy-terminales de la protéine INCENP. Un domaine de liaison aux microtubules a été localisé au niveau de cette région charnière (Mackay, A.M. *et al.* 1998).

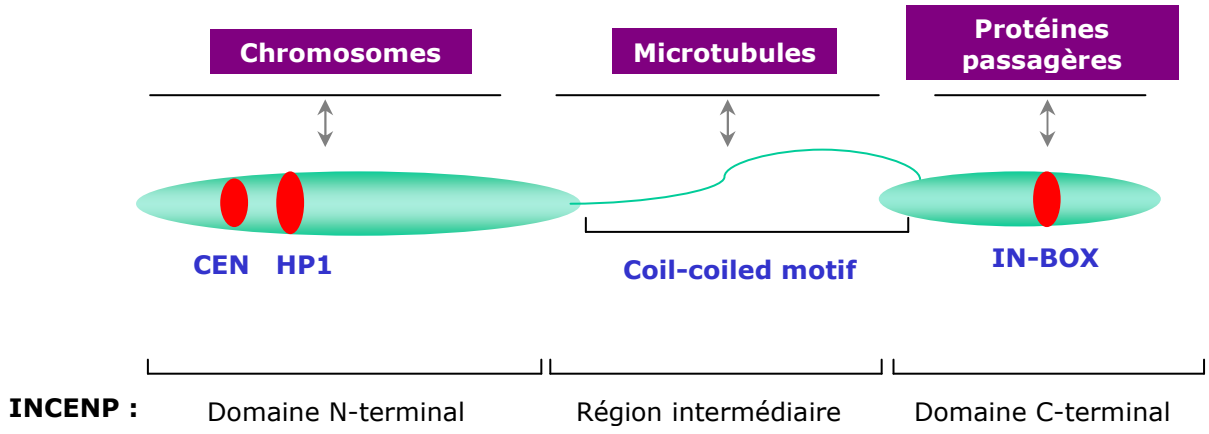


Figure 23 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine passagère INCENP.

Les régions CEN et HP1 du domaine amino-terminal de INCENP permettent sa localisation au niveau de l'hétérochromatine centromérique. Le domaine carboxy-terminal de INCENP renferme la séquence IN-BOX impliquée dans l'interaction de INCENP avec la protéine passagère Aurora-B. La région intermédiaire structurée en hélices α (coil-coiled motif) correspond au domaine de liaison aux microtubules de INCENP.

L'expression d'un mutant de délétion de la partie amino-terminale de INCENP aboutit à des défauts d'alignement et de ségrégation des chromosomes mitotiques ainsi qu'à une cytocinèse anormale (Mackay, A.M. *et al.* 1993) (Mackay, A.M. *et al.* 1998). A l'inverse, l'expression d'un mutant de la protéine INCENP qui se lie irréversiblement aux centromères n'affecte pas la dynamique des chromosomes mais perturbe l'accomplissement de la cytocinèse (Eckley, D.M. *et al.* 1997). Ces résultats démontrent que la protéine INCENP assure différentes fonctions en mitose.

b.La protéine Survivine

La protéine Survivine a été identifiée dans un premier temps comme une petite protéine de 17 kDa de la famille IAP (Inhibitors Apoptosis Protein), porteuse du motif de fixation du zinc BIR (Speliotes, E.K. *et al.* 2000). Elle est impliquée dans la régulation des processus de l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire (Li, F. *et al.* 1998) (Lens, S.M. *et al.* 2003).

La structure cristallographique de la protéine Survivine humaine a été déterminée récemment à une résolution de 2.4 Å (Chantalat, L. *et al.* 2000). Elle cristallise sous forme dimérique et présente une longue extension carboxy-terminale structurée en hélice α très atypique (Figure 24).

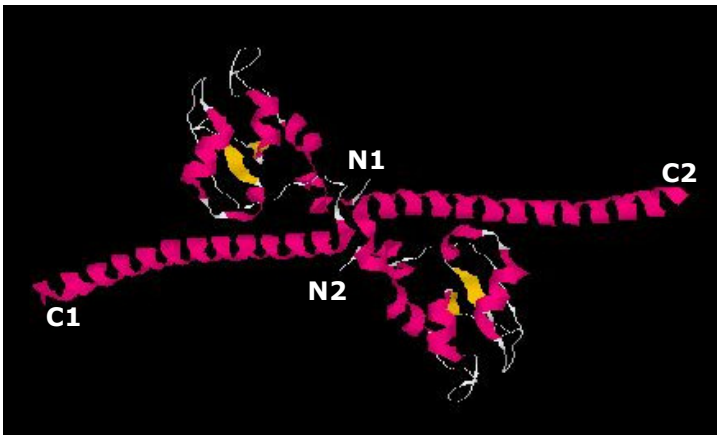


Figure 24 : Structure tri-dimensionnelle de la protéine passagère Survivine sous sa forme dimérique.

Les hélices α sont en rose et les feuillets β en jaune. Les extrémités amino- (Nx) et carboxy-terminales (Cx) sont indiquées pour chaque monomère. Modélisation par le programme Rasmol d'après PDB ID : 1E31 (Chantalat, L. *et al.* 2000).

c.La protéine Boréaline

Décrite et caractérisée par deux équipes de chercheurs, la protéine Boréaline (Gassmann, R. *et al.* 2004) (Sampath, S.C. *et al.* 2004) est une protéine de 31 kDa très conservée chez les vertébrés. Des défauts d'attachements des microtubules aux kinétochores et des cytocinèses anormales sont observés dans des cellules dont la Boréaline est éliminée par ARN

interférence. Chez le xénope, la Boréaline semble intervenir dans l'assemblage des pôles du fuseau mitotique dans des cellules dépourvues de centrosomes (Sampath, S.C. *et al.* 2004).

d.La kinase mitotique Aurora-B

La kinase Aurora-B est la seule protéine passagère à activité catalytique (Adams, R.R. *et al.* 2001). Aurora-B est responsable de la phosphorylation massive de l'histone H3 sur le résidu Ser10 (Giet, R. and Glover, D.M. 2001) (Hsu, J.Y. *et al.* 2000). Elle phosphoryle également les résidus Ser28 de H3 et Ser7 de CENP-A (Pascreau, G. *et al.* 2003). Ces modifications post-traductionnelles des histones sont étroitement associées à la condensation des chromosomes au cours de la mitose (Goto, H. *et al.* 2002) (Zeitlin, S.G. *et al.* 2001). Aurora-B phosphoryle également des protéines aussi diverses que la kinésine MCAK (Andrews, P.D. *et al.* 2004) (Lan, W. *et al.* 2004), la Vimentine (Goto, H. *et al.* 2003) et la protéine MgcRacGAP (Male Germ Cell Rac GTPase Activating Protein) (Minoshima, Y. *et al.* 2003) (Hirose, K. *et al.* 2001) (Tableau 4).

Histones		Protéines passagères	Autres protéines
H3	Ser 10	INCENP	MCAK
	Ser 28	Survivine	Vimentine
CENPA	Ser 7		MgcRacGAP

Tableau 4 : Principaux substrats de la kinase mitotique Aurora-B

B. Le complexe des protéines passagères

Une série de données suggère l'existence d'un complexe de protéines passagères. D'une part, des travaux de biologie cellulaire démontrent que *in vivo* la déplétion d'un membre de la famille des protéines passagères entraîne une perte totale de localisation correcte des autres protéines passagères (Kim, J.H. *et*

al. 1999) (Kaitna, S. *et al.* 2000) (Speliotes, E.K. *et al.* 2000) (Uren, A.G. *et al.* 2000).

D'autre part, des travaux biochimiques ont permis de caractériser un complexe formé par les protéines Aurora-B, INCENP et Survivine (Figure 25). Chez *X. laevis*, l'interaction directe entre Aurora-B et INCENP a été caractérisée (Bolton, M.A. *et al.* 2002) (Adams, R.R. *et al.* 2000). Il a été décrit récemment que l'interaction de Aurora-B avec INCENP stimule l'auto-phosphorylation de Aurora-B en position Thréonine 232 (Yasui, Y. *et al.* 2004), résidu qui correspond à la Thréonine 288 de la boucle d'activation de Aurora-A. L'activation de Aurora-B entraîne en retour la phosphorylation de INCENP sur le motif $T_{893}S_{894}S_{895}$ appartenant à la IN-BOX (Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. 2002) (Honda, R. *et al.* 2003). Une partie du « pool » total de la protéine Survivine appartient également au complexe Aurora-B / INCENP (Wheatley, S.P. *et al.* 2001). Elle active Aurora-B qui en retour phosphoryle la Survivine au niveau du résidu Thr117 (Wheatley, S.P. *et al.* 2004). Cette phosphorylation régule la localisation correcte de la Survivine au cours de la mitose. La Survivine semble par ailleurs aider au recrutement de Aurora-B sur les chromosomes (Chen, J. *et al.* 2003). Ces données ont conduit à un modèle d'interaction des différentes protéines passagères sous forme d'un complexe aux fonctions mitotiques multiples (Figure 25).

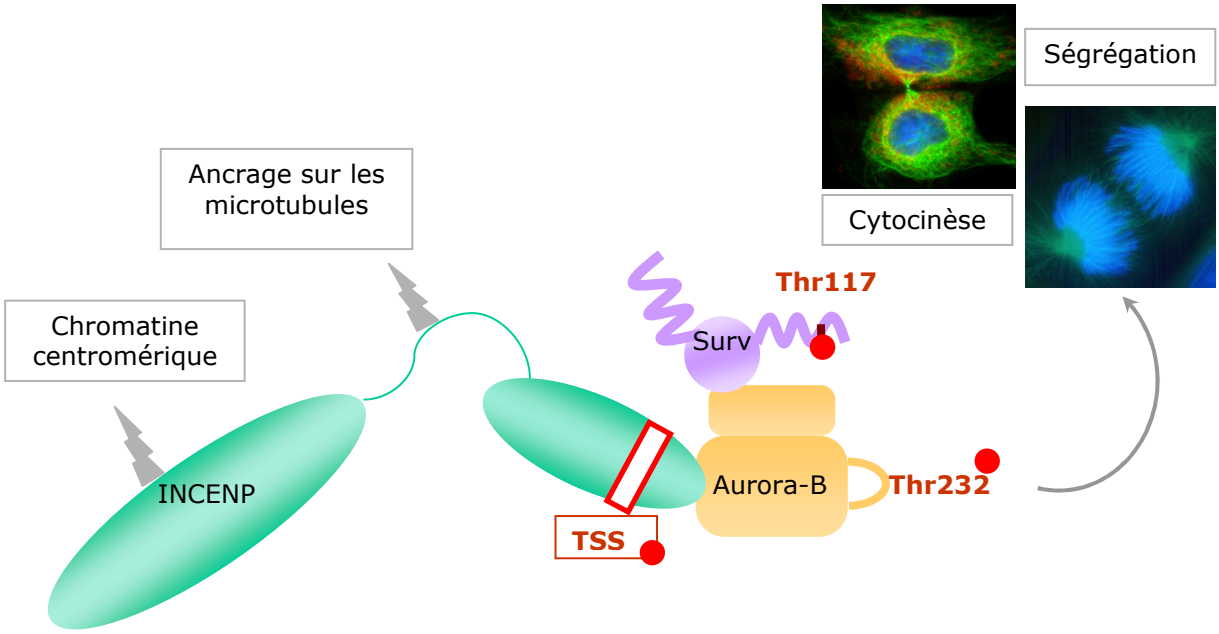


Figure 25 : Modèle d'interaction du complexe des protéines passagères Aurora-B, INCENP, Survivine.

La protéine INCENP agit comme une protéine « cargo » en transportant Aurora-B sur le lieu de son action. INCENP peut s'ancrer sur les microtubules et interagir avec la chromatine. Son interaction avec Aurora-B active l'auto-phosphorylation en Thr232 de Aurora-B qui phosphoryle en retour INCENP sur le site TSS de la IN-BOX (encadrée rouge). Aurora-B peut agir par la suite au niveau des chromosomes pour réguler leur ségrégation et au niveau du fuseau mitotique pour une cytocinèse correcte. La protéine Survivine stimule également l'activité d'Aurora-B et est phosphorylée en retour sur Thr177. Les phosphorylations sont représentées par des points rouges.

Très dernièrement, la caractérisation d'un quatrième partenaire, la Boréaline, a remis en cause l'hypothèse d'un complexe unique de protéines passagères chez l'homme (Gassmann, R. *et al.* 2004). Des expériences d'immunoprécipitation suggèrent la présence dans des extraits cellulaires mitotiques de HeLa d'un complexe INCENP / Aurora-B et d'un autre complexe INCENP / Aurora-B / Survivine / Boréaline. Cette hypothèse s'appuie sur les observations suivantes : INCENP est nécessaire pour la phosphorylation de l'histone H3 en position Ser10 par Aurora-B (Adams, R.R. *et al.* 2001) alors que ce même taux de phosphorylation n'est pas affecté lors de l'élimination des protéines Boréaline ou Survivine (Gassmann, R. *et al.* 2004) (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). Tout se passe comme si un complexe assurait les fonctions chromosomiques des protéines passagères en début de mitose en

phosphorylant l'histone H3 et peut-être CENP-A et qu'un autre complexe intervenait par la suite au niveau des kinétochores et du fuseau mitotique à partir de l'anaphase lorsque les protéines quittent les chromosomes (Gassmann, R. *et al.* 2004).

C. Les fonctions du complexe des protéines passagères

Les protéines passagères décrites précédemment, comme INCENP, la Survivine et la Boréaline, semblent agir comme des régulateurs communs de la kinase Aurora-B en prenant en charge sa localisation et son activation afin de lui permettre d'assurer ses fonctions mitotiques de manière spécifique (Adams, R.R. *et al.* 2001) (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). Les localisations cellulaires des complexes de protéines passagères reflètent donc les fonctions de la kinase Aurora-B. Ces complexes jouent plusieurs rôles fondamentaux chez tous les eucaryotes au cours du cycle cellulaire. Ils sont associés au processus de condensation des chromosomes mitotiques et participent à leur alignement et leur ségrégation tout au long de la mitose. Ces complexes de protéines passagères assurent par ailleurs des fonctions au cours de la cytocinèse.

a.Condensation des chromosomes

La kinase mitotique Aurora-B est considérée comme la kinase mitotique responsable de la phosphorylation de l'histone H3 sur le résidu Ser10 (Hsu, J.Y. *et al.* 2000) (Giet, R. and Glover, D.M. 2001). Cette phosphorylation est associée au phénomène de condensation des chromosomes (Hans, F. and Dimitrov, S. 2001) sans pour autant qu'une signification fonctionnelle soit clairement attribuée à cette modification post-traductionnelle. Chez *D. melanogaster*, les chromosomes mitotiques de cellules déplétées en Aurora-B ne sont pas phosphorylés en H3 Ser10 et présentent des morphologies anormales malgré une condensation relativement correcte (Adams, R.R. *et al.* 2001). Toutefois, la déplétion de certaines protéines passagères chez *D. melanogaster* ou *C. elegans* semble perturber le recrutement du complexe des condensines sur les chromosomes mitotiques au niveau des centromères (Giet, R. and Glover, D.M. 2001) (Kaitna, S. *et al.* 2002).

b.Point de contrôle du fuseau mitotique.

Afin de prévenir les ségrégations aberrantes des chromosomes, la transition métaphase/anaphase est finement contrôlée par le point de contrôle du fuseau mitotique (Figure 1). Cette transition ne peut être franchie que lorsqu'une tension suffisante s'exerce sur le chromosome (Musacchio, A. and Hardwick, K.G. 2002). Cette tension est la conséquence d'une bi-orientation du chromosome, sous l'action de deux forces opposées d'intensité égale et exercées par le fuseau mitotique en direction de chaque pôle de la cellule (attachement amphitélique), alors que les chromatides sœurs d'un même chromosome sont encore liées l'une à l'autre par les cohésines (Figure 26). La transition métaphase/anaphase conduit à la dégradation des cohésines centromériques par le protéasome et à l'individualisation des chromatides sœurs.

L'absence de tension dans le cas où une seule chromatide d'un chromosome est attachée à un seul pôle (attachement monotélique) ou lorsque les deux chromatides sont attachées au même pôle (attachement syntélique), active le point de contrôle du fuseau mitotique qui bloque le cycle cellulaire en métaphase (Figure 26).

Les complexes de protéines Mad/Bub sont les constituants majeurs du point de contrôle du fuseau mitotique. Ces protéines sont recrutées au niveau des kinétochores par l'intermédiaire de moteurs moléculaires tels que CENP-E. Elles retardent l'anaphase en capturant la cycline Cdc20, la sous-unité activatrice de l'APC complexe, jusqu'à ce que les défauts d'attachement des chromosomes soient réparés (Cleveland, D.W. *et al.* 2003).

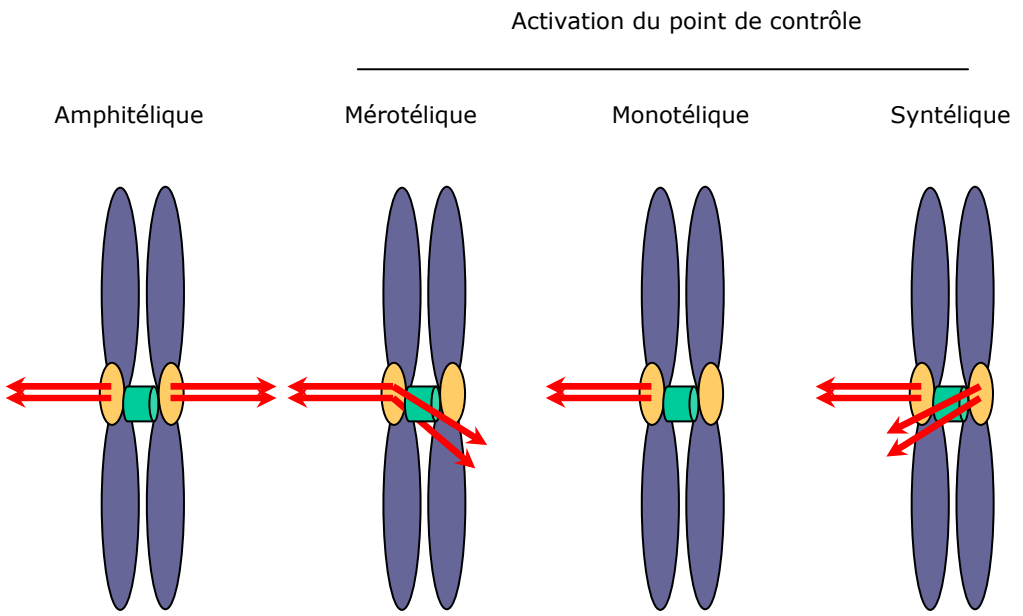


Figure 26 : L'attachement des microtubules aux chromatides sœurs par l'intermédiaire des kinétochores.

Attachement amphitélique (ou bi-polaire) : chacun des deux kinétochores est lié aux microtubules kinétochoriens orientés vers chaque pôle de la cellule. Attachement mérotélique : un seul kinétochore est lié par des microtubules orientés vers les deux pôles opposés. Attachement monotélique : un seul kinétochore est lié par des microtubules orientés vers un seul pôle. Attachement syntélique : les deux kinétochores sont liés par des microtubules provenant du même pôle de la cellule. Le point de contrôle du fuseau mitotique est activé dans le cas d'attachement mérotélique, monotélique et syntélique des chromosomes. Les kinétochores sont représentés en jaune, les chromatides en bleu, les microtubules par des flèches rouges et les cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs attachées en vert.

La première preuve de l'implication des protéines passagères dans l'attachement bi-polaire des chromosomes a été décrite chez la levure où des mutants de Sli15 et Ipl1 (INCENP et Aurora-B chez la levure) ne sont pas capables d'orienter correctement les chromosomes sur la plaque métaphasique (Tanaka, T.U. *et al.* 2002). Il a été montré que l'inhibition de l'activité catalytique de Aurora-B par l'Hespéradine dans des cellules HeLa aboutit à un fort taux d'attachement syntélique (Hauf, S. *et al.* 2003) (Lampson, M.A. *et al.* 2004). De même, l'élimination de la Boréaline par ARN interférence fait apparaître une fréquence importante d'attachements mérotéliques (Gassmann, R. *et al.* 2004).

Aurora-B semble corriger chez la levure les attachements incorrects des chromosomes par des phosphorylations successives de protéines du kinétochore et des protéines du centromère comme l'histone CENP-A (Biggins, S. *et al.* 1999) (Cheeseman, I.M. *et al.* 2002) (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004).

La kinase Aurora-B régule l'activité de la kinésine MCAK qui dépolymérise les microtubules. En prométaphase, une partie de MCAK est localisée au niveau du centromère tout comme Aurora-B. Une fois phosphorylée, MCAK devient inactive et ne dépolymérise plus les microtubules, permettant ainsi leur attachement aux kinétochores. MCAK reste cependant capable de réparer localement des erreurs d'attachement de type mérotélique ou syntélique. En anaphase, Aurora-B se délocalise des centromères ce qui entraîne la déphosphorylation de MCAK par la phosphatase PP1. MCAK, qui reste localisée à l'extrémité (+) des microtubules, devient active. Elle participe alors à la dépolymérisation des microtubules nécessaire à la séparation des chromatides sœurs (Andrews, P.D. *et al.* 2004) (Lan, W. *et al.* 2004) (Gorbsky, G.J. 2004).

c.Déroulement de la cytocinèse

Il est clairement établi depuis les premières études portant sur les protéines passagères que celles ci sont étroitement impliquées dans le bon déroulement de la cytocinèse. L'inhibition ou la déplétion de la fonction d'une des protéines passagères aboutit dans la majorité des organismes étudiés à des défauts dramatiques de cytocinèse (Schumacher, J.M. *et al.* 1998) (Terada, Y. *et al.* 1998) (Honda, R. *et al.* 2003) (Gassmann, R. *et al.* 2004).

Chez *C. elegans*, Aurora-B est nécessaire au recrutement de la protéine Zen-4, homologue de la protéine kinésine MKLP-1 de mammifères, avec laquelle elle interagit aux niveau des microtubules de la zone du futur sillon de division (Minoshima, Y. *et al.* 2003). Ce recrutement se ferait par l'intermédiaire de la protéine RhoA, acteur important de l'assemblage de l'anneau contractile en télophase (Mishima, M. *et al.* 2002) (Mishima, M. and Glotzer, M. 2003).

La kinase Aurora-B cible également d'autres moteurs moléculaires et protéines du sillon de division : la myosine (MRLC chaîne régulatrice de la myosine de type II) (Murata-Hori, M. *et al.* 2000), la Vimentine (Goto, H. *et al.* 2003) et MgcRacGap (Minoshima, Y. *et al.* 2003). En phosphorylant ces différents substrats, Aurora-B module le réseau de filaments intermédiaires en le déstabilisant pour permettre la cytocinèse.

Enfin, il a été démontré dernièrement que la kinase Aurora-B était capable de former un complexe avec la protéine TACC1 (Delaval, B. *et al.* 2004), une protéine associée aux centrosomes en début de mitose et phosphorylée par

Aurora-A (Giet, R. *et al.* 2002). En fin de mitose, TACC1 se localise au niveau du sillon de division et du corps résiduel en cytocinèse. Or TACC1 est incapable de se localiser correctement en fin de mitose si Aurora-B est absente. Ces résultats suggèrent que TACC1 forme un complexe en début de mitose avec Aurora-A puis à la transition métaphase / anaphase TACC1 est recrutée par Aurora-B au niveau du sillon de division (Delaval, B. *et al.* 2004).

II . TD-60 : une protéine passagère peu connue

A. Caractéristiques générales de TD-60

Des travaux visant à analyser la distribution d'un antigène mitose-spécifique reconnu par un sérum auto-immun ont conduit à l'identification de la protéine humaine TD-60 (Telophase Disc 60 kDa) (Andreassen, P.R. *et al.* 1991). La dynamique de localisation de TD-60 au cours de la mitose, des chromosomes vers le sillon de division de la cellule, a permis de répertorier la protéine TD-60 dans la famille des protéines passagères. Il a d'ailleurs été montré que TD-60 co-localise avec la protéine INCENP de la phase G2 jusqu'en cytodiérèse (Martineau-Thuillier, S. *et al.* 1998).

TD-60 est par ailleurs la seule protéine de la famille des passagères dont l'élimination entraîne une activation du point de contrôle du fuseau mitotique avec arrêt du cycle cellulaire en prométaphase (Mollinari, C. *et al.* 2003). A l'inverse, l'élimination des protéines Aurora-B, Survivine et INCENP entraîne des défauts d'alignement et de ségrégation des chromosomes mais les cellules progressent en mitose. Par ailleurs, la capacité de TD-60 à s'associer aux microtubules *in vitro* laisse présager un rôle potentiel dans l'association des microtubules et des kinétochores en prométaphase, sans que celui-ci ne soit pour le moment démontré (Mollinari, C. *et al.* 2003).

Enfin, TD-60 participe à la mise en place de l'anneau contractile en fin d'anaphase et en télophase et est impliquée dans le contrôle de la cytocinèse (Andreassen, P.R. *et al.* 1991) (Wheatley, S.P. and Wang, Y. 1996).

B. TD-60 : un facteur d'échange de nucléotide guanine ?

Mollinari et *al.* (2003) montrent, en identifiant la séquence de la protéine humaine TD-60 (Figure 38), qu'elle partage des signatures structurales très similaires à celles de la protéine RCC1 pour Regulator of Chromosome Condensation 1 (Renault, L. *et al.* 1998) (Figure 27).

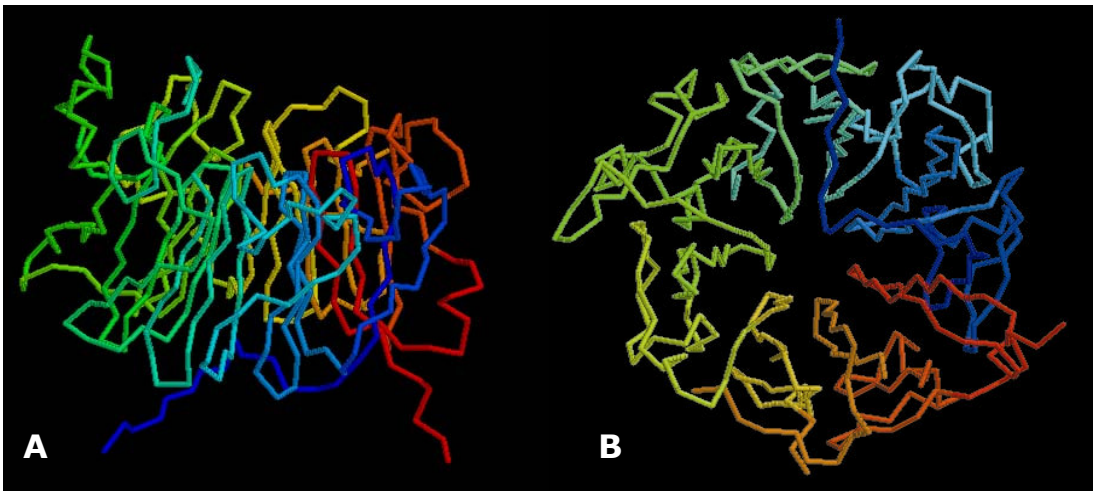


Figure 27 : Structure tri-dimensionnelle de RCC1 : vue longitudinale (A) et transversale (B).

Les sept motifs structuraux de RCC1, formés par des feuillets β qui s'organisent en hélice, sont indiqués par différentes couleurs. Modélisation par le programme Rasmol d'après PDB ID : 1A12.

RCC1 génère un gradient de Ran-GTP autour des chromosomes qui est impliqué dans l'assemblage et la stabilisation du fuseau mitotique. RCC1 intervient également dans l'initiation de la mitose et, comme son nom l'indique, dans la régulation de la condensation des chromosomes en mitose (Carazo-Salas, R.E. *et al.* 1999).

Bien que TD-60 n'ait aucune activité de facteur d'échange de guanosines démontrée comme c'est le cas pour RCC1 (GEF), la protéine peut toutefois interagir avec la GTPase Rac1. Ceci suggère que TD-60 pourrait être un facteur d'échange pour Rac1 en agissant spécifiquement en mitose (Mollinari, C. *et al.* 2003).

III . Conclusion

Dans la mesure où très peu de données sont disponibles concernant la protéine TD-60, il est très difficile de définir clairement ses différentes fonctions cellulaires au cours de la mitose. Afin d'apporter de nouvelles informations sur le comportement de cette protéine, nous avons entamé un travail visant à identifier TD-60 chez Xenopus laevis. L'obtention d'un anticorps spécifique nous a permis d'apporter de nouvelles informations sur la localisation et les rôles potentiels de TD-60 chez le xénope.

OBJECTIFS

Mon projet de recherche découle de nombreuses études menées dans le laboratoire dont le but est d'étudier les mécanismes d'assemblage des chromosomes mitotiques. De La Barre *et al*. (2000, 2001) ont notamment montré que l'assemblage des chromosomes mitotiques dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope est corrélé à la phosphorylation massive du résidu sérine 10 de l'histone H3. Afin de comprendre la signification fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle, des travaux ont ensuite été entrepris dans le but d'identifier la kinase mitotique responsable de cette phosphorylation particulière. Plusieurs kinases appartenant à la famille des kinases Aurora sont impliquées dans ce processus (Scrittori, L. *et al.* 2001).

Il existe deux kinases Aurora majoritaires chez les eucaryotes supérieurs : Aurora-A et Aurora-B. Elles montrent une organisation structurale proche avec un domaine catalytique central conservé et des extrémités amino- et carboxy-terminales divergentes. La kinase Aurora-A est une protéine localisée principalement au niveau des centrosomes. Elle régule le cycle de division du centrosome et la mise en place du fuseau mitotique (Dutertre, S. *et al.* 2002). La kinase Aurora-B appartient, quant à elle, à la famille des protéines passagères. Elle est localisée au niveau des centromères jusqu'en métaphase et migre vers le sillon de division en anaphase et sur le corps résiduel en télophase. Aurora-B est impliquée dans le déroulement correct du cycle cellulaire et dans le point de contrôle du fuseau mitotique (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). C'est par ailleurs la kinase mitotique responsable de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.

Cette différence de localisation cellulaire des kinases Aurora-A et Aurora-B reste surprenante et incomprise. Pourquoi, et surtout, comment deux protéines si homologues de part leurs structures peuvent-elles avoir des profils de localisation associés à des fonctions cellulaires si différents ? Est-il possible d'identifier des domaines protéiques spécifiques de chacune de ces deux kinases impliqués dans leurs profils de localisation et leurs fonctions respectives ? A l'inverse, si de tels domaines n'existent pas, est-il possible de remplacer fonctionnellement Aurora-A par Aurora-B ou Aurora-B par Aurora-A dans certains contextes cellulaires ? Afin de répondre à ces questions, un système de pseudo-génétique en cellules humaines HeLa a été mis en place au laboratoire et en collaboration avec Dimitrios Skoufias et Robert Margolis (Institut de Biologie

Structurale, Grenoble). Ce système d'étude très novateur permet d'éliminer spécifiquement, au sein d'une même cellule, une protéine endogène par ARN interférence et de surexprimer, en parallèle, une protéine recombinante exogène, identique ou mutante de la protéine endogène. Ce système a été validé sur la kinase Aurora-B et a permis de montrer que le domaine catalytique de Aurora-B assure toutes les fonctions mitotiques de Aurora-B (Scrittori, L. *et al.* 2005).

En appliquant un système de pseudo-génétique modifié en cellules humaines, la première partie de mon travail de thèse a porté sur l'identification de domaines fonctionnels de la kinase Aurora-A. Il a conduit à l'identification du domaine de localisation centrosomique de Aurora-A. Par ailleurs, ce travail a permis de comparer la fonctionnalité du domaine kinase de Aurora-A à celui de Aurora-B.

Dans un second temps, mon travail de thèse s'est orienté sur l'étude et la caractérisation de la protéine passagère TD-60. Nous avons choisi de travailler sur la protéine TD-60 de *Xenopus laevis* car nous possédions déjà les clones d'expression codant pour les protéines recombinantes xAurora-B, xINCENP et xSurvivine ainsi que leurs anticorps respectifs. Mon travail a consisté à cloner l'homologue TD-60 chez le xénope, en nous aidant de la séquence de TD-60 humaine que nous a fournie le laboratoire de Robert Margolis. Puis nous avons obtenu un anticorps spécifique de TD-60 de xénope. Nous avons par la suite tiré profit de l'expertise du laboratoire en matière de préparation d'extraits mitotiques d'œufs de xénope pour continuer notre étude (de la Barre, A.E. *et al.* 1999). Ces extraits, bloqués en métaphase II de meïose, ont l'avantage d'être extrêmement riches en protéines impliquées dans les processus mitotiques. Les propriétés de ces extraits, ainsi que la panoplie d'anticorps dirigés contre les protéines passagères de xénope, nous ont permis de poursuivre la caractérisation biochimique des complexes des protéines passagères. Nous avons également étudié le profil de localisation de la protéine xTD-60 endogène dans des cellules de xénope.

RESULTATS

Chapitre 1 : Caractérisation des domaines fonctionnels de la kinase mitotique Aurora-A

I . Contexte général de travail

Les kinases Aurora-A et Aurora-B sont des protéines très proches d'un point de vue structural (Figure 15). Elles possèdent un domaine catalytique central très conservé (67 à 76 % d'homologie de séquence polypeptidique). Leurs extrémités amino- et carboxy-terminales sont, par contre, très divergentes. De manière surprenante, ces deux protéines adoptent des profils de localisation totalement distincts, associés à des fonctions différentes au cours du cycle cellulaire. C'est pourquoi, nous nous sommes demandés s'il est possible de dégager des domaines fonctionnels spécifiques à chacune de ces deux protéines. Par exemple, existe-t-il des régions spécifiques dans les extrémités amino- et carboxy-terminales de ces kinases qui ciblent Aurora-A sur les centrosomes et Aurora-B sur les centromères ? Du fait de leur forte homologie, peut-on au contraire envisager le remplacement fonctionnel d'une kinase Aurora par l'autre et, inversement, sans répercussion sur le déroulement de la mitose ?

Pour répondre à ces questions, j'ai utilisé le système de pseudo-génétique mis en place précédemment au laboratoire, en collaboration avec les Drs Dimitrios Skoufias et Robert Margolis. Pour bien comprendre la puissance de ce système, il m'a paru important d'en rappeler le concept et les résultats que l'on peut en attendre (Scrittori, L. *et al.* 2005).

II . Le système de pseudo-génétique en cellules humaines

A. Principe de l'ARN interférence

Le processus d'ARN interférence (ARNi) est un processus naturel qui intervient entre autre au cours de la régulation de la transcription et qui existe chez tous les eucaryotes supérieurs (Bernstein, E. and Allis, C.D. 2005). Il permet à une cellule de dégrader spécifiquement un ARN messager par l'intermédiaire d'une machinerie protéique particulière. La présence anormale

dans la cellule d'ARN double brin (dsARN) active la protéine Dicer. Elle clive dans un premier temps ce dsARN en petites molécules d'ARN double brin (siARN pour silencing interference ARN). Le complexe protéique RISC (RNA induced silencing complex) associé à une molécule de siARN induit la dégradation du brin sens de celui-ci. Le simple brin anti-sens guide ensuite le complexe RISC vers l'ARNm de séquence complémentaire et entraîne son clivage et sa dégradation. La protéine codée par cet ARNm n'est donc plus exprimée par la cellule (Figure 28).

Ce processus d'élimination sélective d'un ARN donné est utilisé expérimentalement lorsque l'on veut éliminer une protéine endogène afin d'en étudier ses fonctions. Des siARN de 21 pb sont synthétisés chimiquement puis utilisés pour transfecter des cellules en culture. Ils vont activer le complexe RISC et entraîner la dégradation de l'ARNm codant pour la protéine étudiée.

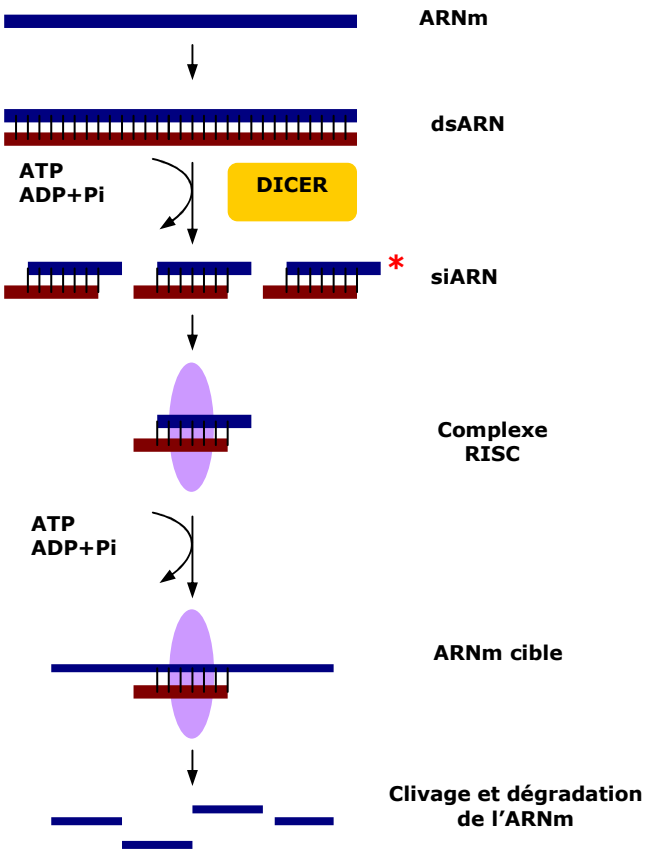


Figure 28 : Le processus d'ARN interférence.

La présence d'ARN double brin (dsARN) active la protéine Dicer qui le clive en petits ARN double brin (siARN) à extrémités cohésives. Ces siARN s'associent avec les complexes RISC qui dégrade dans un premier temps le brin sens du siARN. Le brin anti-sens du siARN guide ensuite le complexe RISC vers la séquence complémentaire de l'ARNm qui sera clivée et dégradée. Expérimentalement, pour supprimer l'expression d'une protéine, les cellules sont transfectées avec des petits siARN de 21pb similaires à ceux notés par un astérisque rouge. Ces siARN synthétisés chimiquement vont activer le complexe RISC, ce qui conduit à la dégradation de l'ARN codant pour la protéine étudiée.

Le système de pseudo-génétique en cellules humaines HeLa s'appuie sur l'utilisation du processus d'ARN interférence. Dans ce système d'étude, l'élimination de la protéine endogène par transfection de cellules par des siARN (Figure 29A) est couplée à la surexpression de la même protéine de façon exogène (Figure 29B). Cette protéine exogène est codée par un ARNm qui n'est pas reconnu par le siARN puisque, en tenant compte de la dégénérescence du code génétique, des mutations silencieuses sont introduites par mutagénèse dirigée dans la région cible du siARN. Il est ainsi possible d'exprimer dans une même cellule une protéine exogène, en absence de la protéine endogène. Si la

protéine exogène est capable d'assurer toutes les fonctions cellulaires de la protéine endogène, des mutants de la protéine peuvent être exprimés de façon exogène. Ces mutants permettent ainsi d'étudier les fonctions et d'identifier les domaines fonctionnels de la protéine étudiée.

Nous avons appliqué ce système aux kinases Aurora pour en étudier leurs fonctions.

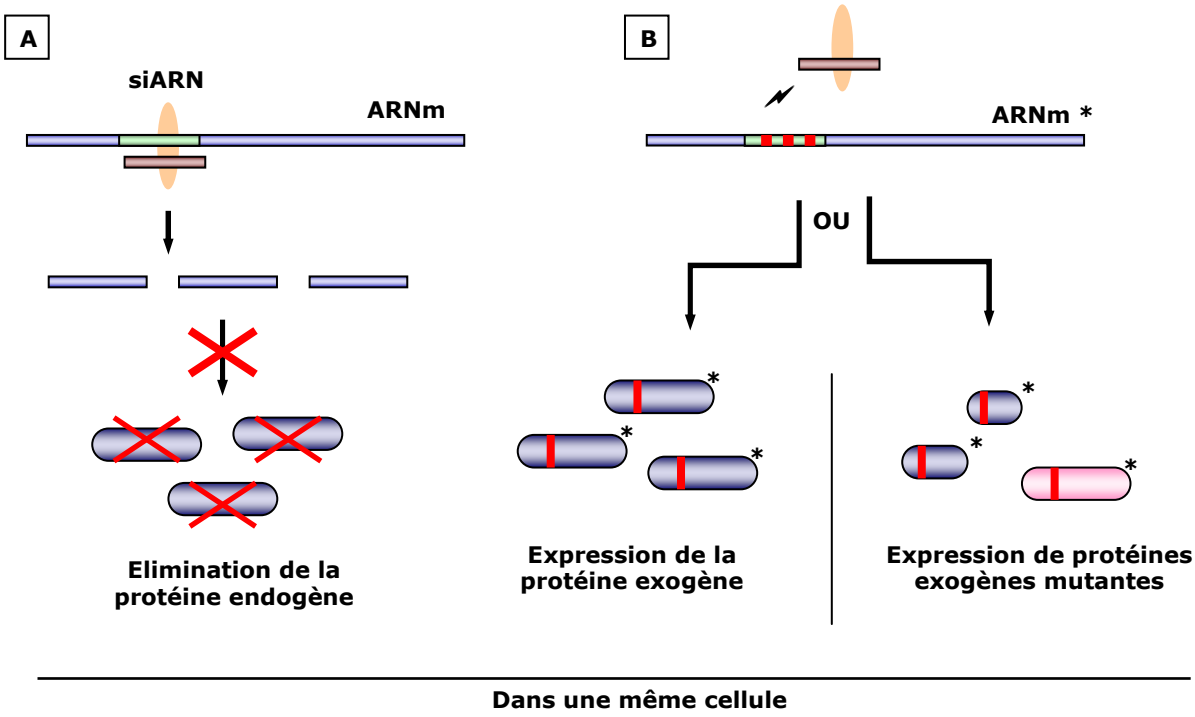


Figure 29 : Le système de pseudo-génétique en cellules humaines.

(**A**) Le système de pseudo-génétique consiste à éliminer une protéine endogène par transfection de siARN et (**B**) à surexprimer dans la même cellule une protéine exogène ou un mutant de la protéine. L'ARNm codant pour la protéine exogène native ou mutante n'est pas reconnu par le complexe RISC-siARN car des mutations silencieuses ont été introduites dans la séquence de l'ADN complémentaire à cet ARNm. La région de l'ARNm ciblée par le siARN est indiquée en vert. Les mutations silencieuses sont représentées par les traits rouges, les protéines exprimées de façon exogène ainsi que les ARNm correspondants sont indiqués avec un astérisque.

III . Le système de pseudo-génétique appliqué à la kinase Aurora-B

Le système de pseudo-génétique en cellules HeLa a été appliqué à la kinase Aurora-B dans des travaux précédemment menés au laboratoire (Scrittori, L. *et al.* 2005) exposés ci-dessous.

A. Phénotype de cellules HeLa en absence de Aurora-B

L'effet de l'élimination de la protéine Aurora-B sur le déroulement de la mitose a été analysé. Des cellules HeLa sont cultivées 24 heures puis transfectées avec un siARN dirigé contre la séquence nucléotidique codante pour la protéine Aurora-B comprise entre les nucléotides +90 et +109 (siARN-AurB). L'efficacité de ce traitement est analysée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-Aurora-B (anti-AurB) dirigé contre les acides aminés aa7-aa17 de la protéine (Crosio, C. *et al.* 2002). L'immunodétection de Aurora-B endogène confirme une baisse significative de Aurora-B dans des extraits de cellules HeLa bloquées en mitose et transfectée par le siARN-AurB, par rapport à des cellules HeLa bloquées en mitose et non transfectées par le siARN-AurB (Figure 30H).

L'observation par microscopie confocale de cellules HeLa transfectées par siARN et n'exprimant plus Aurora-B fait apparaître de nombreuses anomalies au cours de la mitose telles que :

- des défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (Figure 30D),
- des chromosomes dits « traînants » correspondant à une mauvaise ségrégation des chromatides soeurs en anaphase (Figure 30E),
- un taux anormalement élevé de cellules multinucléées en fin de cytocinèse (Figure 30F). On observe 20 % de cellules multinucléées 48 heures et près de 30 % après 72 heures de transfection (Figure 30G).

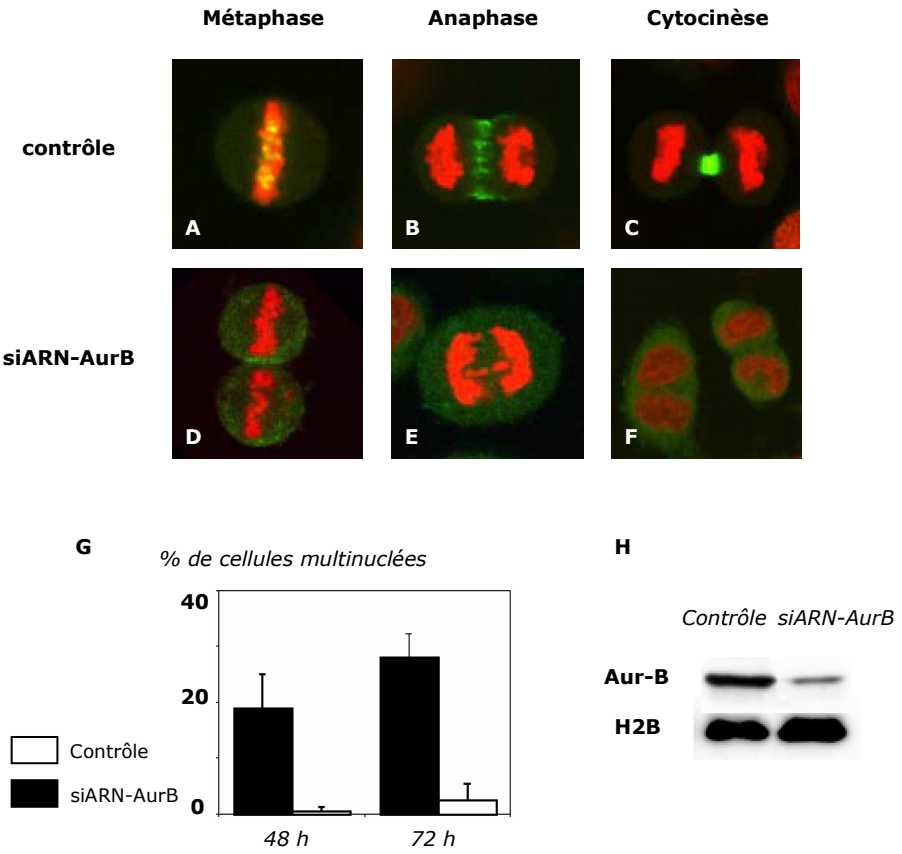


Figure 30 : Effet de l'élimination de la kinase Aurora-B par ARN interférence sur le déroulement de la mitose dans des cellules HeLa.

Immunolocalisation au cours de la mitose de la protéine Aurora-B endogène dans des cellules HeLa : (**A**) la protéine se localise sur les centromères des chromosomes en métaphase, (**B**) sur le sillon de division en anaphase et (**C**) sur le corps résiduel en cytocinèse. L'élimination de Aurora-B endogène par transfection des cellules par le siARN dirigé contre Aurora-B entraîne (**D**) des défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, (**E**) des chromosomes « trainants » dont les chromatides restent liées en fin d'anaphase et (**F**) des cellules multinucléées en fin de cytocinèse. La protéine Aurora-B endogène est détectée par l'anticorps anti-AurB en vert, l'ADN étant détecté par l'iodure de propidium (IP) en rouge. (**G**) L'efficacité de l'ARN interférence est évaluée par la quantité de cellules multinucléées 48h et 72h après transfection de siARN-AurB. (**H**) Immunodétection de Aurora-B endogène dans des extraits cellulaires de HeLa bloquées en mitose et transfectées ou non par siARN-AurB, à l'aide d'un anticorps anti-AurB, dirigé contre la région aa7-aa17 de Aurora-B et avec, comme contrôle interne, la détection de l'histone H2B (Scrittori, L. *et al.* 2005).

B. Mise au point du système de pseudo-génétique

Afin de mettre au point le système de pseudo-génétique, un vecteur d'expression codant pour une protéine Aurora-B exogène dont l'ARNm n'est pas dégradable par le siARN-AurB, a été construit.

*a.Construction du vecteur d'expression pcDNA-HA-AurB**

Le gène codant pour la protéine Aurora-B humaine a été cloné dans le vecteur plasmidique pcDNA-HA (Scrittori, L. *et al.* 2005). Ce vecteur est issu du vecteur commercial pcDNA-HIS (INVITROGEN) dont l'étiquette Histidine a été remplacée par une étiquette HA, par mutagénèse dirigée. Le profil de localisation de la protéine recombinante HA-AurB exprimée par le plasmide pcDNA-HA-AurB dans des cellules HeLa est caractéristique des protéines passagères (Figure 18).

Le plasmide pcDNA-HA-AurB* a été réalisé par mutagénèse dirigée à partir de la construction pcDNA-HA-AurB. Des mutations silencieuses ont été introduites dans la séquence nucléotidique codante +90 à +109. L'ARNm codant pour la protéine HA-AurB* n'est donc pas reconnu par le siARN-AurB utilisé pour éliminer Aurora-B endogène (Figure 31A,B).

Un choix judicieux d'anticorps permet de détecter spécifiquement les protéines Aurora-B endogène et exogène. La protéine HA-AurB* présentant une délétion des acides aminés aa7-aa11, l'anticorps anti-AurB spécifique de la courte séquence aa7-aa17 (Crosio, C. *et al.* 2002) ne détectera donc que la protéine endogène Aurora-B. La protéine HA-AurB* exogène sera détectée, quant à elle, par un anticorps anti-HA (Figure 31C).

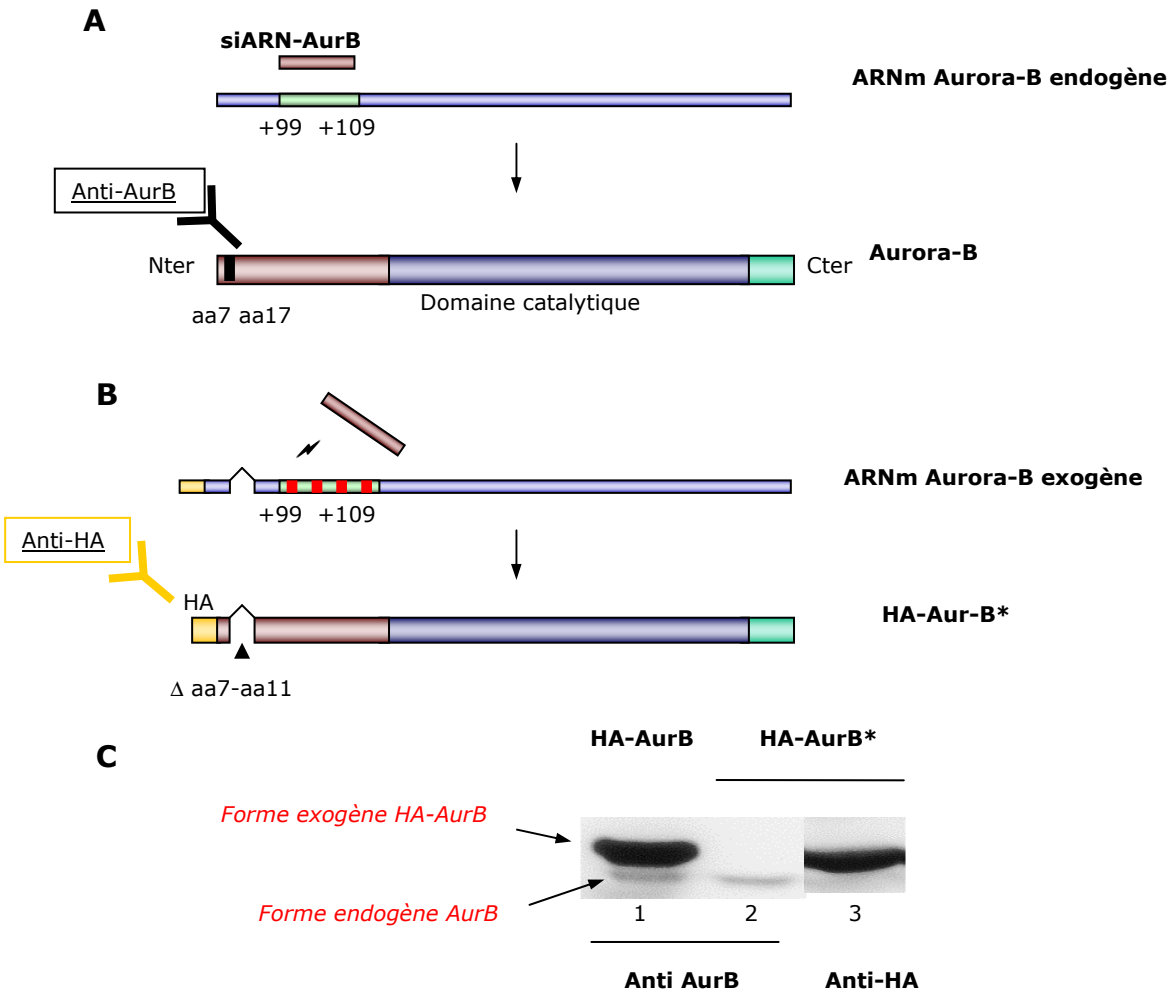


Figure 31 : Détection spécifique des protéines Aurora-B endogène et exogène dans le système de pseudo-génétique en cellules humaines.

(**A**) Le siARN-AurB utilisé dans le système de pseudo-génétique cible la séquence nucléotidique de l'ARNm de Aurora-B de +90 à +109. La protéine Aur-B endogène est détectée dans les cellules à l'aide d'un anticorps anti-AurB (Crosio, C. *et al.* 2002) qui reconnaît la séquence aa7-aa17 de Aurora-B. (**B**) L'ARNm codant pour la protéine HA-AurB* exogène possède des mutations silencieuses (traits rouges) dans la séquence nucléotidique ciblée par le siARN-AurB. Cet ARNm n'est pas donc dégradé par ARN interférence. De plus, la délétion de la séquence nucléotidique codant pour la région aa7-aa11 aboutit à une protéine exogène qui n'est pas reconnue par l'anticorps anti-AurB. La protéine HA-AurB* est détectée dans les cellules grâce à un anticorps anti-HA. (**C**) Immunodétection par western blot des formes endogène et exogène de Aurora-B dans des extraits cellulaires de HeLa bloqués en mitose. Des extraits de cellules transfectées par la construction codant pour la protéine HA-AurB (non mutée en aa7-aa11) présentent deux signaux lorsqu'on utilise l'anticorps anti-AurB : AurB endogène (faible signal) et HA-AurB exogène (fort signal) (ligne 1). Les cellules transfectées par la construction codant pour la protéine HA-AurB* présentent seulement le signal AurB endogène lorsque l'anticorps anti-AurB est utilisé (ligne 2), la protéine exogène HA-AurB* étant reconnue par l'anticorps anti-HA, qui ne reconnaît pas la protéine endogène (ligne 3).

b.Le système de pseudo-génétique appliqué à Aurora-B

La protéine HA-AurB* surexprimée dans des cellules, n'exprimant plus Aurora-B endogène suite à une transfection avec le siARN-AurB (Figure 32C,D), présente un profil de localisation typique des protéines passagères. Elle colocalise avec la chromatine centromèrique en métaphase (Figure 32E) et se situe sur le corps résiduel en cytocinèse (Figure 32F). Aucun défaut d'alignement (Figure 32E) et de ségrégation des chromosomes (Figure 32F) n'est observé. La cytocinèse se déroule normalement ce qui aboutit à la formation de deux cellules filles correctement individualisées (résultats non montrés). Ces cellules progressent correctement en mitose. La protéine HA-AurB* exogène assure donc les mêmes fonctions mitotiques que Aurora-B endogène.

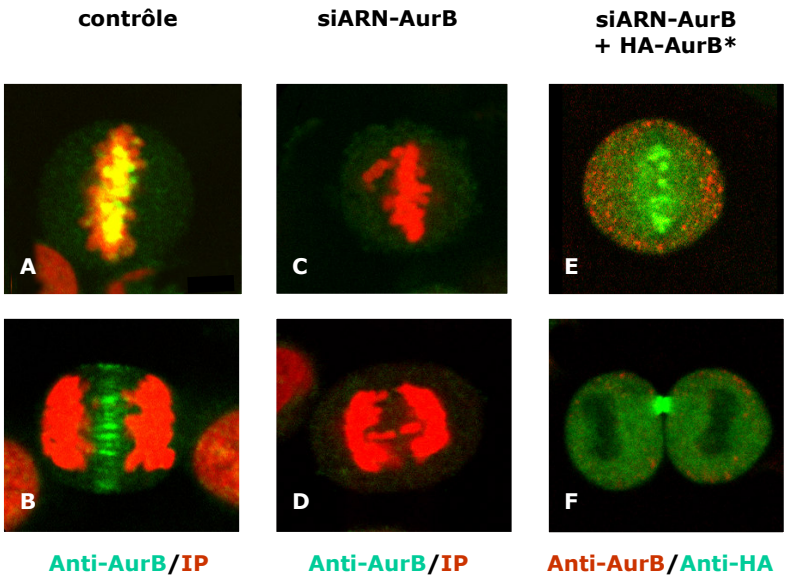


Figure 32 : L'expression d'une protéine Aurora-B exogène restaure le déroulement correct de la mitose dans des cellules dépourvues d'Aurora-B endogène.

La protéine Aurora-B endogène est localisée (**A**) sur les centromères en métaphase et (**B**) sur le sillon de division en anaphase. Les cellules transfectées par le siARN-AurB n'expriment plus Aurora-B et présentent (**C**) des défauts d'alignement et (**D**) de ségrégation des chromosomes. Des cellules transfectées par siARN-AurB et dans lesquelles HA-AurB* est surexprimée, ne présentent aucun défaut mitotique : la protéine exogène HA-AurB* se localise correctement (**E**) sur les chromosomes en métaphase et (**F**) au niveau du corps résiduel en télophase. La protéine Aurora-B endogène est immunodétectée dans des cellules HeLa par l'anticorps anti-AurB (en vert **A** et **B**, en rouge **E** et **F**), la protéine HA-AurB* par l'anticorps anti-HA (en vert **E** et **F**) et la chromatine est marquée à l'iodure de propidium (en rouge).

c.Conclusion

L'ensemble de ces données, obtenues précédemment dans le laboratoire (Scrittori, L. *et al.* 2005), démontre que le système de pseudo-génétique, lorsqu'il est appliqué à la kinase Aurora-B, est valide. Il est possible de rétablir un phénotype normal dans des cellules humaines dépourvues en Aurora-B endogène, en surexprimant une protéine Aurora-B exogène qui remplace et assure les fonctions de Aurora-B endogène.

En exprimant toute une panoplie de mutants de délétion de la protéine HA-AurB* dans des cellules dépourvues en Aurora-B endogène, Scrittori *et al.* (2005) ont également montré que les extrémités amino- et carboxy-terminales de Aurora-B ne jouent aucun rôle ni dans le profil de localisation, ni dans les fonctions mitotiques de la kinase. Le domaine catalytique de Aurora-B montre un profil de protéine passagère et assure à lui seul toutes les fonctions mitotiques de Aurora-B (Scrittori, L. *et al.* 2005). Dans ce domaine catalytique, une courte séquence de 7 acides aminés située à l'extrémité carboxy-terminale semble impliquée dans la localisation centromérique de la kinase. Le domaine catalytique de Aurora-B semble donc renfermer les informations nécessaires pour la localisation et surtout les fonctions de Aurora-B au cours de la mitose (Figure 33).

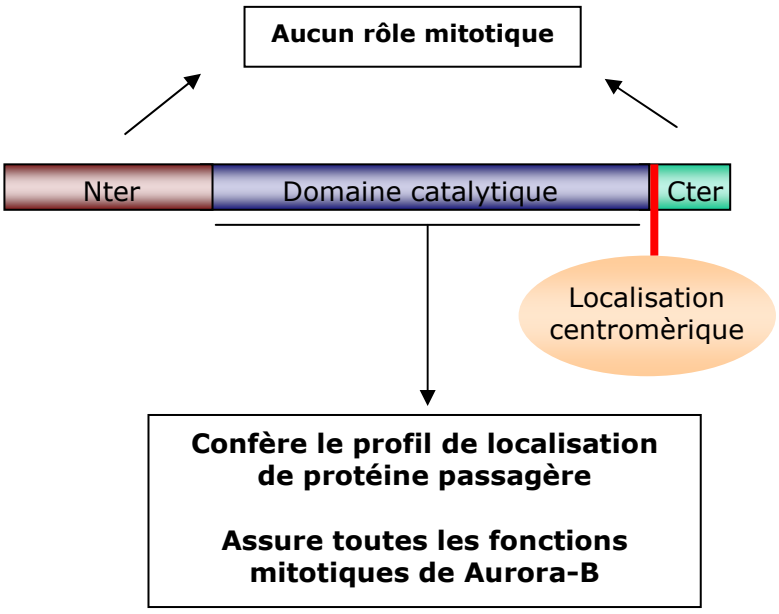


Figure 33 : Domaines fonctionnels de la kinase Aurora-B.

Le système de pseudo-génétique appliqué à la kinase Aurora-B ne démontre aucun rôle mitotique fonctionnel des extrémités amino- et carboxy-terminales de la protéine. En revanche, le domaine catalytique possède les informations nécessaires au profil de localisation de protéine passagère, ainsi que les informations permettant à la protéine Aurora-B de remplir toutes ses fonctions mitotiques. Plus précisément, il a été montré qu'une courte région à l'extrémité carboxy-terminale du domaine catalytique est impliquée dans la localisation de la kinase sur les centromères en début de mitose (Scrittori, L. *et al.* 2005).

IV . Identification des domaines fonctionnels de Aurora-A par un système de pseudo-génétique modifié

Nous venons de voir que le système de pseudo-génétique appliqué à la kinase Aurora-B est une méthode puissante et novatrice, qui a permis de caractériser les domaines fonctionnels de la kinase Aurora-B. Ces travaux nous ont poussés à mener le même travail et la même analyse sur la kinase Aurora-A. Ainsi, nous avons entrepris de mener l'étude fonctionnelle de Aurora-A en appliquant le système de pseudo-génétique.

A. Constructions de mutants de délétion de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A

Le gène codant pour la protéine Aurora-A humaine a été amplifié à partir d'une banque d'ADNc de foie fœtal et cloné dans le plasmide pcDNA-HA afin d'exprimer la protéine HA-AurA (Scrittori, Hans, communication personnelle). Cette protéine surexprimée dans des cellules HeLa se localise correctement au niveau des centrosomes et du fuseau mitotique (Figure 17).

A partir de la construction pcDNA-HA-AuraA, j'ai réalisé des délétions dans l'extrémité amino-terminale de la kinase Aurora-A par mutagénèse dirigée (Figure 34). Les protéines HA-AurADN30, HA-AurADN80 et HA-AurADN120 possèdent des extrémités N-ter délétées respectivement des 30, 80 et 120 premiers acides aminés. Le mutant de délétion HA-AurADN120 code finalement pour le domaine catalytique de Aurora-A avec l'extrémité carboxy-terminale.

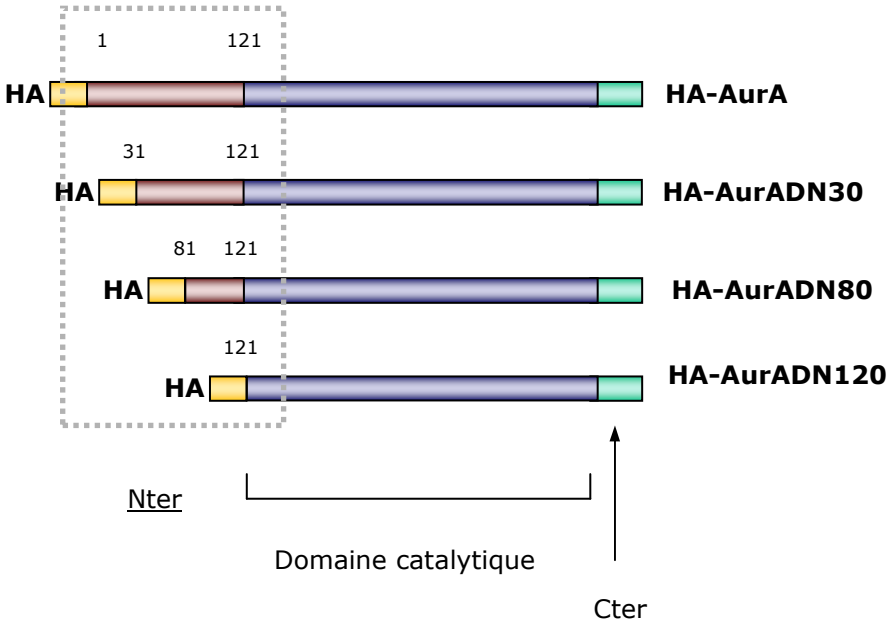


Figure 34 : Schéma des mutants de délétion de l'extrémité amino-terminale de la kinase Aurora-A.

La séquence HA est indiquée en jaune, l'extrémité amino-terminale de Aurora-A totale et délétée partiellement en violet, le domaine catalytique en bleu et l'extrémité carboxy-terminale en vert.

B. Essai de caractérisation des domaines fonctionnels de Aurora-A par pseudo-génétique classique

De la même façon que pour Aurora-B, nous avons appliqué le système de pseudo-génétique sur la kinase Aurora-A. Cependant, il n'a pas été possible de mener à bien cette étude car l'élimination de Aurora-A endogène dans des cellules HeLa, par l'utilisation d'un siARN dirigé contre une séquence nucléotidique codant pour la protéine Aurora-A, n'a mis en évidence aucun phénotype. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, conformément aux résultats de Hirota et *al.* (2003), les cellules ne semblent pas passer le point de contrôle de la phase G2 et meurent avant d'entrer en mitose.

C. Caractérisation des domaines fonctionnels de Aurora-A par un système de pseudo-génétique modifié

N'obtenant pas de phénotype associé à l'élimination de Aurora-A alors que l'élimination de Aurora-B conduit à des défauts mitotiques importants, nous étions en mesure d'apporter des éléments de réponse à la seconde question que nous nous étions posée : la kinase Aurora-A est-elle capable de remplacer fonctionnellement la kinase Aurora-B ? Pour cela, nous avons utilisé un système de pseudo-génétique modifié qui consiste à éliminer Aurora-B par ARN interférence et à surexprimer, dans une même cellule, Aurora-A ou ses mutants de délétion. Les résultats découlant de telles expériences nous ont renseignés sur les domaines de Aurora-A permettant sa localisation centrosomique ainsi que sur ceux assurant ses fonctions mitotiques.

a.Localisation cellulaire de HA-Aurora-A exogène

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le profil de localisation de la protéine HA-AurA surexprimée dans des cellules HeLa est bien centrosomique. En présence de Aurora-B, la protéine exogène HA-AurA est localisée correctement au niveau des centrosomes au cours de la mitose (Figure 35A,B) et sur le fuseau mitotique (résultats non montrés).

Lorsque Aurora-B endogène est éliminée, la protéine HA-AurA surexprimée de façon exogène garde son profil de localisation centrosomique (Figure 35C). Cependant, elle se localise également au niveau du corps résiduel en cytocinèse (Figure 35D). Aucun défaut de condensation et d'alignement des chromosomes n'est observé. La présence de cellules en cytocinèse avancée mais ne conduisant pas à l'individualisation des cellules filles (résultats non montrés), suggère que Aurora-A assure ses fonctions centrosomiques mais aussi une partie des fonctions mitotiques de Aurora-B.

b.Localisation cellulaire de HA-AurADN30 et HA-AurADN80

Nous avons ensuite analysé le rôle de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A dans la localisation centrosomique de Aurora-A. En présence de Aurora-B, la délétion des 30 (résultats non montrés) ou des 80 premiers acides aminés de la séquence de Aurora-A, aboutit à une localisation cellulaire des mutants identique à celle de la protéine sauvage Aurora-A. Les protéines mutantes HA-AurADN30 et HA-AurADN80 restent centrosomiques (Figure 35E,F).

En absence de Aurora-B, ces mutants conservent leur localisation centrosomique (Figure 35G). Mais ils s'accumulent sur le fuseau mitotique, au niveau du sillon de division et du corps résiduel (Figure 35H), tout comme HA-Aurora-A.

Ces observations semblent indiquer que les 80 premiers acides aminés de Aurora-A ne sont pas impliqués dans la localisation centrosomique de la kinase Aurora-A, puisque aucune perte de localisation centrosomique n'est observée lorsque ces acides aminés sont délétés. Ces protéines mutantes semblent assurer les mêmes fonctions centrosomiques que Aurora-A. Elles assurent également une partie des fonctions mitotiques de Aurora-B puisque des cellules en fin de cytocinèse sans individualisation de cellules filles (résultats non montrés) sont observées.

c.Localisation cellulaire du domaine catalytique de Aurora-A (mutant HA-AurADN120)

Le mutant de délétion de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A code pour la protéine HA-AurADN120 correspondant au domaine catalytique de

Aurora-A. Au vu de la très forte homologie de séquence et de structure des domaines catalytiques des protéines Aurora-A et Aurora-B, il était intéressant de savoir si le domaine kinase de Aurora-A montre un profil de localisation centrosomique ou montre le profil de localisation des protéines passagères comme le domaine kinase de Aurora-B. Si tel est le cas, est-il capable de remplir les mêmes fonctions mitotiques que le domaine kinase de Aurora-B ?

En présence de Aurora-B, le mutant HA-AurADN120 perd sa localisation centrosomique (Figure 35I,J). Nous montrons donc que la région aa80-aa120 de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A englobe un signal impliqué dans la localisation centrosomique de Aurora-A. Nous confirmons ainsi des précédents travaux qui démontrent que l'extrémité amino-terminale de Aurora-A se localise sur les centrosomes *via* une interaction avec les microtubules (Giet, R. and Prigent, C. 2001).

En présence de Aurora-B, le domaine catalytique de Aurora-A acquiert une localisation centromérique en prophase (Figure 35I) et en métaphase (Figure 35J). Le domaine catalytique de Aurora-A possède donc un domaine de localisation centromérique, tout comme le domaine catalytique de Aurora-B.

Il faut noter cependant que le domaine qui localise Aurora-A sur les centrosomes est « dominant » par rapport au domaine qui localise la protéine au niveau des centromères, puisque la protéine Aurora-A se localise sur le centrosome alors que le domaine catalytique de Aurora-A se localise sur les centromères.

En absence de Aurora-B, le domaine catalytique de Aurora-A reste localisé sur les chromosomes en anaphase et ne se transfère pas sur le sillon de division comme le domaine catalytique de Aurora-B (Figure 35K,L). Ce résultat nous permet de dire que le domaine catalytique de Aurora-A ne possède pas le domaine permettant le transfert de la protéine des centromères vers le sillon de division. De plus, dans ce cas de figure, les défauts mitotiques conséquents à l'élimination de Aurora-B endogène ne sont pas révertés par l'expression du domaine catalytique de Aurora-A (résultats non montrés). Le domaine catalytique de Aurora-A, à l'inverse de celui de Aurora-B, n'est donc pas capable d'assurer toutes les fonctions mitotiques de Aurora-B.

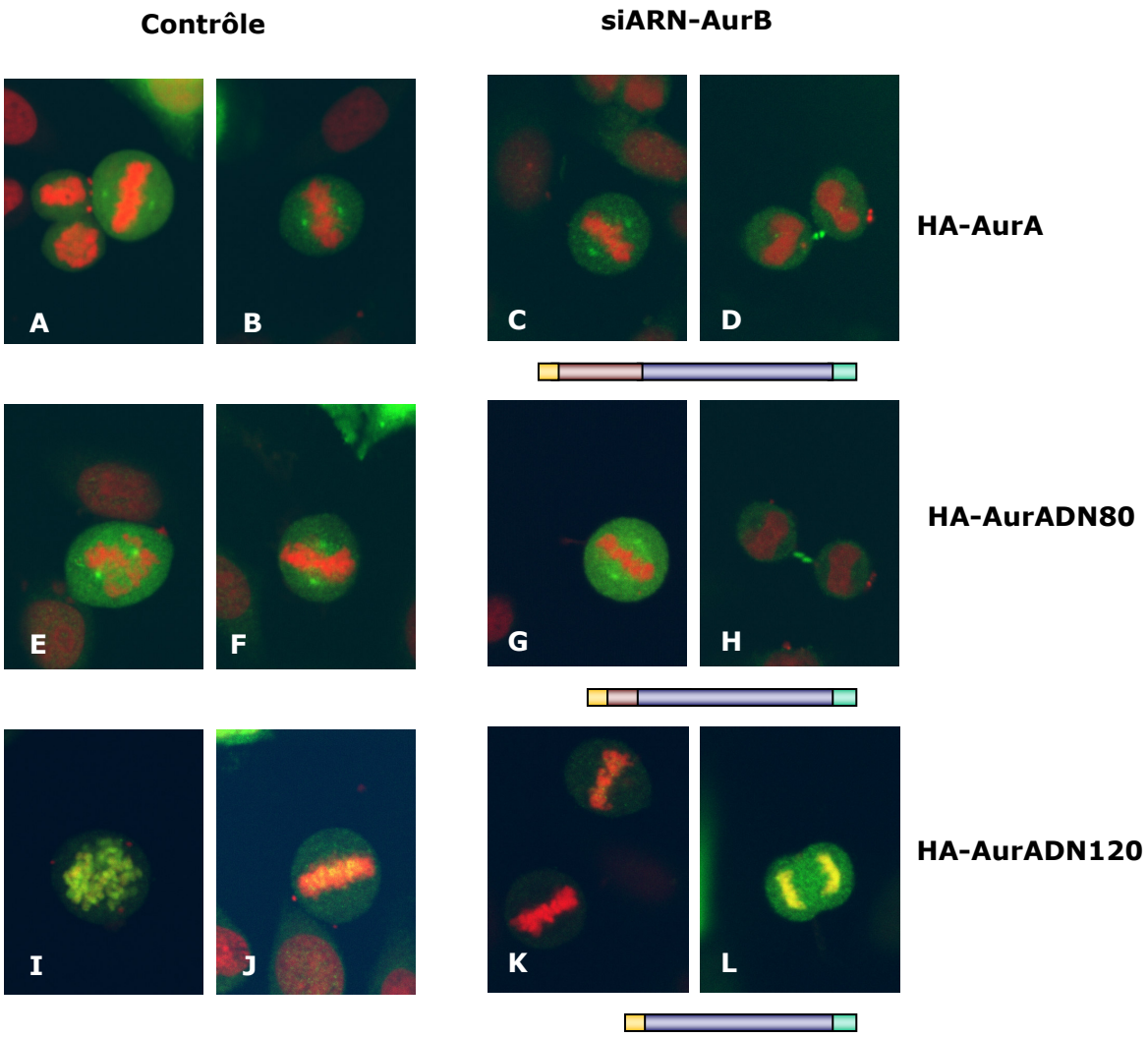


Figure 35 : Identification des domaines fonctionnels de la kinase mitotique Aurora-A.

Immunolocalisation au cours de la mitose de la protéine HA-Aurora-A (HA-AurA) et de ses mutants de délétion de l'extrémité amino-terminale dans des cellules HeLa en présence (**contrôle**) et en absence (**siARN-AurB**) de Aurora-B. La protéine exogène surexprimée est détectée par l'anticorps anti-HA (en vert) et la chromatine est marquée par l'iodure de propidium (en rouge). La colocalisation des signaux apparaît jaune. (**A,B**) HA-AurA se localise correctement sur les centrosomes en présence de Aurora-B. En absence de Aurora-B après transfection des cellules avec le siARN-AurB, HA-AurA reste (**C**) sur les centrosomes et apparaît (**D**) sur le corps résiduel en fin de mitose. Les mutants de délétion HA-AurADN30 (résultats non montrés) et HA-AurADN80 décrivent les mêmes profils de localisation que la protéine HA-AurA en présence (**E,F**) et en absence (**G,H**) de Aurora-B. (**I,J**) Le mutant HA-AurADN120 qui code pour le domaine catalytique de Aurora-A est localisé sur les centromères en présence de Aurora-B. (**K,L**) Il reste sur les centromères et ne se transfère pas sur le sillon de division en fin de mitose en absence de Aurora-B.

V . Conclusions

Ces résultats permettent, d'une part, de caractériser plus précisément le domaine de localisation centrosomique de Aurora-A, qui semble compris entre les acides aminés 80 et 120 de l'extrémité amino-terminale de la protéine (Figure 36).

D'autre part, ces résultats indiquent que le domaine catalytique de Aurora-A montre un profil de localisation en partie similaire à celui de Aurora-B. Il se localise sur les centromères jusqu'en métaphase. Le domaine catalytique de Aurora-A contient donc comme celui de Aurora-B un domaine de localisation centromérique.

Toutefois en anaphase, le domaine catalytique de Aurora-A ne se transfère pas sur le sillon de division et reste associé à la zone centromérique, à l'inverse du domaine catalytique de Aurora-B. Le domaine catalytique de Aurora-A ne possède donc pas le domaine localisé dans le domaine catalytique de Aurora-B, impliqué dans le transfert de Aurora-B des centromères vers le sillon de division. En conséquence, le domaine catalytique de Aurora-A ne peut pas assurer toutes les fonctions mitotiques de Aurora-B (Figure 36).

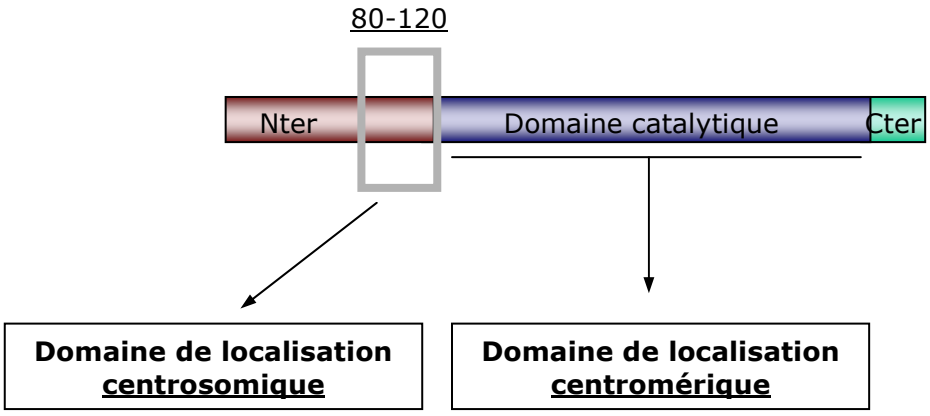


Figure 36 : Domaines fonctionnels de la kinase Aurora-A.

Le système de pseudo-génétique appliqué à la kinase Aurora-A dans des cellules transfectées avec des siARN-AurB, démontre que la région aa80-aa120 de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A renferme le domaine de localisation centrosomique de la protéine. Le domaine catalytique de Aurora-A est capable de se localiser sur les centromères. Il possède donc un domaine de localisation centromérique tout comme Aurora-B. Toutefois, il n'est pas capable de migrer des centromères vers le sillon de division.

Chapitre 2 : Caractérisation de TD-60 chez *Xenopus laevis*

Ces travaux de thèse ont dans un deuxième temps porté sur la caractérisation de la protéine passagère TD-60 de xénope (xTD-60). Au début de ces travaux, la séquence de TD-60 humaine (hTD-60) était connue et des prédictions de structure avaient montré que hTD-60 présente les 7 motifs structuraux répétés caractéristiques de la protéine RCC1 (Mollinari, C. *et al.* 2003). L'utilisation d'un sérum auto-immun mitose-spécifique et reconnaissant hTD-60 avait démontré que hTD-60 possède un profil de localisation de protéines passagères (Andreassen, P.R. *et al.* 1991).

I . Identification de la séquence de TD-60 de xénope

A. Recherche *in sillico* dans les banques de données

La séquence nucléotidique et protéique de hTD-60 (Numéro d'accession AJ421269) a été utilisée afin de rechercher des clones pouvant coder pour la protéine xTD-60 dans la banque de données de *Xenopus laevis*, disponible à l'Institute for Genomic Research (TIGR http://www.tigr.org). Trois clones incomplets montrant de fortes homologies de séquence avec la protéine humaine ont été sélectionnés : BJO35778, TC87471 et TC73334 (Figure 37A).

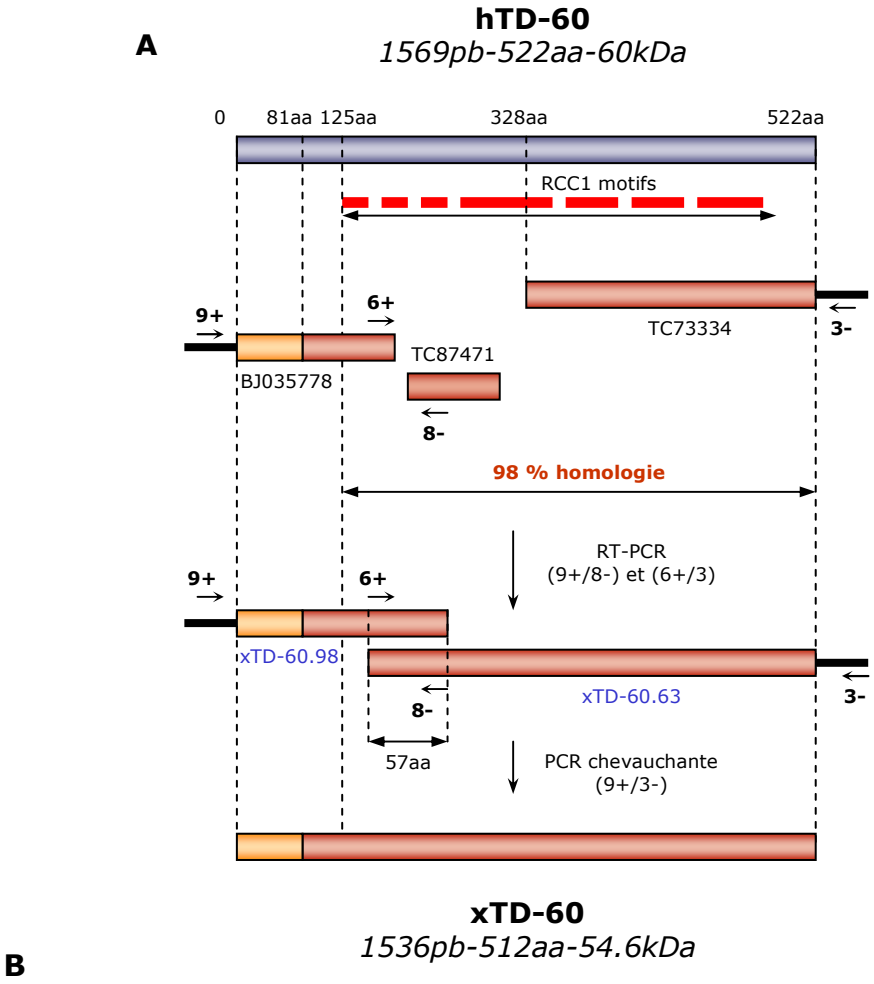


Figure 37 : Identification de la séquence nucléotidique de TD-60 de xénope.

(**A**) La séquence nucléotidique et peptidique de hTD-60 (AJ421269) a été comparée à la banque de clones de *Xenopus laevis* (TIGR). Trois clones incomplets sont ressortis montrant un pourcentage d'identité peptidique variant de 56 à 77 %. Deux couples d'oligonucléotides (9+/8- et 6+/3-) ont été synthétisés et ont permis d'obtenir deux fragments d'ADN xTD-60.98 et xTD-60.63 par RT-PCR à partir d'ARN extraits d'œufs de xénope. Ces fragments d'ADN possèdent une longue séquence chevauchante comprise entre les sites d'hybridation des oligonucléotides 6+ et 8-. La séquence nucléotidique totale de xTD-60 a été obtenue par PCR chevauchante à partir des fragments xTD-60.98 et xTD-60.63 et des oligonucléotides 9+ et 3-. (**B**) Comparaison des séquences peptidiques de la zone de chevauchement (rouge) codées par les fragments xTD-60.98 (vert) et xTD-60.63 (bleu). Les régions non codantes sont représentées par des traits noirs, les régions codantes par des rectangles de couleur.

Au niveau protéique, le clone BJ035778 présente 61 % d'identité avec la région aa1-aa80 de hTD-60 et 77 % avec la région aa81-aa153. Le clone TC87471 possède des motifs caractéristiques de la protéine RCC1. Il présente 56 % d'identité avec la région aa169-aa305 de hTD-60. Le clone TC73334 présente lui 77 % d'identité avec la région terminale aa326-aa522 de hTD-60 (Figure 37A).

Au vu du degré d'identité des séquences protéiques codées par ces trois clones avec la protéine hTD-60, nous avons entrepris de cloner le gène codant pour xTD-60. Deux couples d'oligonucléotides ont été synthétisés : 9+/8- et 6+/3- (Figure 37A). Les oligonucléotides « aller » 9+ et 6+ s'hybrident sur la séquence nucléotidique transcrite (5') non codante pour 9+ et codante pour 6+ du clone BJ035778. L'oligonucléotide « retour » 8- s'hybride sur la séquence nucléotidique transcrite (3') codante du clone TC87471. L'oligonucléotide « retour » 3- s'hybride sur la séquence nucléotidique non transcrite (3') et non codante du clone TC73334 (Figure 37A).

Ces deux couples d'oligonucléotides ont permis d'amplifier deux fragments d'ADN par RT-PCR notés xTD-60.98 et xTD-60.63, à partir d'ARN d'extraits mitotiques d'œufs de xénope (Figure 37A). Le fait d'amplifier le fragment xTD-60.98 nous informe que les clones BJ035778 et TC87471 qui ne sont pas chevauchant, appartiennent bien à un même gène. De même, l'amplification du fragment xTD-60.63 traduit l'appartenance des clones BJ035778 et TC73334 non chevauchants à un même gène.

La limite de résolution de la technique de RT-PCR étant de l'ordre de 1000 à 1200 pb, nous n'avons pas pu amplifier la séquence nucléotidique complète de xTD-60 (1536 pb) avec le couple d'oligonucléotides 9+/3-. L'analyse des séquences peptidiques codées par les fragments d'ADN xTD-60.98 et xTD-60.63 fait apparaître une grande zone de chevauchement identique à 99 % (Figure 37B). Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux fragments de PCR appartiennent à un même gène. Nous avons ainsi réalisé une PCR chevauchante en utilisant comme matrice les deux fragments xTD-60.98 et xTD-60.63 et les oligonucléotides 9+ et 3-. Nous avons ainsi obtenu la séquence nucléotidique totale codant pour la protéine xTD-60 (Figure 37A). Cette séquence a été déposée dans la banque de données de *Xenopus laevis* par un autre groupe et est disponible depuis avril 2005 sous le numéro d'accession BC094159.

B. Comparaison de séquence des protéines TD-60 humaine et xénope.

La protéine TD-60 de xénope possède 512aa et un poids moléculaire de 56.4 kDa. Nous avons comparé la séquence peptidique de xTD-60 à celle de la protéine humaine hTD-60. Il apparaît une très forte identité de séquence entre les deux protéines, de l'ordre de 87 % (Figure 38). Seule la région comprenant les 80 premiers acides aminés (aa1-aa80) est très divergente. Tout comme hTD-60, xTD-60 possède les sept motifs structuraux de type RCC1 (Mollinari, C. *et al.* 2003). Le pourcentage d'homologie est de près de 97 % entre les 7 motifs structuraux répétés de type RCC1 de hTD-60 et xTD-60.

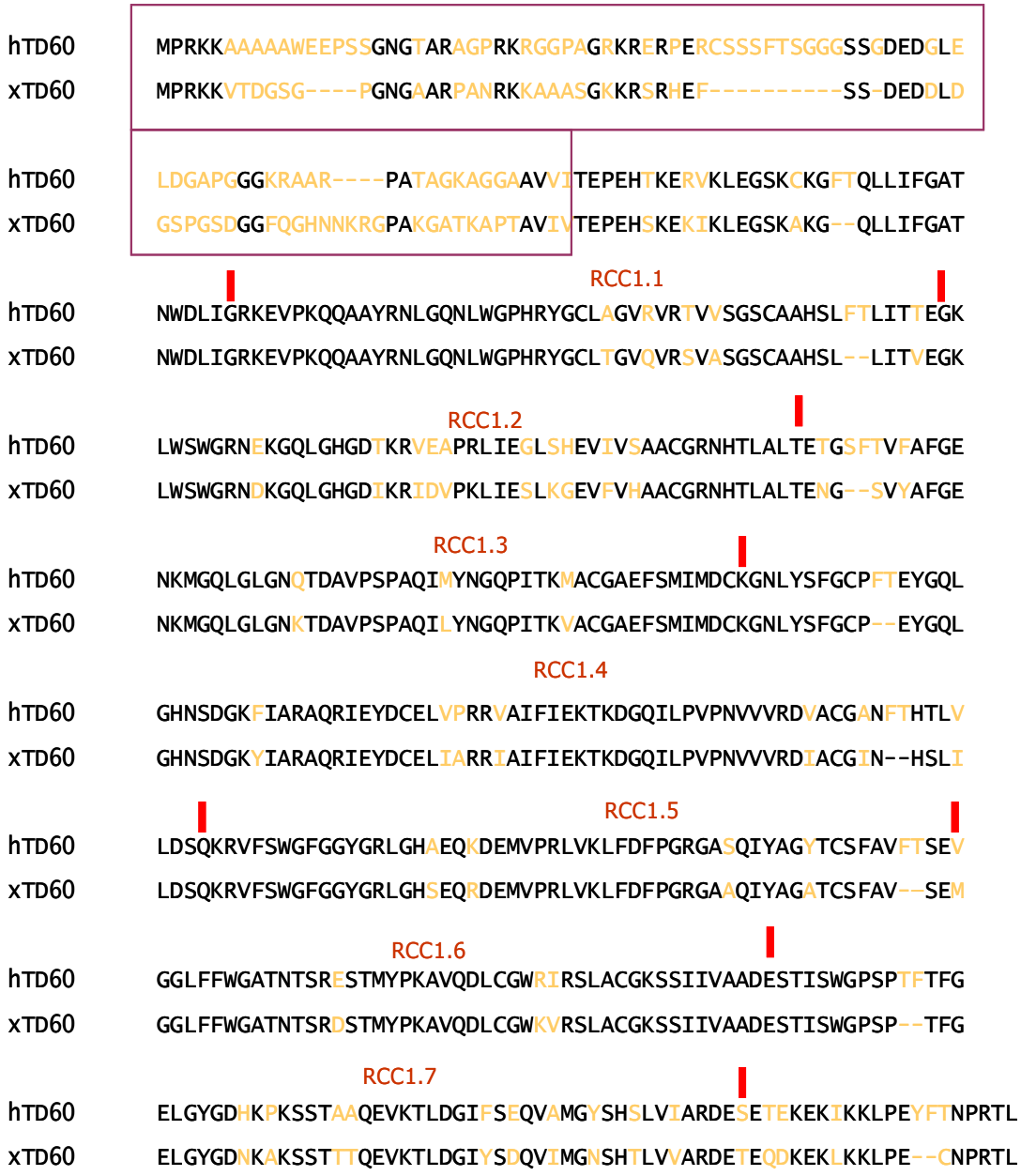


Figure 38 : Alignement des séquences peptidiques de hTD-60 et xTD-60.

La comparaison des séquences peptidiques de hTD-60 et xTD-60 présente une forte homologie entre les protéines. Seuls les 80 premiers acides aminés (encadrés) de l'extrémité amino-terminale diffèrent d'une protéine à l'autre. Les sept motifs structuraux de type RCC1 qui sont présents dans la séquence de hTD-60 délimités par les traits rouges (Mollinari, C. *et al.* 2003), sont conservés dans la séquence de xTD-60. Les acides aminés divergents sont indiqués en jaune.

II . Production et caractérisation d'un anticorps dirigé contre la partie carboxy-terminale de xTD-60

Afin d'étudier la protéine TD-60 de xénope et d'analyser sa présence au sein du complexe de protéines passagères, il nous était nécessaire d'avoir plusieurs anticorps dirigés contre xTD-60. Notre stratégie a été d'obtenir deux anticorps : un anticorps spécifique de xTD-60, reconnaissant l'extrémité amino-terminale de xTD-60, et un anticorps commun à hTD-60 et xTD-60, reconnaissant l'extrémité carboxy-terminale identique aux deux protéines.

A. Clonage, expression et purification de la partie carboxy-terminale de xTD-60

Les séquences nucléotidiques codant pour les régions aa150-aa512, aa150-aa320 et aa320-aa512 de la protéine xTD-60 ont été clonées dans le vecteur d'expression bactérien pET-M11 (Figure 39A). Ce vecteur permet d'ajouter une étiquette poly-histidine en amino-terminale de la protéine recombinante. Plusieurs souches bactériennes et plusieurs conditions d'induction ont été testées pour exprimer les protéines recombinantes HIS-xTD-60.63, HIS-xTD-60.180 et HIS-xTD-60.193Cter résultant de ces clonages. Nous avons été capables d'exprimer uniquement la protéine HIS-xTD-60.193Cter dans la souche bactérienne *Escherichia coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagène). Cette souche a la particularité de coder pour des ARNt rarement utilisés par *E. coli*, ce qui améliore l'expression de protéines recombinantes eucaryotes. Les bactéries sont transformées avec la construction pET-M11-xTD-60.193Cter et étalées sur milieu solide LB agar suppléé par 1 mM Kanamycine. Les clones sont prélevés et cultivés en milieu liquide LB. 1 mM IPTG est ajouté au milieu de culture lorsque la DO_{280} atteint 0.4/0.5, afin d'induire l'expression de la protéine pendant 4 heures et à 37°C.

Le profil d'expression de la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter montre que la protéine s'exprime dans des extraits bactériens induits par rapport à des extraits non induits (Figure 39B lignes 1 et 2). Cependant la protéine est

majoritairement insoluble puisqu'elle reste dans le culot bactérien (Figure 39B, lignes 3 et 4).

Nous avons mené une purification de la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter dans des conditions dénaturantes en présence de 8 M d'urée, sur une colonne de nickel (Qiagen), l'étiquette HIS ayant une forte affinité pour les ions Ni^{2+} (Figure 39C). L'élution de la protéine HIS-xTD-60.193Cter a été réalisée avec des concentrations croissantes d'imidazole. Les fractions concentrées en protéine pure (Figure 39C, lignes 2 à 5) sont réunies et dialysées contre du tampon PBS. La protéine HIS-xTD-60.193Cter a ensuite été injectée à deux lapins selon un protocole d'immunisation de trois injections de 100 µg de protéine par lapin à 15 jours d'intervalle (Eurogentec).

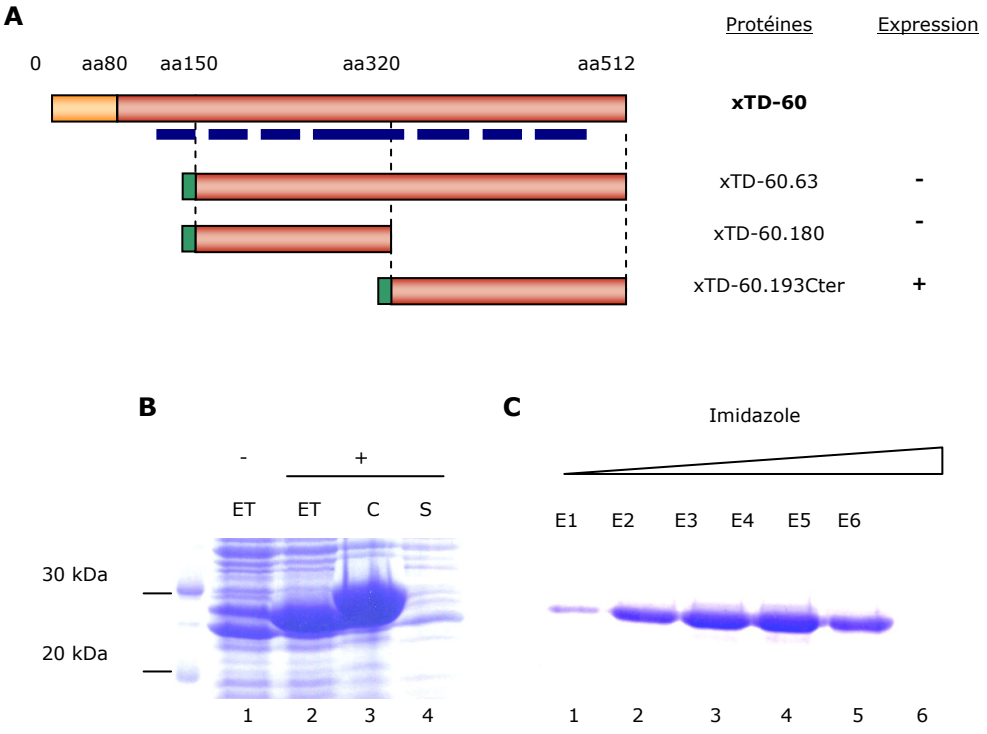


Figure 39 : Production de la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter.

(**A**) Représentation schématique des protéines recombinantes HIS-xTD-60.63, HIS-xTD-60.180 et HIS-xTD-60.193Cter. Les sept motifs structuraux RCC1 conservés sont indiqués en bleu, l'extrémité amino-terminale de xTD-60 divergente de hTD-60 en jaune et l'étiquette HIS des protéines en vert. (**B**) Expression de la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter. Après induction par l'IPTG, HIS-xTD-60.193Cter s'exprime de manière insoluble. Extraits bactériens totaux ET non induits (-) et induites (+), fraction insoluble C et soluble S. (**C**) Profil d'élution de HIS-xTD-60.193Cter purifiée en conditions dénaturantes (8M urée) sur colonne d'affinité aux ions nickel. La protéine est éluée par des concentrations croissantes d'imidazole. Fractions d'élution E1 à E6.

B. Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.193Cter

Afin de caractériser l'anticorps dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de xTD-60, le sérum des lapins immunisés avec la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter a été testé en immunodétection par western blot (Figure 40). A une dilution de 1/500ème, le sérum détecte bien la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter de 26 kDa ajoutée en quantité décroissante à des extraits bactériens d'*E. coli* (Figure 40A). Le seuil de sensibilité du sérum vis-à-vis de la protéine est d'environ 50ng (Figure 40A, ligne 5).

Par ailleurs, le sérum dilué au 1/500ème ne détecte pas la protéine hTD-60 dans des extraits cellulaires de HeLa (Figure 40B, ligne 1) car aucun signal n'est observé aux environs du poids moléculaire 60 kDa. De même, le sérum ne détecte pas la protéine xTD-60 dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope déposé en quantités croissantes (Figure 40B, lignes 3,4,5). Le sérum détecte la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter déposée en contrôle (Figure 40B, ligne 2).

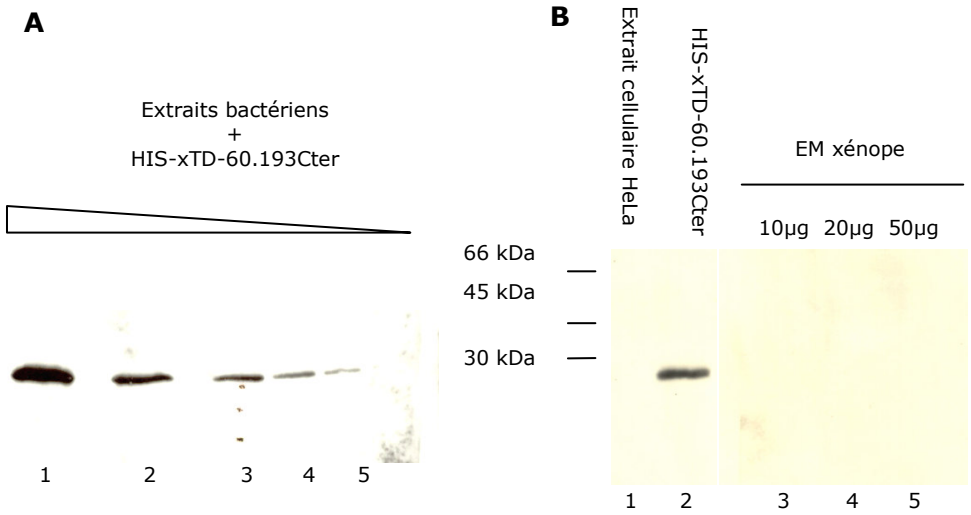


Figure 40 : Caractérisation du sérum anti-xTD-60.193Cter.

(**A**) Le sérum anti-xTD-60.193Cter dirigé contre la partie carboxy-terminale de xTD-60, homologue avec la protéine humaine hTD-60, détecte la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter purifiée et ajoutée à des extraits bactériens. Le seuil de détection du sérum anti-xTD-60.193Cter est de l'ordre de 50ng de protéine (ligne 5). (**B**) La protéine hTD-60 n'est pas détectée par ce sérum dans des extraits cellulaires de HeLa (ligne 1) et aucun signal aux environs de 56 kDa, correspondant à la protéine xTD-60, n'est observé dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope (EM) concentrés à 10µg/µl de protéines totales, (lignes 3,4,5). Le sérum anti-xTD-60.193Cter est utilisé au 1/500ème.

Le sérum anti-xTD-60.193Cter dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale commune aux protéines hTD-60 et xTD-60 ne reconnaissant pas ces protéines dans des extraits cellulaires et mitotiques, nous avons envisagé de produire un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60.

III . Production et caractérisation d'un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60

A. Clonage, expression et purification de la partie amino-terminale de xTD-60

La séquence nucléotidique codant pour la région aa1-aa160 de xTD-60 a été clonée dans le vecteur d'expression pET-M11 (Figure 41A). La souche bactérienne *Escherichia coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagène) est transformée avec la construction pET-M11-xTD-60.160Nter et les bactéries sont étalées sur milieu solide LB agar suppléé par 1 mM Kanamycine. Les clones sont prélevés et mis en culture en milieu liquide LB. 1 mM IPTG est ajouté au milieu de culture lorsque la DO_{280} atteint 0.4/0.5, afin d'induire l'expression de la protéine pendant 4 heures et à 37°C.

Le profil d'expression de la protéine recombinante HIS-xTD-60.160Nter montre que la protéine s'exprime dans des extraits bactériens induits par rapport à des extraits non induits (Figure 41B, lignes 1 et 2). Cependant la protéine reste insoluble comme la protéine HIS-xTD-60.160Nter (résultats non montrés).

Nous avons donc mené une purification dans des conditions dénaturantes en présence de 8 M d'urée, sur une colonne de nickel (Quiagen). L'élution de la protéine HIS-xTD-60.160Nter est réalisées par des concentrations croissantes d'imidazole. Les fractions concentrées en protéine pure (Figure 41C, lignes 1 à 5) sont réunies et dialysées contre du tampon PBS.

La protéine HIS-xTD-60.160Nter est injectée à un lapin suivant un plan d'immunisation de sept injections de 150 µg de protéine par semaine (collaboration avec le Dr Thierry Lorca, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier). Des prélèvements de sérum sont effectués tous

les 15 jours pendant deux mois et l'immunoréactivité du sérum est évaluée par western blot sur des extraits cellulaires et d'œufs de xénope.

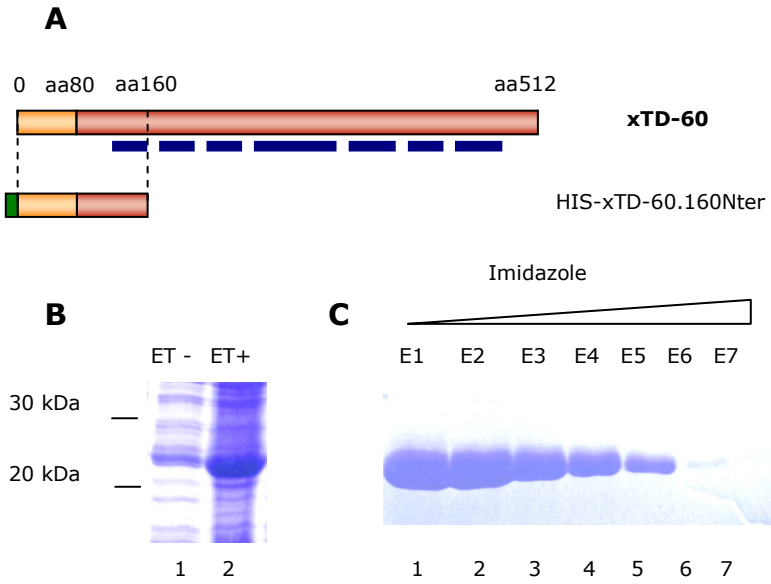


Figure 41 : Production d'un anticorps dirigé contre l'extrémité amino-terminale de xTD-60.

(**A**) Représentation schématique de la protéine recombinante HIS-xTD-60.160Nter. Les sept motifs structuraux RCC1 conservés dans la séquence de xTD-60 sont indiqués en bleu, l'extrémité amino-terminale de xTD-60 divergente de hTD-60 en jaune et l'étiquette HIS de la protéine recombinante en vert. (**B**) Expression de la protéine recombinante HIS-xTD-60.160Nter de 24 kDa dans des extraits bactériens induits (ET+) par rapport à des extraits non induits (ET-). (**C**) Profil d'élution de HIS-xTD-60.160Nter purifiée en conditions dénaturantes (8M urée) sur colonne d'affinité aux ions nickel. La protéine est éluée par des concentrations croissantes d'imidazole. Fractions d'élution E1 à E6.

B. Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.160Nter

Afin d'obtenir un anticorps purifié des autres IgG du sérum, les séra anti-xTD-60.160Nter sont immunopurifés sur une colonne d'affinité de CnBr préalablement couplée à la protéine recombinante HIS-xTD-60.160Nter. Les fractions d'élution de l'anticorps anti-xTD-60.160Nter sont suivies par Bradford et celles qui sont fortement dosées sont testées en western blot à une dilution au

1/500ème. Ces anticorps reconnaissent la protéine recombinante purifiée HIS-xTD-60.160Nter (résultats non montrés).

L'anticorps immunopurifié anti-xTD-60.160Nter détecte une seule protéine de 55 kDa environ dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope. Le signal de détection est proportionnel à la quantité d'extraits déposée (Figure 42A, lignes 1,2,3). Cet anticorps reconnaît donc la protéine xTD-60 dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope.

Nous avons testé si cet anticorps pouvait reconnaître xTD-60 dans des extraits somatiques de tissus embryonnaires (XL2) ou de reins (A6) de xénope. Une protéine de 55 kDa environ est détectée également par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter à la fois dans les cellules XL2 (Figure 42B, ligne 1) et A6 (Figure 42B, ligne 2). Nous avons immunodétecté la protéine xAurora-B en contrôle dans ces extraits cellulaires avec un anticorps anti-xAurB dilué au 1/1000ème. L'anticorps anti-xTD-60.160Nter détecte donc xTD-60 dans des extraits de cellules somatiques.

Enfin, l'anticorps anti-xTD-60.160Nter a été testé en western blot sur des extraits cellulaires de HeLa (Figure 42C, ligne 1) et de Cos (Figure 42C, ligne 2). Aucun signal aux environs de 60 kDa n'est observé alors que l'anticorps reconnaît la protéine xTD-60 dans des extraits mitotiques de xénope en contôle (Figure 42C, ligne 3). Ces résultats nous permettent de dire que l'anticorps anti-xTD-60.160Nter dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60 est spécifique de la protéine TD-60 de xénope et ne reconnaît pas la protéine humaine.

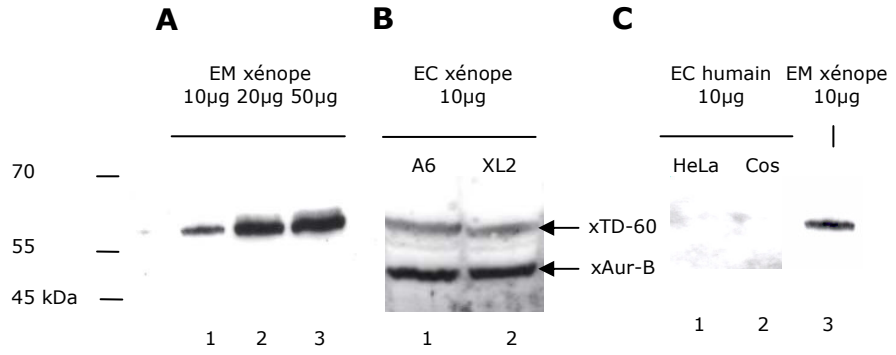


Figure 42 : Caractérisation de l'anticorps anti-xTD-60.160Nter immunopurifié.

(**A**) L'anticorps immunopurifié anti-xTD-60.160Nter, dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60, détecte la protéine xTD-60 aux environs de 55 kDa dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope (EM). Le signal de détection est proportionnel à la quantité d'extraits déposée (10, 20 et 50µg de protéines totales). (**B**) La protéine xTD-60 est également détectée dans des extraits cellulaires (EC) de reins (A6) et de tissus embryonnaires (XL2) par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter. La kinase xAurora-B est détectée en contrôle dans ces extraits cellulaires par l'anticorps anti-xAurB. (**C**) Aucun signal n'est détecté vers 60 kDa dans des extraits cellulaires de HeLa et de Cos. La protéine humaine hTD-60 n'est pas reconnue par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter dans ces extraits. Les anticorps anti-xTD-60.160Nter et anti-xAurB sont utilisés à une dilution de 1/1000ème.

IV . TD-60 et le complexe des protéines passagères

A. Analyse biochimique du complexe de protéines passagères

Des travaux ont montré que les protéines INCENP et Aurora-B co-sédimentent et forment un complexe stable dans des extraits d'œufs de xénope (Bolton, M.A. *et al.* 2002). Afin d'analyser la présence de xTD-60 au sein de ce complexe de protéines passagères, nous avons mené des expériences de sédimentation, sur gradient de glycérol, de complexes protéiques contenus dans les extraits mitotiques d'œufs de xénope.

Les extraits mitotiques sont purifiés comme décrit dans De La Barre et *al.* (1999). 400 µl d'extrait mitotique sont déposés sur 11 ml de gradient de glycérol 5-22,5 % dans le tampon EB (80 mM β-glycérophosphate pH 7.3 ; 15 mM $MgCl_2$; 20 mM EGTA ; 1 mM DTT). Le gradient est centrifugé 40 000 rpm pendant 24 heures à 4°C de manière à séparer les complexes protéiques selon

leur poids moléculaire : les complexes de haut poids moléculaire sédimentent dans les fractions du gradient à forte densité de glycérol. A l'inverse, les complexes de bas poids moléculaires sédimentent dans les fractions du gradient à faible densité de glycérol. Des fractions de 500 µl sont récupérées par ordre décroissant de densité et analysées par western blot avec les anticorps dirigés contre les protéines xINCENP, xAurora-B et xTD-60 (Figure 43).

Les protéines xINCENP et xAurora-B co-sédimentent puisqu'elles sont présentes dans les fractions 1 à 4 les plus denses du gradient. Ce résultat reflète leur interaction et leur appartenance à un même complexe protéique de haut poids moléculaire : le complexe de protéines passagères.

La protéine xTD-60 est détectée par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter dans les fractions 3 à 7. Une petite quantité de xTD-60 co-sédimente avec xINCENP et xAurora-B, dans les fractions 3 et 4. Un complexe des trois protéines passagères xINCENP, xAurora-B et xTD-60 pourrait donc exister dans les extraits mitotiques d'œufs de xénope.

En revanche, la majorité de la protéine xTD-60 est présente dans les fractions 5 à 7 de plus faible densité, ce qui suppose que la majorité de la protéine xTD-60 n'appartient pas au complexe formé par xINCENP et xAurora-B. Sur la base de ce résultat, il possible d'émettre l'hypothèse que xTD-60 remplisse des fonctions attribuées aux protéines passagères mais également d'autres fonctions cellulaires qu'il reste à découvrir.

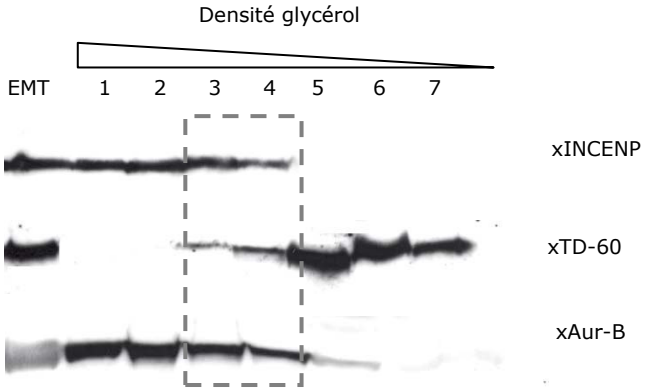


Figure 43 : Analyse biochimique par sédimentation sur gradient de glycérol des complexes de protéines passagères dans des extraits mitotiques d'oeufs de xénope.

Des extraits mitotiques d'œufs de xénope sont déposés sur un gradient de glycérol 5-22.5 % dans du tampon EB et centrifugés pendant 24 heures à 45 000 rpm. Les fractions du gradient sont récupérées par ordre décroissant de densité et analysées en western blot avec les anticorps immunopurifiés anti-xTD-60.160Nter, anti-xINCENP et anti-xAurB dilué respectivement au 1/1000ème, 1/3000ème et 1/3000ème. Les protéines xINCENP et xAurora-B co-sédimentent et sont présentes dans les mêmes fractions de forte densité (1-4), ce qui traduit leur appartenance au sein d'un même complexe. La protéine xTD-60 est détectée en faible quantité dans les fractions de haute densité (3 et 4), ce qui suppose qu'elle appartient au même complexe que xINCENP et xAurora-B. Une quantité majoritaire de xTD-60 est détectée dans les fractions de faible densité (5-7), ce qui suggère que la protéine aurait d'autres fonctions cellulaires que celles de protéine passagère.

B. Essais kinases

Les protéines passagères INCENP et Survivine sont des substrats de phosphorylation de la kinase Aurora-B (Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. 2002) (Wheatley, S.P. *et al.* 2004). Comme une partie de la protéine xTD-60 co-sédimente avec xINCENP et xAurora-B dans les extraits mitotiques de xénope, nous nous sommes demandés si xTD-60 pouvait être un substrat potentiel de la kinase mitotique Aurora-B.

a. Phosphorylation de xTD-60 par les kinases Aurora

Nous avons mené des expériences d'essais kinases sur les protéines recombinantes substrats H3, HIS-xTD-60.160Nter et HIS-xTD-60.193Cter. Les kinases utilisées sont les protéines recombinantes Aurora-A et Aurora-B

sauvages et Aurora-BKA mutée sur le résidu Lys106 et catalytiquement inactive, qui ont été produites au laboratoire (Annexe).

Les essais kinases sont réalisés dans le tampon EB en présence de 100 µM ATP et 5 µCi de γ-ATP ^{32}P pour un volume réactionnel total de 200 µl. 500 ng de protéine kinase recombinante (Aurora-A, Aurora-B, Aurora-BKA) sont mélangés avec 1 µg de substrat de phosphorylation (H3, HIS-xTD-60.160Nter, HIS-xTD-60.193Cter). Le mélange total est incubé 1 heure à 30°C. Les protéines sont ensuite précipitées à l'acide tri-chloro-acétique (TCA) 20 % final pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation de 10 min à 10 000 rpm, les protéines sont lavées dans 200 µl d'acétone-HCl 1 mM, puis 200 µl d'acétone. Le culot final est repris dans 15 µl d'urée 8 M et déposé sur gel (Figure 44).

Les kinases Aurora-A et Aurora-B sont capables de s'auto-phosphoryler en présence de γ-ATP ^{32}P et de l'histone H3, ce qui démontre que ces protéines recombinantes sont catalytiquement actives (Figure 44, lignes 1 et 2). Aurora-A et Aurora-B phosphorylent également H3 (Figure 44, lignes 1 et 2). La kinase inactive Aurora-BKA ne donne aucun signal (Figure 44, ligne 3).

En présence de HIS-xTD-60.160Nter, Aurora-A et Aurora-B s'auto-phosphorylent (Figure 44, lignes 4 et 5). Un signal de phosphorylation est observé vers 24 kDa, correspondant à la protéine HIS-xTD-60.160Nter phosphorylée (Figure 44, lignes 4 et 5). Aucun signal n'est détecté pour la kinase inactive Aurora-BKA (Figure 44, ligne 6). L'extrémité amino-terminale de xTD-60 est donc un substrat de phosphorylation des kinases Aurora-A et Aurora-B.

Aurora-A et Aurora-B sont capables de s'auto-phosphoryler en présence de HIS-xTD-60.193Cter (Figure 44, lignes 7 et 8). Nous n'observons pas de signal de phosphorylation vers 28 kDa correspondant à la protéine HIS-xTD-60.193Cter. L'extrémité carboxy-terminale de xTD-60 n'est donc pas un substrat de phosphorylation des kinases Aurora-A et Aurora-B.

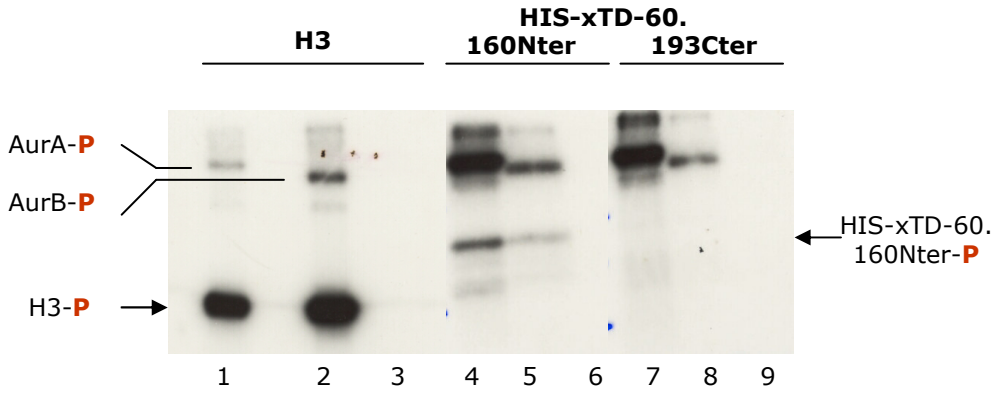


Figure 44 : Phosphorylation de xTD-60 par les kinases Aurora-A et Aurora-B.

Essais kinases réalisés avec les kinases Aurora-A (A), Aurora-B (B) et Aurora-BKA (BKA) comme enzymes et les protéines recombinantes H3 (lignes 1,2,3), HIS-xTD-60.160Nter (lignes 4,5,6) et HIS-xTD-60.193Cter (lignes 7,8,9) commes substrats de phosphorylation. Les essais kinases sont menés dans le tampon EB en présence de 100 µM ATP et 5 µCi de γ-ATP ^{32}P, pendant 1 heure à 30°C.

b.Recherche de sites de phosphorylation

La séquence amino-terminale de xTD-60 renferme plusieurs résidus sérine et thréonine potentiellement phosphorylables par les kinases Aurora. La prédiction de sites de phosphorylation pour des sérine/thréonine kinases eucaryotes (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) de l'extrémité N-ter de xTD-60 fait ressortir 5 sites potentiels de phosphorylation (Figure 45A, pics 1 à 5 et Figure 45B soulignés en vert).

Parmi ces 5 sites, un seul site à forte probabilité de phosphorylation est conservé entre les protéines xTD-60 et hTD-60 : le site $S_{38}S_{39}D_{40}E_{41}D_{42}$ contenant les sérines 38 et 39 de xTD-60 (Figure 45B souligné en rouge).

Il serait intéressant de réaliser des mutations des résidus Ser38-Ser39 et de regarder si l'extrémité amino-terminale de xTD-60 est toujours phosphorylée ou non par les kinases Aurora-A et Aurora-B.

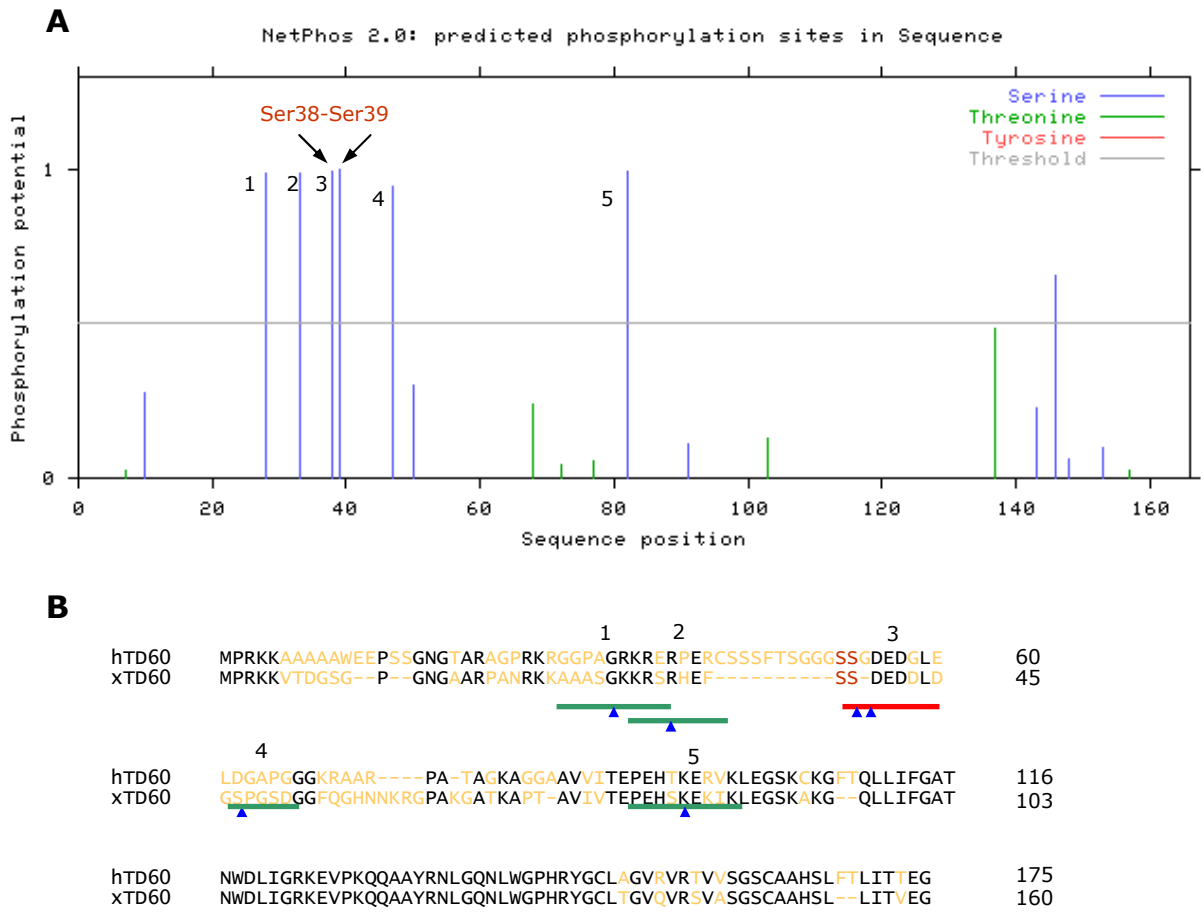


Figure 45 : Prédiction de sites de phosphorylation de l'extrémité amino-terminale de xTD-60.

(**A**) La prédiction de sites potentiels de phosphorylation dans la séquence amino-terminale de xTD-60 propose 5 sites spécifiques avec une probabilité élevée (pics 1 à 5). (**B**) La comparaison de séquence des protéines hTD-60 et xTD-60 fait apparaître un site unique conservé (souligné en rouge) parmi les 5 sites de phosphorylation à forte prédiction (soulignés en vert). Ce site renferme les résidus Ser38-Ser39. Les sérines potentiellement phosphorylées sont indiquées par un triangle bleu.

V . Profil de localisation cellulaire de xTD-60

Le fait que les kinases Aurora-A et Aurora-B phosphorylent xTD-60 dans sa partie amino-terminale et les expériences de co-sédimentation de complexes de protéines dans des extraits mitotiques d'oeufs de xénope semblent indiquer que xTD-60 n'appartiendrait pas exclusivement à la famille des protéines passagères. Elle pourrait avoir d'autres fonctions cellulaires au cours de la mitose. C'est

pourquoi nous avons voulu analyser le profil de localisation cellulaire de xTD-60. Si notre hypothèse est correcte, nous nous attendons à avoir plusieurs profils de localisation cellulaire : un profil de protéine passagère et un ou plusieurs autres profils à caractériser.

Des cellules de reins (A6) et de tissus embryonnaires (XL2) de xénope ont été cultivées en milieu L15 Leibovitz medium (GibcoBRL) complémenté par 10 % de SVF à 25°C et sans CO2. Les cellules, entre 80 et 90 % de confluence, sont traitées par 40 ng/µl de nocodazole pendant 16h de manière à enrichir la population cellulaire en métaphase de mitose. Les cellules sont ensuite fixées par 2 % de paraformaldéhyde dans le tampon PBS pendant 30 min à 37°C. La protéine xTD-60 endogène est détectée par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter dilué au 1/500ème.

En prophase et en métaphase, la protéine xTD-60 semble s'accumuler en deux endroits très localisés et diamétralement opposés (Figure 46A,B), pouvant rappeler un profil de localisation centrosomique. Nous n'avons pas détecté de localisation centromérique de xTD-60.

En anaphase, la protéine xTD-60 semble se concentrer sur une structure pouvant correspondre au futur anneau contractile (Figure 46C). Ce profil pourrait rappeler le profil de localisation d'une protéine passagère. En télophase, deux signaux de localisation en périphérie du noyau sont visibles et ne semblent pas correspondre au corps résiduel (Figure 46D). Ces signaux ne sont pas encore interprétables pour l'instant.

Ces premiers résultats restent toutefois à répéter et à confirmer par des expériences complémentaires de co-localisation afin de préciser cette localisation.

La protéine TD-60 de xénope ne semble donc pas décrire un profil de localisation typique de protéine passagère. Ces observations laissent entrevoir la possibilité pour xTD-60 d'exercer plusieurs fonctions au cours de la mitose, qu'il reste à préciser.

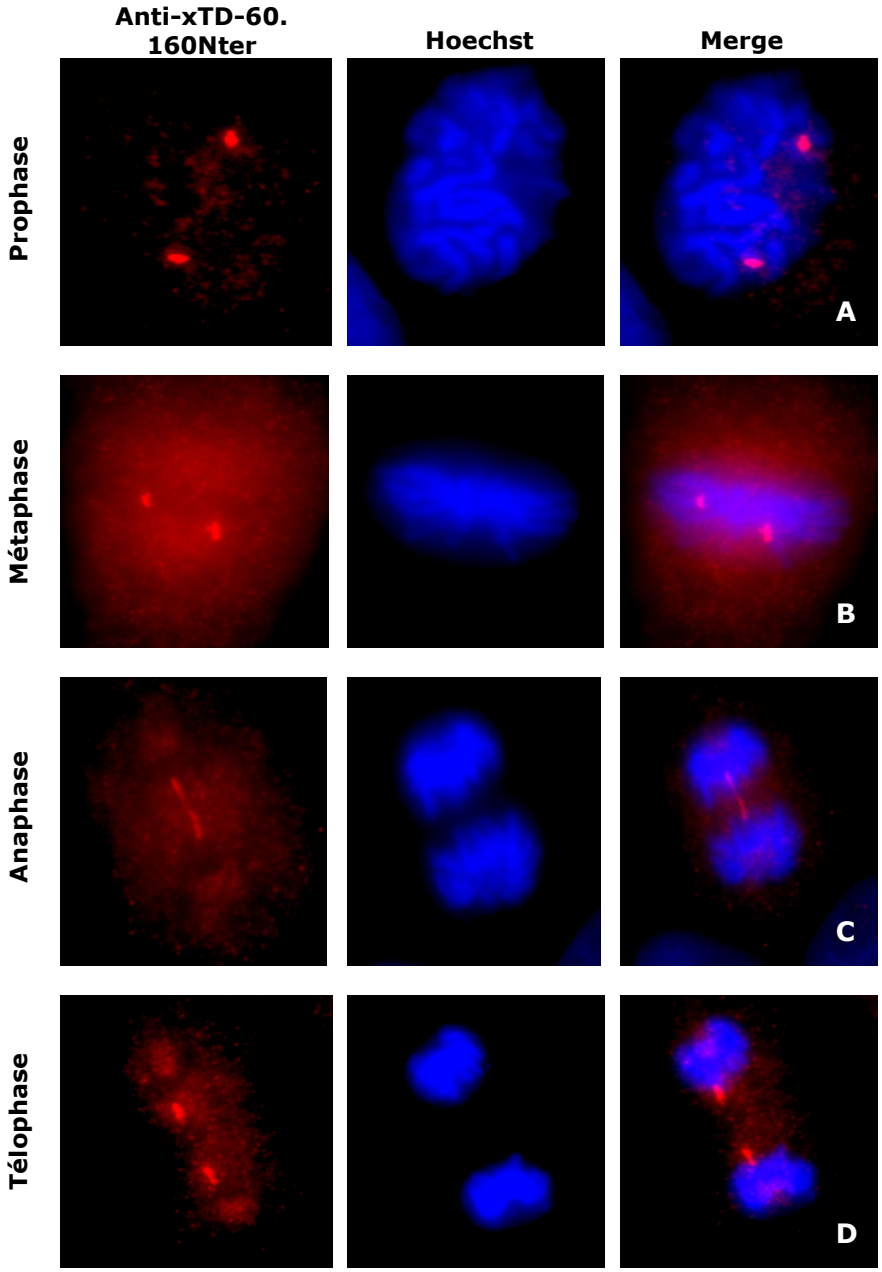


Figure 46 : Profil de localisation cellulaire de xTD-60 dans des cellules de tissus embryonnaires de xénope.

La protéine xTD-60 est détectée par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter dilué au 1/500ème dans des cellules de tissus embryonnaires de xénope (XL2) traitées au nocodazole pendant 16 heures avant immunofluorescence. L'ADN est marqué en bleu au Hoechst et xTD-60 endogène en rouge. En prophase (**A**) et en métaphase (**B**), xTD-60 semble s'accumuler dans deux endroits très localisés et diamètralement opposés. En anaphase (**C**), la protéine semble se localiser comme une protéine passagère au niveau d'une structure rappelant celle du sillon de division. En télophase (**D**), xTD-60 ne reste pas concentrée sur le corps résiduel.

DISCUSSION

Chapitre 1 : Discussion relative à l'identification des domaines fonctionnels de Aurora-A

Les kinases Aurora-A régulent le cycle cellulaire. La première partie de ces travaux a porté sur l'étude de la kinase mitotique Aurora-A. Aurora-A est principalement impliquée dans la maturation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique (Marumoto, T. *et al.* 2005). Elle adopte un profil de localisation centrosomique au cours de la mitose. De part sa séquence et sa structure tri-dimensionnelle, Aurora-A présente un très fort degré de similarité avec une autre kinase de la même famille Aurora-B. Toutefois, Aurora-B adopte le profil de localisation typique d'une protéine passagère (Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. 2004). Nous avons identifié le domaine de localisation centrosomique de Aurora-A par un système de pseudo-génétique en cellules humaines et comparé les fonctionnalités des domaines catalytiques de Aurora-A et Aurora-B.

I . Identification du domaine de localisation centrosomique de Aurora-A

En absence de Aurora-B endogène, nous avons montré que l'expression d'une protéine Aurora-A exogène permet de restaurer les défauts mitotiques observés lorsque Aurora-B est éliminée. Dans ces conditions, Aurora-A reste localisée sur les centrosomes.

Afin d'identifier le domaine de localisation centrosomique de Aurora-A, nous avons construit une série de mutants de délétion dans l'extrémité amino-terminale de Aurora-A. La délétion des 80 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale de Aurora-A n'a aucun effet sur sa localisation et sur le remplacement des fonctions de Aurora-B éliminée. En revanche, la délétion des 120 premiers acides aminés de Aurora-A entraîne une perte de localisation centrosomique. Nous avons ainsi défini un domaine de localisation centrosomique de Aurora-A compris dans la région aa80-aa120 de son extrémité amino-terminale.

Les travaux de Scrittori *et al.* (2005) ont montré qu'un mutant de Aurora-B dont l'extrémité amino-terminale est remplacée par celle de Aurora-A, renfermant la région aa80-aa120, ne se localise pas au niveau des centrosomes et garde un profil de localisation centromérique (Scrittori, L. *et al.* 2005). La région aa80-aa120 de Aurora-A ne serait donc pas suffisante pour adresser la protéine Aurora-B au niveau des centrosomes. Le « signal » centromère de Aurora-B serait ainsi dominant par rapport au « signal » centrosome de Aurora-A.

II . Localisation centromérique du domaine catalytique de Aurora-A

Nous avons observé que le mutant de délétion des 120 premiers acides aminés de Aurora-A, codant pour le domaine catalytique de Aurora-A, présente une localisation centromérique. L'information nécessaire à la localisation des protéines Aurora-A et Aurora-B au niveau des centromères est donc détenue par le domaine catalytique.

Scrittori et *al.* (2005) ont identifié une courte séquence de 7 acides aminés dans l'extrémité carboxy-terminale du domaine catalytique de Aurora-B, impliquée dans la localisation centromérique et les fonctions mitotiques de Aurora-B. La séquence VRANSRR (aa326-aa333) de Aurora-B correspond à la séquence partiellement conservée ITANSSK (aa383-aa389) de Aurora-A. Afin de confirmer ce résultat, un mutant du domaine catalytique de Aurora-A contenant la séquence VRANSRR de Aurora-B a été construit. L'analyse de son profil de localisation dans notre système de pseudo-génétique est en cours au laboratoire.

III . Fonctionalités des domaines catalytiques de Aurora-A et Aurora-B

En absence de Aurora-B, nous avons montré que le mutant de délétion des 120 premiers acides aminés de Aurora-A, codant pour le domaine catalytique de Aurora-A, se localise exclusivement au niveau des centromères en début de mitose. Il n'est cependant pas capable de migrer vers le sillon de division en

anaphase. Ce résultat nous indique que le domaine catalytique de Aurora-A n'est pas capable de se transférer des centromères vers le sillon de division et d'assurer les fonctions mitotiques de Aurora-B alors que le domaine catalytique de Aurora-B peut le faire (Scrittori, L. *et al.* 2005). Le domaine catalytique de Aurora-B doit donc contenir une information supplémentaire à celui de Aurora-A qui lui permet d'être transférée. Cette information doit être localisée dans des régions divergentes entre les domaines catalytiques de Aurora-A et Aurora-B. Elles correspondraient à des régions impliquées dans des interactions avec des partenaires de Aurora-B.

Il a été montré que la kinase Aurora-B interagit avec les protéines INCENP et Survivine au sein d'un complexe de protéines passagères (Wheatley, S.P. *et al.* 2001) (Bolton, M.A. *et al.* 2002). La protéine INCENP de part sa structure pourrait intervenir en qualité de protéine « cargo » dans ce complexe, afin de cibler ses partenaires des centromères en métaphase vers le sillon de division en anaphase. Des données cristallographiques récentes ont permis de caractériser l'interaction entre INCENP et Aurora-B (Sessa, F. *et al.* 2005).

Il apparaît que sur les 33 acides aminés du domaine catalytique de Aurora-B en contact direct avec INCENP, 17 sont conservés dans le domaine catalytique de Aurora-A, 5 sont de même famille et 11 sont différents (Figure 47). Les acides aminés diffèrent principalement par la présence ou l'absence de groupements fonctionnels indispensables à l'interaction stable avec INCENP. Aurora-A ne possédant pas ces groupements fonctionnels, elle ne peut pas interagir avec INCENP.

Il serait intéressant d'introduire les acides aminés du domaine catalytique de Aurora-B impliqués dans l'interaction avec INCENP, dans le domaine catalytique de Aurora-A. Inversement, il serait intéressant de remplacer les acides aminés du domaine catalytique de Aurora-B impliqués dans l'interaction avec INCENP par les acides aminés de Aurora-A trouvés à ces positions. L'analyse des profils de localisation des protéines chimères obtenues permettrait d'identifier les acides aminés impliqués dans le transfert de Aurora-B du centromère au sillon de division à la transition métaphase/anaphase, *via* l'interaction avec INCENP.

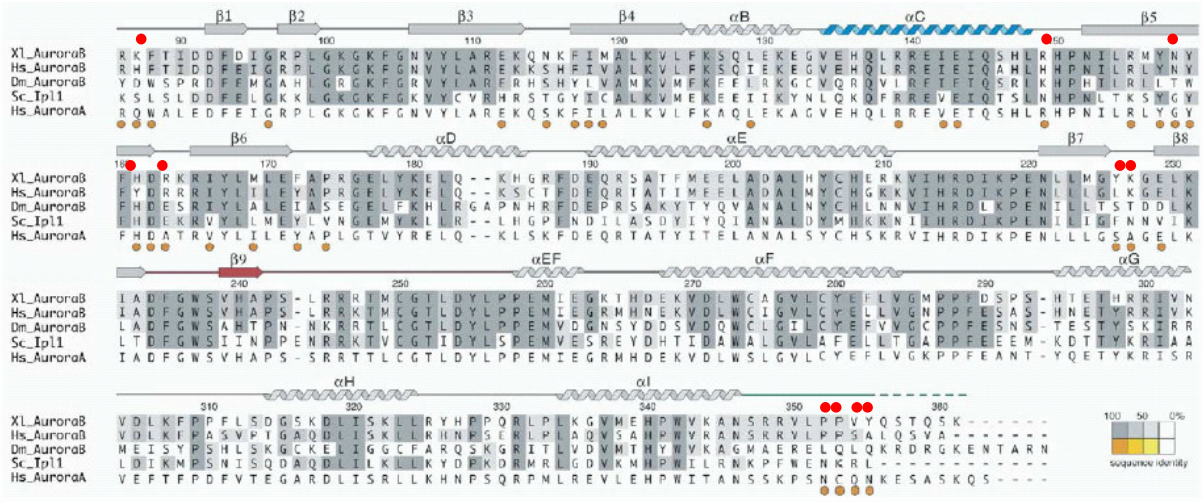


Figure 47 : Les acides aminés impliqués dans l'interaction de Aurora-B avec INCENP.

(**A**) Comparaison de séquences des protéines Aurora-B codées par différents organismes et de la protéine Aurora-A. Les points rouges correspondent aux acides aminés impliqués dans l'interaction de Aurora-B avec INCENP et non conservés dans la séquence de Aurora-A (Sessa, F. *et al.* 2005).

Chapitre 2 :Discussion relative à TD-60

Grâce à un anticorps auto-immun mitose-spécifique, la protéine humaine hTD-60 a été caractérisée comme appartenant à la famille des protéines passagères (Andreassen, P.R. *et al.* 1991). Afin de préciser le rôle de cette protéine dans la régulation du cycle cellulaire, ces travaux de thèse ont porté dans un deuxième temps sur l'identification et la caractérisation de son homologue xTD-60 chez le xénope.

I . Analyse de la séquence de xTD-60

A l'aide de la séquence de hTD-60, nous avons tout d'abord cloné la séquence de xTD-60 (Mollinari, C. *et al.* 2003). Les deux séquences présentent un pourcentage d'identité de l'ordre de 98 %. Les prédictions de structure montrent que la protéine xTD-60 présente les 7 mêmes motifs structuraux de type RCC1 que son homologue humaine hTD-60 (Mollinari, C. *et al.* 2003). Toutefois, l'extrémité amino-terminale (aa1-aa73) de xTD-60 diffère fortement de celle de hTD-60 et semble dépourvue de structures secondaires.

La séquence de l'homologue de souris mTD-60 a récemment été identifiée. Elle semble posséder les mêmes caractéristiques structurales que les protéines hTD-60 et xTD-60. L'extrémité amino-terminale (aa1-aa79) présente la même divergence que xTD-60 vis-à-vis de hTD-60 (Figure 48). La protéine TD-60 semble donc extrêmement bien conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes supérieurs, ce qui reflète très probablement l'importance des fonctions qu'elle exerce au cours de la mitose.

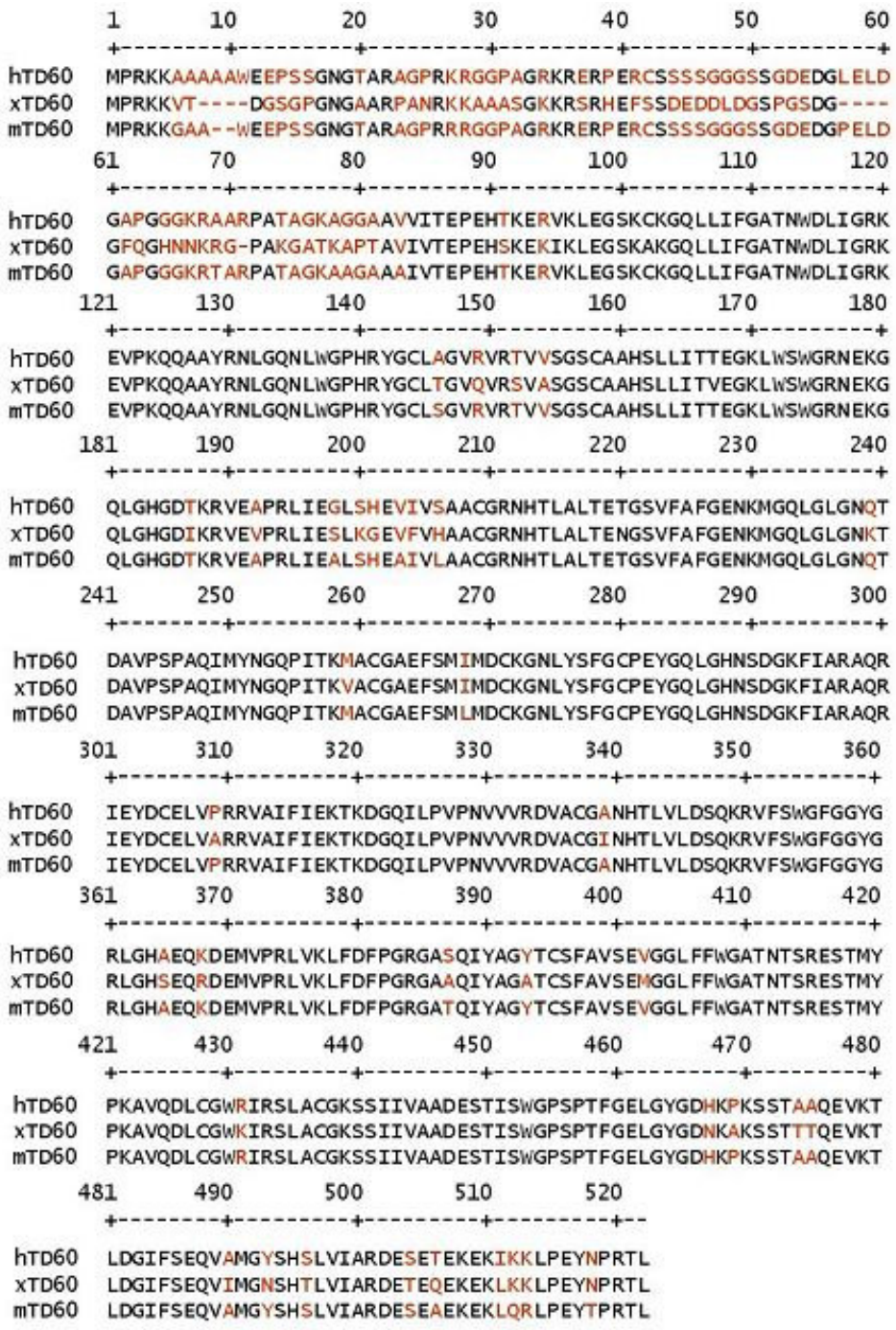


Figure 48 : Comparaison de séquences des protéines TD-60 humaine, murine et de xénope.

La comparaison des séquences des protéines hTD-60, mTD-60 et xTD-60 fait apparaître une forte homologie entre elles. Les acides aminés identiques sont indiqués en noir, les acides aminés divergents en rouge (extrémité amino-terminale).

Afin de caractériser la protéine xTD-60 dans les extraits mitotiques d'œufs de xénope et dans des extraits de cellules somatiques de xénope, nous avons entrepris de produire plusieurs anticorps dirigés contre xTD-60.

II . Caractérisation des anticorps dirigés contre xTD-60

A. Le sérum anti-xTD-60.193Cter

Le sérum anti-xTD-60.193Cter dirigé contre la partie carboxy-terminale de xTD-60 reconnaît parfaitement la protéine recombinante HIS-xTD-60.193Cter mais n'est pas capable de détecter xTD-60 dans ces extraits. Ce sérum ne détecte pas non plus la protéine hTD-60 dans des extraits cellulaires de HeLa.

La région aa320-aa512 de xTD-60 contre laquelle est dirigée le sérum anti-xTD-60.193Cter contient les motifs structurés RCC1-5, -6 et -7 ainsi que 17 acides aminés (aa320-aa337) appartenant à l'extrémité carboxy-terminale du motif RCC1-4 (Figure 38) (Mollinari, C. *et al.* 2003). Comme c'est le cas pour la protéine RCC1 (Renault, L. *et al.* 1998), il est possible que ces motifs se trouvent en position interne de la structure tertiaire hélicoïdale de la protéine. Ils seraient donc inaccessibles aux anticorps du sérum anti-xTD-60.193Cter (Figure 49).

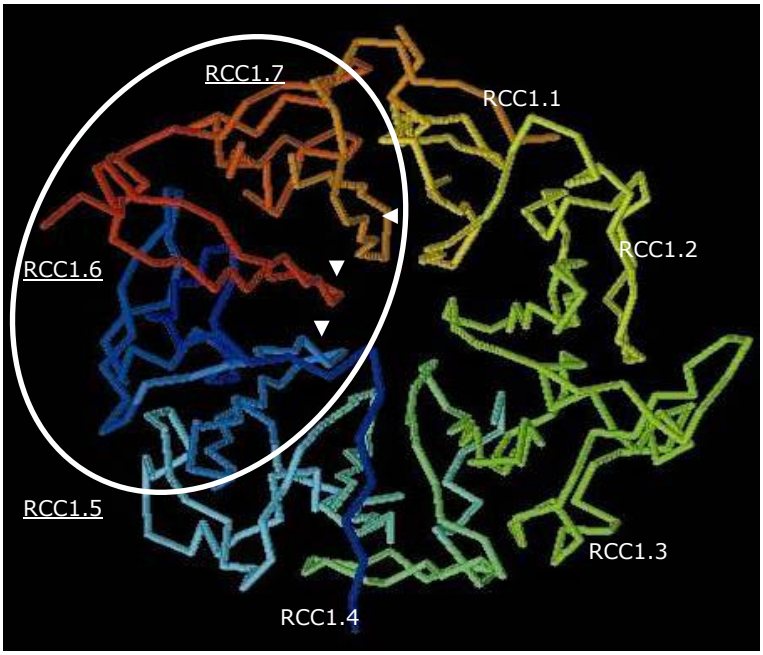


Figure 49 : Régions des motifs structurés de type RCC1 potentiellement reconnues par le sérum anti-xTD-60.193Cter.

Les sept motifs structuraux de RCC1, sont représentés par différentes couleurs. Les motifs RCC1-5, -6, -7 au sein desquels sont localisés les épitopes reconnus par le sérum anti-xTD-60.193Cter sont entourés. Les régions internes probablement inaccessibles pour les anticorps sont indiquées par des flèches blanches. Modélisation par le programme Rasmol d'après PDB ID : 1A12.

B. L'anticorps anti-xTD-60.160Nter

Nous avons dans un second temps produit et immunopurifié un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de xTD-60. Nous avons montré que l'anticorps anti-xTD-60.160Nter reconnaît la protéine xTD-60 dans des extraits mitotiques d'œufs de xénope et également dans des extraits cellulaires de reins (A6) et de tissus embryonnaires (XL2) de xénope.

Les 80 premiers acides aminés de la séquence de TD-60 étant très divergents d'un organisme eucaryote à l'autre, il est possible que cette séquence soit très peu structurée et pointe en dehors de la structure confinée de l'hélice, formée par les 7 motifs de type RCC1. Elle serait donc plus accessible à l'anticorps anti-xTD-60.160Nter.

D'autre part, nous avons observé que l'anticorps anti-xTD-60.160Nter ne détecte pas la protéine hTD-60 dans des extraits cellulaires de HeLa et de Cos. L'anticorps est dirigé contre la séquence aa1-aa160 de xTD-60 qui renferme la

séquence aa80-aa160 commune avec hTD-60. Cette séquence contient partiellement le motif RCC1-1 (Figure 38, Figure 41). Il est probable que la séquence aa80-aa160 commune soit localisée dans une région masquée de la structure globale de la protéine et inaccessible à l'anticorps anti-xTD-60.160Nter.

III . TD-60 : une protéine passagère uniquement ?

A. xTD-60 et le complexe de protéines passagères INCENP/Aurora-B

Il a été décrit que les protéines passagères interagissent au sein de plusieurs complexes protéiques (Wheatley, S.P. *et al.* 2001) (Bolton, M.A. *et al.* 2002) (Sampath, S.C. *et al.* 2004) (Gassmann, R. *et al.* 2004). Avec l'anticorps anti-xTD-60.160Nter, nous avons regardé si xTD-60 appartenait au complexe de protéines passagères INCENP et Aurora-B. Nous avons mené des expériences de co-sédimentation de complexes protéiques d'extraits d'œufs de xénope sur gradient de glycérol. Nous avons observé qu'une faible quantité de protéine xTD-60 co-sédimente avec xINCENP et xAurora-B, ce qui montre que TD-60 semble capable d'interagir avec les partenaires du complexe INCENP/Aurora-B (Figure 43). Toutefois, la quantité majoritaire de protéine qui ne co-sédimente pas avec INCENP et Aurora-B laisse présager que xTD-60 aurait d'autres fonctions cellulaires que celles de protéine passagère.

B. La phosphorylation de l'extrémité amino-terminale de xTD-60

Au sein du complexe de protéines passagères, la kinase Aurora-B phosphoryle à la fois INCENP dans son extrémité amino-terminale (Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. 2002) et la Survivine (Wheatley, S.P. *et al.* 2004). Nous nous sommes demandés si Aurora-B pouvait également phosphoryler TD-60, puisque d'après nos résultats, ces deux protéines semblent appartenir à un même complexe. Nous avons mené des essais kinase sur les protéines recombinantes HIS-xTD-60.160Nter et HIS-xTD-60.193Cter correspondant

respectivement aux extrémités amino- et carboxy-terminale de xTD-60. Nous avons observé que seule l'extrémité amino-terminale de xTD-60 est phosphorylée par Aurora-B. La kinase Aurora-A est également capable de phosphoryler l'extrémité amino-terminale de xTD-60 (Figure 44).

Nous avons recherché un site potentiel de phosphorylation dans l'extrémité amino-terminale de xTD-60. Le site $S_{38}S_{39}D_{40}E_{41}D_{42}$ contenant les sérines 38 et 39 de xTD-60 semble être un site à forte probabilité de phosphorylation par des sérine/thréonine kinases eucaryotes (Figure 45). Il est conservé entre les protéines xTD-60 et hTD-60 et également dans la protéine mTD-60.

C. Profil de localisation de xTD-60 dans des cellules de xénope

En se basant sur l'hypothèse que la protéine xTD-60 pourrait avoir d'autres fonctions cellulaires que celles associées aux protéines passagères, nous avons étudié le profil de localisation de la protéine xTD-60 au cours de la mitose, dans des cellules de tissus embryonnaires de xénope (XL2), avec l'anticorps anti-xTD-60.160Nter. Nous avons observé que xTD-60 semble s'accumuler en deux endroits très localisés et diamétralement opposés dans la cellule en prophase et en métaphase. En anaphase, xTD-60 se localise au niveau d'une structure qui rappelle celle du sillon de division. En télophase, deux signaux distincts sont visibles en périphérie des noyaux sans pour autant correspondre au corps résiduel. Aucune localisation centromérique n'a été observée. Il apparaît donc que xTD-60, détectée avec l'anticorps anti-xTD-60.160Nter, ne montre pas un profil de localisation typique d'une protéine passagère (Figure 46).

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats présentés dans la littérature jusqu'à présent et qui associent à TD-60 un profil de protéine passagère (Andreassen, P.R. *et al.* 1991) (Andreassen, P.R. *et al.* 1997) (Mollinari, C. *et al.* 2003). Dans ces travaux, la protéine TD-60 humaine a été étudiée avec un anticorps immunopurifié à partir d'un sérum auto-immun mitose-spécifique (JH)(Andreassen, P.R. *et al.* 1991).

Au cours de la mitose, de nombreuses modifications post-traductionnelles des protéines ont lieu, notamment des phosphorylations. Il est probable que la

protéine TD-60 soit phosphorylée pendant la mitose et que l'anticorps JH reconnaisse un phospho-épitope. TD-60 phosphorylée aurait alors un profil de localisation de protéine passagère et des fonctions associées. Une hypothèse serait que notre anticorps anti-xTD-60.160Nter reconnaisse la protéine TD-60 non phosphorylée qui ne possède pas le profil de localisation de protéine passagère. Afin de valider cette hypothèse, il serait nécessaire de produire un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de hTD-60. Nous pourrions ainsi comparer les profils de localisation des protéines hTD-60 et xTD-60 par rapport à celui obtenu par l'anticorps JH. De même, il serait intéressant de savoir si l'anticorps JH reconnaît la protéine xTD-60. Si tel est le cas, cette protéine présenterait-t-elle un profil de localisation de protéine passagère dans des extraits cellulaires de xénope.

IV . Modèle de dynamique de localisation de TD-60

Les travaux de Hutchins et *al.* (2004) montrent que RCC1 est phosphorylée. En fonction de cette phosphorylation, la protéine adopte des profils de localisation différents. Lorsqu'elle est phosphorylée, RCC1 interagit avec la chromatine (Figure 50). Nous pouvons envisager un modèle de dynamique de localisation de TD-60 au cours de la mitose similaire à celui de la protéine RCC1 (Hutchins, J.R. *et al.* 2004). En début de mitose, TD-60 serait phosphorylé par Aurora-B ou par une autre kinase, dans son extrémité amino-terminale et pourrait interagir avec la chromatine grâce aux 7 motifs structuraux de type RCC1 organisés en hélice. L'anticorps JH détectant des épitopes spécifiques de la mitose, détecterait TD-60 lorsqu'elle est localisée sur les chromosomes en début de mitose. Si l'on suggère que TD-60 possède une activité GEF pour une GTPase, comme c'est le cas de RCC1, la concentration locale au niveau de la chromatine en GTPase sous forme associée au GTP augmentera. Ce processus entraînerait la délocalisation de TD-60 des chromosomes vers d'autres régions cellulaires où elle serait déphosphorylée en présence des protéines phosphatases et exercerait d'autres fonctions que celles associées à la chromatine.

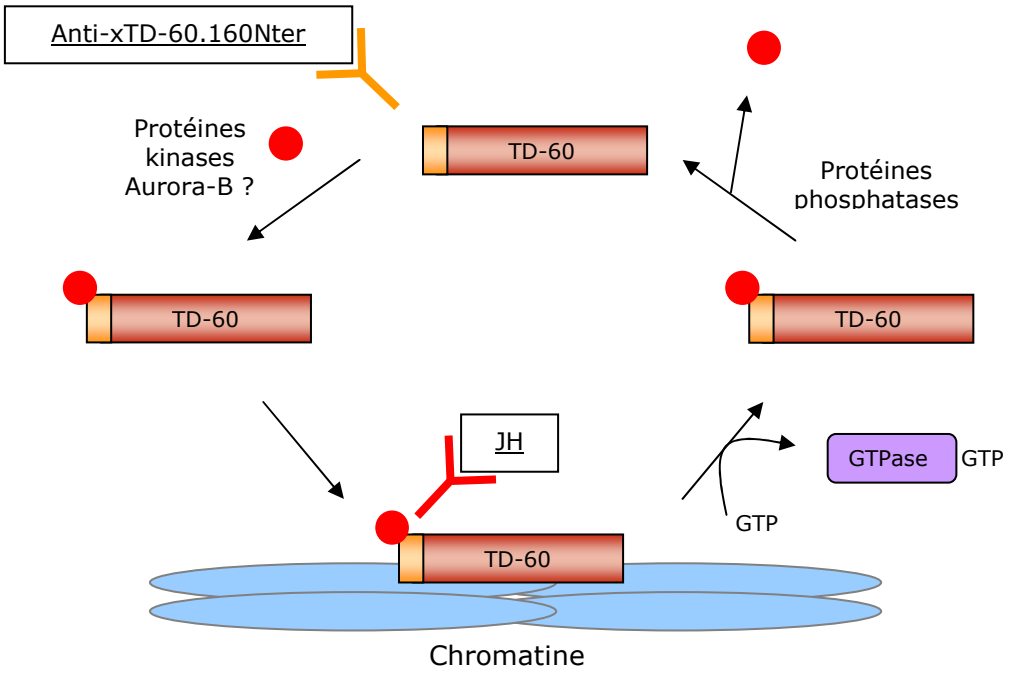


Figure 50 : Modèle de dynamique de localisation de TD-60.

Schéma suggérant la dynamique de localisation de TD-60 au cours de la mitose. En début de mitose, TD-60 est phosphorylée par une protéine kinase (qui pourrait être la kinase mitotique Aurora-B). TD-60 se lie à la chromatine par l'intermédiaire de ces motifs répétés de types RCC1. Cette forme phosphorylée est reconnue par l'anticorps JH. Le gradient de GTPase sous forme GTP à proximité de la chromatine et généré par la fonction supposée GEF de TD-60 délocaliserait TD-60 dans toute la cellule. Elle serait alors déphosphorylée par les phosphatases cellulaires. La forme déphosphorylée est reconnue par l'anticorps anti-xTD-60.160Nter. La phosphorylation est représentée par un rond rouge (Hutchins, J.R. *et al.* 2004).

Avec les outils que nous disposons actuellement, il serait intéressant de confirmer ou non cette hypothèse. Il serait également intéressant de continuer la caractérisation des fonctions de TD-60 au cours du cycle cellulaire.

ANNEXE

Travaux de purification et de cristallisation des kinases Aurora

Les kinases Aurora étant impliquées dans de nombreux processus de tumorigénèse (Giet, R. *et al.* 2005), la connaissance de leur structure tri-dimensionnelle permettrait, dans un but thérapeutique, de caractériser des inhibiteurs spécifiques de Aurora-A et de Aurora-B à long terme. Au cours de mon DEA et de ma première année de thèse, j'ai mené des travaux visant à étudier la structure tri-dimensionnelle de ces kinases. Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration avec le Docteur Christoph Müller (EMBL, Grenoble).

I . Clonage et expression des protéines recombinantes Aurora

J'ai cloné les gènes codant pour les protéines Aurora-A (AurA) et Aurora-B (AurB) humaines ainsi que pour le domaine catalytique de Aurora-A (AurADK) dans le vecteur d'expression bactérienne pET-M11 que nous a fourni le Docteur Christoph Müller. Les protéines recombinantes HIS-AurA, HIS-AurB et HIS-AurADK possèdent une étiquette HIS en amino-terminal permettant leur purification.

Plusieurs souches bactériennes ont été testées afin d'exprimer ces protéines. Les protéines recombinantes HIS-AurA, HIS-AurADK et HIS-AurB n'ont pu s'exprimer de façon soluble que dans la souche d'*Escherichia coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagène).

La totalité des clones obtenus sur boite est prélevée et ensemencée à 37°C dans 500 ml de milieu LB en présence de Kanamycine (100 µg/ml), Chloramphénicol (34 µg/ml) et glucose 4 % (w/v). Lorsque la préculture atteint une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 1 à 1.5, elle est utilisée pour ensemencer 5 L de milieu. L'induction de l'expression des protéines se fait par ajout d'IPTG (500 µM), lorsque la DO_{600} atteint la phase exponentielle de croissance (0.5 à 0.7). Puis, les cultures bactériennes sont maintenues à 12°C pendant environ 20 heures.

II . Purification des protéines recombinantes Aurora par chromatographie d'affinité

Les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 5 000 rpm à 4°C. Les culots bactériens sont repris dans 10 ml de tampon de lyse pour 1 L de culture (100 mM tampon Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 % glycérol, 2.5 mM β-mercaptoéthanol) additionné de deux tablettes de "EDTA free complete" (inhibiteurs de protéases, ROCHE) sur la nuit à 4°C. Après sonication à 4°C par 5 à 6 pulses de 30 sec à 30 sec d'intervalles et centrifugation de 50 minutes à 20 000 rpm à 4°C, l'extrait protéique contenu dans le surnageant est mis en contact 2 heures, en agitation permanente, avec 5 ml de résine de Nickel préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Les protéines recombinantes HIS-AurA, HIS-AurB et HIS-AurADK sont purifiées sur une colonne constituée d'ions Nickel Ni^{2+}, qui présentent une forte affinité pour les résidus histidine. La colonne activée est lavée par deux passages successifs de tampon de lavage (50 mM tampon Tris HCl pH 8, 20 mM imidazole, 10 % glycérol) contenant des concentrations décroissantes de sel (1M puis 250 mM de NaCl) de façon à éluer toutes les protéines bactériennes qui n'ont pas d'affinité avec le Nickel. La protéine recombinante recombinante est éluée par passage d'un tampon concentré en imidazole (50 mM tampon Tris HCl pH 8, 250 mM NaCl, 250 mM imidazole) et des fractions de 1.5 ml sont collectées. Un test de Bradford est réalisé en parallèle sur chaque fraction d'élution. 10 µl de chaque fraction sont analysés sur gel SDS-PAGE et les fractions enrichies en protéine d'intérêt sont réunies (Figure 51).

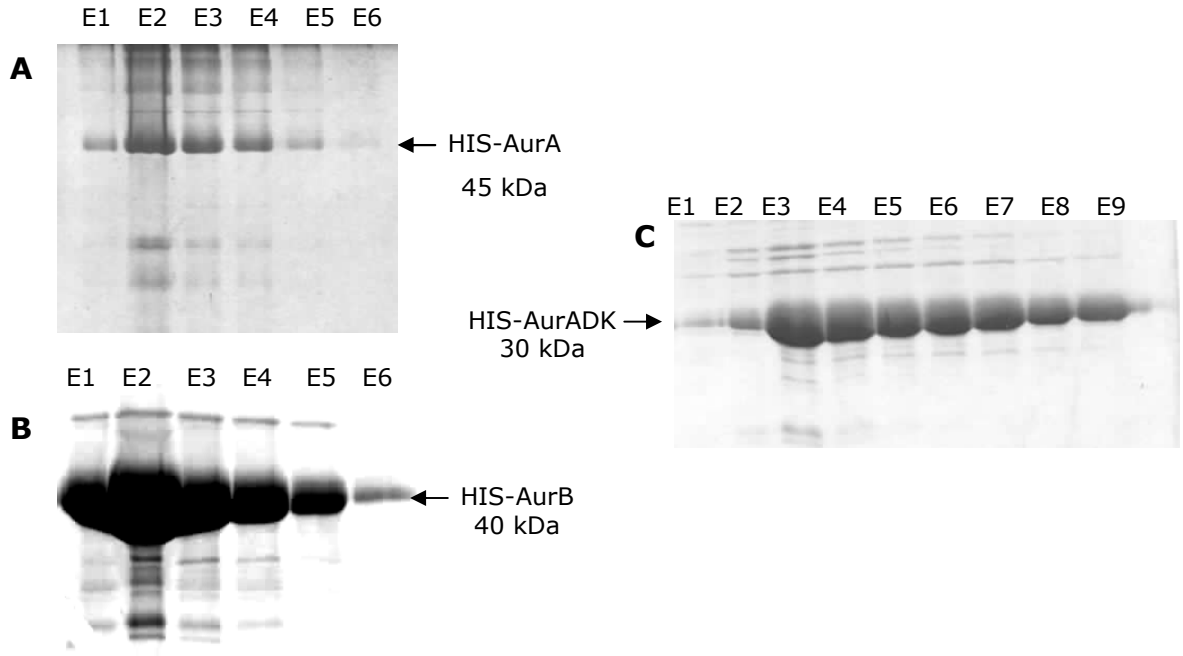


Figure 51 : Profil d'élution des protéines recombinantes HIS-AurA (A), HIS-AurB (B) et HIS-AurADK (C) purifiées sur colonne d'affinité Ni^{2+}.

III . Purification des protéines recombinantes Aurora par FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

Les protéines recombinantes HIS-AurA, HIS-AurB, HIS-AurADK co-éluant avec de nombreux contaminants bactériens (Figure 51), il est nécessaire de réaliser une seconde purification par chromatographie liquide à performance rapide (FPLC), afin de mener des essais de cristallogenèse sur des protéines pures.

A. Concentration des protéines recombinantes

Après purification sur colonne de Nickel, les protéines HIS-AurA et HIS-AurADK sont trop peu concentrées (1 à 5 mg/ml) pour être purifiée sur colonne de gel filtration directement. De plus, elles sont dans un tampon d'élution contenant une forte concentration d'imidazole qui entraîne une importante précipitation des protéines.

Les protéines HIS-AurA et HIS-AurADK sont dialysées contre le tampon d'élution sans imidazole et contenant des concentrations croissantes de NaCl entre 150 et 300 mM. J'ai ainsi constaté que la protéine Aurora-A ne précipite pas ou très peu lorsqu'elle est dialysée contre un tampon contenant 250 mM ou 300 mM de NaCl, alors qu'elle précipite davantage à des concentrations salines plus faibles.

De même, la protéine HIS-AurB précipite fortement et est très peu stable lorsqu'elle est dialysée. Je n'ai pu poursuivre les expériences de concentration sur la protéine HIS-AurB du fait de son instabilité.

Les protéines HIS-AurA et HIS-AuADK dialysées sont concentrées à 4°C sur filtre ultrafree 15 ml (Millipore, cut off 10 kDa) par centrifugation à 10 000 rpm, jusqu'à un volume de 500 µl à 1 ml. Il a été possible de concentrer la protéine HIS-AurADK jusqu'à 20 mg/ml à 150 mM NaCl sans observer de précipitation. La protéine HIS-AurA n'a pas pu être concentrée au-delà de 10 mg/ml à 150 mM NaCl à cause d'une forte précipitation. La protéine Aurora-A semble donc d'autant plus sensible à la teneur en NaCl qu'elle possède son extrémité amino-terminale.

B. Purification des protéines HIS-AurA et HIS-AurADK sur colonne de gel filtration

500 µl d'échantillon protéique concentré entre 10 et 20 mg/ml sont déposés sur une colonne de chromatographie Superdex 200 (Pharmacia Biotech), ayant un pouvoir séparateur de 10 à 600 kDa et préalablement équilibrée avec le tampon de gel filtration (20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM DTT). Les protéines recombinantes sont éluées à raison de 1 ml/minute et des fractions de 500 µl sont récoltées, analysées par SDS-PAGE et conservées à 4°C.

Le profil général d'élution obtenu est identique pour les protéines HIS-AurA et HIS-AurADK (Figure 52). Il présente un seul pic d'élution et une électrophorèse en conditions dénaturantes des différentes fractions d'élution met en évidence la présence des protéines recombinantes purifiées. Nous pouvons observer la présence de quelques contaminants protéiques résiduels de poids moléculaires inférieurs.

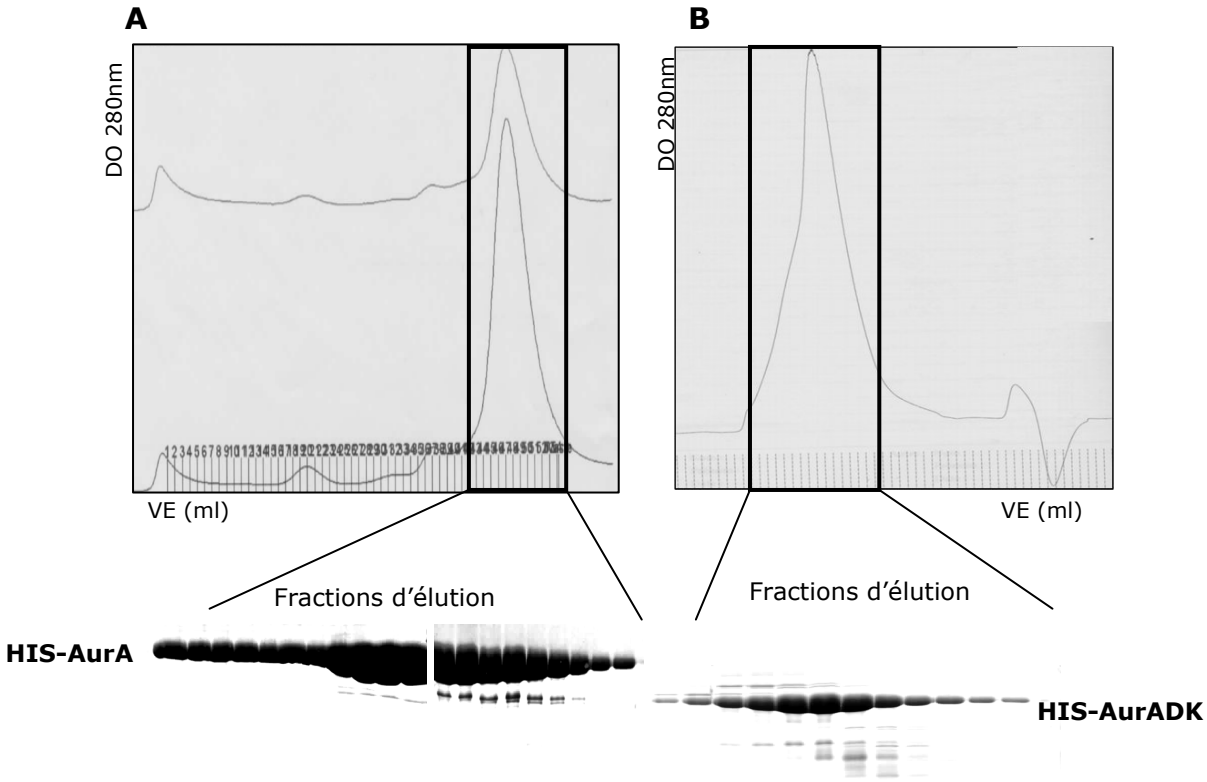


Figure 52 : Profil d'élution des protéines HIS-AurA (A) et HIS-AurADK (B) sur colonne Superdex 200 et analyse par SDS-PAGE des fractions d'élution.

IV . Essais de cristallographie de la protéine Aurora-A et de son domaine catalytique

Afin d'effectuer des expériences de cristallogénèse, nous avons concentré les protéines HIS-AurA et HIS-AurADK jusqu'à des concentrations de 10 et 20 mg/ml respectivement.

A. Cristallogenèse : principe

Les essais de cristallisation sont entrepris par la méthode de diffusion de vapeur (« hanging drop » ou goutte pendante). Une goutte de solution protéique est suspendue sur une lamelle au-dessus d'un réservoir contenant une solution de cristallisation. Chaque solution testée a une composition unique de sel, de tampon et d'agent précipitant. Un volume de 1 ml de solution de cristallisation

est placé dans le réservoir et la goutte contient 1 µl de solution protéique concentrée et 1 µl de solution de cristallisation. La teneur en agent précipitant dans la goutte s'équilibre avec celle du précipitant contenu dans le réservoir par des échanges gazeux, ce qui permet de concentrer lentement la protéine dans la goutte et initier ainsi la cristallisation. Les boîtes sont stockées à 18°C et observées au microscope photonique tous les deux jours.

Au cours de ces travaux, j'ai eu la possibilité de travailler avec le robot de cristallisation de l'Institut de Biologie Structurale (Grenoble). Ce robot permet de tester près de 600 conditions différentes de cristallisation en moins de 6 heures.

B. Obtention de cristaux du domaine catalytique de Aurora-A

J'ai entrepris des essais de cristallogenèse par la technique des gouttes suspendues sur les protéines HIS-AurA et HIS-AurADK purifiées et concentrées à 10 et 20 mg/ml. J'ai testé de nombreuses conditions de tampons et détergents différents (kits de cristallisation Screen Ammonium sulfate, Screen MPD, PEG 6000, Crystal Screen I et II, Crystal Screen Lite et PEG ion de Hampton Research). Ces essais de cristallogenèse on été menés en présence de 5 mM AMP-PNP (un analogue de structure non hydrolysable de l'ATP) et 5 mM $MgCl_2$ de manière à stabiliser les protéines. Le peptide QTARKS_{10}TGGK correspondant à la séquence de l'histone H3 autour du résidu Ser10 phosphorylé par les kinases Aurora a été synthétisé et utilisé à des concentrations de 50 à 200 mM, également dans un but de stabilisation de la structure tri-dimensionnelle de Aurora-A et de son domaine catalytique.

L'observation des gouttes après 48 heures montre de nombreux précipités amorphes, marron et noir, pour la plupart des solutions de cristallisation testées. Les essais réalisés en présence de PEG (polyethylene glycol), de sulfate d'ammonium et de MPD (2-méthyl-2,4-pentanediol) laissent les gouttes limpides, sans aucun agrégat.

Aucun cristal n'a été observé pour la protéine HIS-AurA. Une vingtaine de cristaux ont été obtenus pour la protéine HIS-AurADK concentrée à 10 mg/ml en présence de 5 mM AMP-PNP et 5 mM MgCl2 dans 25 % ethylène glycol (v/v) (figure 3A). Ces cristaux ont une forme de bouton hexagonal et mesurent 100

µm de côté. J'ai également observé d'autres formes cristallines lors de l'utilisation du robot de cristallisation de l'Institut de Biologie Structurale (figure 3B). Ces structures cristallines sont très irrégulières : l'axe de progression de croissance semble être interrompu dans une direction pour reprendre ensuite dans une autre. La protéine HIS-AurADK produit ce genre de structures en présence et en absence du peptide mimant l'histone H3 dans le tampon 0.2 M $NH_4H_2PO_4$ pH 7.9, 20 % PEG 3350.

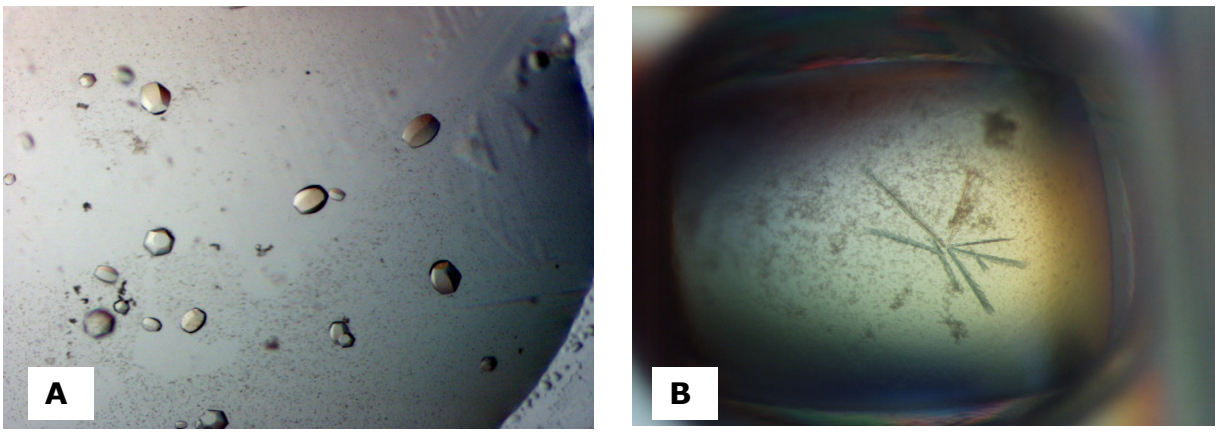


Figure 53 : Cristaux de HIS-AurADK obtenus par la méthode de diffusion de vapeur (hanging drop).

La protéine HIS-AurADK, concentrée à 10 mg/ml, forme des cristaux dans une solution de 25 % ethylène glycol (**A**) et des structures cristallines irrégulières dans la solution 0.2 M $NH_4H_2PO_4$ pH 7.9, 20 % PEG 3350 (**B**). Les essais de cristallisation ont été menés en présence de 5 mM AMP-PNP et 5 mM $MgCl_2$.

Des expériences de diffraction aux rayons X ont été entreprises sur les cristaux présentés dans la figure 3A au Synchrotron de Grenoble. Nous avons pu obtenir des clichés de diffraction et mesurer plusieurs jeux de données. Leur analyse ne nous a toutefois pas permis d'obtenir une résolution de la structure tri-dimensionnelle du domaine kinase de la protéine Aurora-A au delà de 3Å.

Parallèlement à mes travaux, la structure du domaine catalytique de Aurora-A humaine a été caractérisée par les groupes Cheetham et *al.* (2002) et Nowakowski et *al.* (2002) à une résolution de 2.9 et 1.9 Å respectivement. Dans ce contexte, nous n'avons pas poursuivi ce projet de cristallographie des kinases Aurora.

V . Criblage haut débit d'inhibiteurs spécifiques des kinases Aurora

La mise au point de ce protocole d'expression et de purification des kinases Aurora a permis d'établir un test de dosage de l'activité du domaine catalytique de Aurora-A en plaque micro-puits dans notre laboratoire. Ce test est basé sur la mesure du taux d'ATP consommé au cours de la réaction de phosphorylation. L'histone H3 a été utilisée comme substrat de phosphorylation.

Ce test sera utilisé afin de rechercher des modulateurs de l'activité kinase de Aurora-A. A long terme, ces expériences peuvent aboutir à la découverte d'inhibiteurs spécifiques de l'une ou l'autre des kinases Aurora et à la mise en place de nouveaux outils thérapeutiques pour la lutte contre certains cancers impliquant ces protéines.

Remarques

Les essais kinases menés au cours de la caractérisation de la protéine xTD-60 ont été réalisés avec les protéines recombinantes HIS-AurA, HIS-AurB et HIS-AurBKA exprimées et purifiées selon le protocole décrit ci-dessus.

Les protéines recombinantes HIS-xTD-60.160Nter et HIS-xTD-60.193Cter utilisées lors de la caractérisation de xTD-60, ont été purifiées par le même protocole que les kinases Aurora et en présence de 8 M urée.

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Abraham, R.T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes Dev **15**(17): 2177-96.

Adams, R.R., Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2001). "Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis." Trends Cell Biol **11**(2): 49-54.

Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C. and Carmena, M. (2001). "Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation." J Cell Biol **153**(4): 865-80.

Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworthy, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2000). "INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow." Curr Biol **10**(17): 1075-8.

Ainsztein, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Mackay, A.M. and Earnshaw, W.C. (1998). "INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1." J Cell Biol **143**(7): 1763-74.

Almagro, S., Riveline, D., Hirano, T., Houchmandzadeh, B. and Dimitrov, S. (2004). "The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope." J Biol Chem **279**(7): 5118-26.

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. and Venkitaraman, A.R. (2003). "AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol." Cancer Cell **3**(1): 51-62.

Andreassen, P.R., Lacroix, F.B. and Margolis, R.L. (1997). "Chromosomes with two intact axial cores are induced by G2 checkpoint override: evidence that DNA decatenation is not required to template the chromosome structure." J Cell Biol **136**(1): 29-43.

Andreassen, P.R., Palmer, D.K., Wener, M.H. and Margolis, R.L. (1991). "Telophase disc: a new mammalian mitotic organelle that bisects telophase cells with a possible function in cytokinesis." J Cell Sci **99 (Pt 3)**: 523-34.

Andrews, P.D. (2005). "Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon?" Oncogene **24**(32): 5005-15.

Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J.R. (2004). "Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere." Dev Cell **6**(2): 253-68.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10148-52.

- B -

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E. (2003). "Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle." Mol Cell **12**(4): 851-62.

Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (1998). "Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14173-8.

Bernstein, E. and Allis, C.D. (2005). "RNA meets chromatin." Genes Dev **19**(14): 1635-55.

Biggins, S., Severin, F.F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A.A. and Murray, A.W. (1999). "The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast." Genes Dev **13**(5): 532-44.

Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J. and Plowman, G.D. (1998). "A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." Embo J **17**(11): 3052-65.

Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. (1999). "The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis." Trends Cell Biol **9**(11): 454-9.

Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. (2002). "Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity." J Biol Chem **277**(31): 27577-80.

Blagden, S.P. and Glover, D.M. (2003). "Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis." Nat Cell Biol **5**(6): 505-11.

Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McCleland, M.L., Kuang, J. and Stukenberg, P.T. (2002). "Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation." Mol Biol Cell **13**(9): 3064-77.

Bornens, M. (2002). "Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 25-34.

Bradbury, E.M., Inglis, R.J., Matthews, H.R. and Sarner, N. (1973). "Phosphorylation of very-lysine-rich histone in Physarum polycephalum. Correlation with chromosome condensation." Eur J Biochem **33**(1): 131-9.

Brunet, S., Sardon, T., Zimmerman, T., Wittmann, T., Pepperkok, R., Karsenti, E. and Vernos, I. (2004). "Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in Xenopus egg extracts." Mol Biol Cell **15**(12): 5318-28.

- C -

Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E. and Mattaj, I.W. (1999). "Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation." Nature **400**(6740): 178-81.

Carazo-Salas, R.E. and Karsenti, E. (2003). "Long-range communication between chromatin and microtubules in Xenopus egg extracts." Curr Biol **13**(19): 1728-33.

Carazo-Salas, R.E.a.S.B. (2002). "Assemblage du fuseau de division : le secret des chromosomes." Medecine sciences **18**(12).

Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2003). "The cellular geography of aurora kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 842-54.

Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J.C., Prigent, C. and Lorca, T. (2002). "APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis." EMBO Rep **3**(5): 457-62.

Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Prigent, C. and Lorca, T. (2002). "The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A." EMBO Rep **3**(12): 1209-14.

Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T. and Labbe, J.C. (2003). "[Mitosis under control]." Med Sci (Paris) **19**(3): 309-17.

Chan, C.S. and Botstein, D. (1993). "Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast." Genetics **135**(3): 677-91.

Chantalat, L., Skoufias, D.A., Kleman, J.P., Jung, B., Dideberg, O. and Margolis, R.L. (2000). "Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions." Mol Cell **6**(1): 183-9.

Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J., Yates, J.R., 3rd, Chan, C.S., Drubin, D.G. and Barnes, G. (2002). "Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p." Cell **111**(2): 163-72.

Chen, H.L., Tang, C.J., Chen, C.Y. and Tang, T.K. (2005). "Overexpression of an Aurora-C kinase-deficient mutant disrupts the Aurora-B/INCENP complex and induces polyploidy." J Biomed Sci **12**(2): 297-310.

Chen, J., Jin, S., Tahir, S.K., Zhang, H., Liu, X., Sarthy, A.V., McGonigal, T.P., Liu, Z., Rosenberg, S.H. and Ng, S.C. (2003). "Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells." J Biol Chem **278**(1): 486-90.

Chen, S.S., Chang, P.C., Cheng, Y.W., Tang, F.M. and Lin, Y.S. (2002). "Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function." Embo J **21**(17): 4491-9.

Cheung, P., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." Cell **103**(2): 263-71.

Clarke, D.J. and Gimenez-Abian, J.F. (2000). "Checkpoints controlling mitosis." Bioessays **22**(4): 351-63.

Cleveland, D.W., Mao, Y. and Sullivan, K.F. (2003). "Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling." Cell **112**(4): 407-21.

Cooke, C.A., Heck, M.M. and Earnshaw, W.C. (1987). "The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis." J Cell Biol **105**(5): 2053-67.

Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2004). "Regulated nucleosome mobility and the histone code." Nat Struct Mol Biol **11**(11): 1037-43.

Cremer, T. and Cremer, C. (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." Nat Rev Genet **2**(4): 292-301.

Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2002). "Mitotic phosphorylation of histone H3:

spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases." Mol Cell Biol **22**(3): 874-85.

- D -

de la Barre, A.E., Robert-Nicoud, M. and Dimitrov, S. (1999). "Assembly of mitotic chromosomes in Xenopus egg extract." Methods Mol Biol **119**: 219-29.

Delaval, B., Ferrand, A., Conte, N., Larroque, C., Hernandez-Verdun, D., Prigent, C. and Birnbaum, D. (2004). "Aurora B -TACC1 protein complex in cytokinesis." Oncogene **23**(26): 4516-22.

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

Doxsey, S. (2001). "Re-evaluating centrosome function." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(9): 688-98.

Dutertre, S., Descamps, S. and Prigent, C. (2002). "On the role of aurora-A in centrosome function." Oncogene **21**(40): 6175-83.

- E -

Eckley, D.M., Ainsztein, A.M., Mackay, A.M., Goldberg, I.G. and Earnshaw, W.C. (1997). "Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells." J Cell Biol **136**(6): 1169-83.

Eyers, P.A., Erikson, E., Chen, L.G. and Maller, J.L. (2003). "A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A." Curr Biol **13**(8): 691-7.

Eyers, P.A. and Maller, J.L. (2004). "Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2." J Biol Chem **279**(10): 9008-15.

- F -

Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). "Controlling the double helix." Nature **421**(6921): 448-53.

Fukasawa, K. (2005). "Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development " Cancer Letters.

Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. and Vande Woude, G.F. (1996). "Abnormal centrosome amplification in the absence of p53." Science **271**(5256): 1744-7.

- G -

Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2004). "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle." J Cell Biol **166**(2): 179-91.

Giet, R. and Glover, D.M. (2001). "Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis." J Cell Biol **152**(4): 669-82.

Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C. and Glover, D.M. (2002). "Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules." J Cell Biol **156**(3): 437-51.

Giet, R., Petretti, C. and Prigent, C. (2005). "Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?" Trends Cell Biol **15**(5): 241-50.

Giet, R. and Prigent, C. (1999). "Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases." J Cell Sci **112 (Pt 21)**: 3591-601.

Giet, R. and Prigent, C. (2000). "The Xenopus laevis aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle." Exp Cell Res **258**(1): 145-51.

Giet, R. and Prigent, C. (2001). "The non-catalytic domain of the Xenopus laevis auroraA kinase localises the protein to the centrosome." J Cell Sci **114**(Pt 11): 2095-104.

Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Le Guellec, K. and Prigent, C. (1999). "The Xenopus laevis aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XlEg5." J Biol Chem **274**(21): 15005-13.

Glotzer, M. (2003). "Cytokinesis: progress on all fronts." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 684-90.

Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." Cell **81**(1): 95-105.

Gorbsky, G.J. (2004). "Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B." Curr Biol **14**(9): R346-8.

Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. and Inagaki, M. (1999). "Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation." J Biol Chem **274**(36): 25543-9.

Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K. and Inagaki, M. (2003). "Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process." J Biol Chem **278**(10): 8526-30.

Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. and Inagaki, M. (2002). "Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation." Genes Cells **7**(1): 11-7.

Goyal, R.K., Lin, P., Kanungo, J., Payne, A.S., Muslin, A.J. and Longmore, G.D. (1999). "Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of Xenopus oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner." Mol Cell Biol **19**(6): 4379-89.

Gurley, L.R., D'Anna, J.A., Barham, S.S., Deaven, L.L. and Tobey, R.A. (1978). "Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells." Eur J Biochem **84**(1): 1-15.

- H -

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A. and Oegema, K. (2001). "Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans." J Cell Biol **155**(7): 1109-16.

Hans, F. and Dimitrov, S. (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." Oncogene **20**(24): 3021-7.

Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C.L. and Peters, J.M. (2003). "The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint." J Cell Biol **161**(2): 281-94.

Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. and Allis, C.D. (1997). "Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation." Chromosoma **106**(6): 348-60.

Hirano, T. (2002). "The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair." Genes Dev **16**(4): 399-414.

Hirokawa, N., Noda, Y. and Okada, Y. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division." Curr Opin Cell Biol **10**(1): 60-73.

Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T. and Kitamura, T. (2001). "MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody." J Biol Chem **276**(8): 5821-8.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells." Cell **114**(5): 585-98.

Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K. and Urano, T. (2000). "Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway." Oncogene **19**(24): 2812-9.

Honda, R., Korner, R. and Nigg, E.A. (2003). "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis." Mol Biol Cell **14**(8): 3325-41.

Houchmandzadeh, B. and Dimitrov, S. (1999). "Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes." J Cell Biol **145**(2): 215-23.

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000). "Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes." Cell **102**(3): 279-91.

Hutchins, J.R., Moore, W.J., Hood, F.E., Wilson, J.S., Andrews, P.D., Swedlow, J.R. and Clarke, P.R. (2004). "Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis." Curr Biol **14**(12): 1099-104.

- J -

Jallepalli, P.V. and Lengauer, C. (2001). "Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery." Nat Rev Cancer **1**(2): 109-17.

- K -

Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V. and Glotzer, M. (2000). "Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis." Curr Biol **10**(19): 1172-81.

Kaitna, S., Pasierbek, P., Jantsch, M., Loidl, J. and Glotzer, M. (2002). "The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis." Curr Biol **12**(10): 798-812.

Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. (2002). "Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic Xenopus egg extracts." Science **295**(5564): 2452-6.

Kapoor, T.M. and Compton, D.A. (2002). "Searching for the middle ground: mechanisms of chromosome alignment during mitosis." J Cell Biol **157**(4): 551-6.

Kaszas, E. and Cande, W.Z. (2000). "Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin." J Cell Sci **113 (Pt 18)**: 3217-26.

Katayama, H., Brinkley, W.R. and Sen, S. (2003). "The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 451-64.

Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R.B., Czerniak, B.A. and Sen, S. (2004). "Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53." Nat Genet **36**(1): 55-62.

Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. and Sen, S. (2001). "Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle." J Biol Chem **276**(49): 46219-24.

Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R. and Rieder, C.L. (2000). "Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates." Curr Biol **10**(2): 59-67.

Kim, J.H., Kang, J.S. and Chan, C.S. (1999). "Sli15 associates with the ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in Saccharomyces cerevisiae." J Cell Biol **145**(7): 1381-94.

Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T. and Okano, Y. (1999). "Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3." J Biol Chem **274**(11): 7334-40.

Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., Sumi, N. and Okano, Y. (1998). "Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of Drosophila and yeast IPL1." Cytogenet Cell Genet **82**(3-4): 147-52.

Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." Cell **98**(3): 285-94.

Koshland, D. and Strunnikov, A. (1996). "Mitotic chromosome condensation." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 305-33.

Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P. and Nigg, E.A. (2002). "Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle." J Cell Biol **158**(4): 617-23.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H. and Hirota, T. (2003). "CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function." Dev Cell **5**(6): 853-64.

- L -

Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A. and Kapoor, T.M. (2004). "Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division." Nat Cell Biol **6**(3): 232-7.

Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E. and Stukenberg, P.T. (2004). "Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity." Curr Biol **14**(4): 273-86.

Lens, S.M., Wolthuis, R.M., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. and Medema, R.H. (2003). "Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension." Embo J **22**(12): 2934-47.

Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. (1998). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." Nature **396**(6711): 580-4.

Li, H.Y., Wirtz, D. and Zheng, Y. (2003). "A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo." J Cell Biol **160**(5): 635-44.

Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. (2002). "Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit." Genes Dev **16**(17): 2274-85.

Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T. and Ruderman, J.V. (2002). "Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15440-5.

Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Chen, J. and Cheng, J.Q. (2004). "Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215." J Biol Chem **279**(50): 52175-82.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution." Nature **389**(6648): 251-60.

- M -

Ma, C., Cummings, C. and Liu, X.J. (2003). "Biphasic activation of Aurora-A kinase during the meiosis I- meiosis II transition in Xenopus oocytes." Mol Cell Biol **23**(5): 1703-16.

Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Eckley, D.M. and Earnshaw, W.C. (1998). "A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis." J Cell Biol **140**(5): 991-1002.

Mackay, A.M., Eckley, D.M., Chue, C. and Earnshaw, W.C. (1993). "Molecular analysis of the INCENPs (inner centromere proteins): separate domains are required for association with microtubules during interphase and with the central spindle during anaphase." J Cell Biol **123**(2): 373-85.

Malik, H.S. and Henikoff, S. (2003). "Phylogenomics of the nucleosome." Nat Struct Biol **10**(11): 882-91.

Maney, T., Hunter, A.W., Wagenbach, M. and Wordeman, L. (1998). "Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation." J Cell Biol **142**(3): 787-801.

Manuelidis, L. and Chen, T.L. (1990). "A unified model of eukaryotic chromosomes." Cytometry **11**(1): 8-25.

Martineau-Thuillier, S., Andreassen, P.R. and Margolis, R.L. (1998). "Colocalization of TD-60 and INCENP throughout G2 and mitosis: evidence for their possible interaction in signalling cytokinesis." Chromosoma **107**(6-7): 461-70.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E. and Saya, H. (2003). "Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells." J Biol Chem **278**(51): 51786-95.

Marumoto, T., Zhang, D. and Saya, H. (2005). "Aurora-A - a guardian of poles." Nat Rev Cancer **5**(1): 42-50.

Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2002). "Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells." Embo J **21**(4): 483-92.

Meraldi, P. and Nigg, E.A. (2002). "The centrosome cycle." FEBS Lett **521**(1-3): 9-13.

Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. and Kitamura, T. (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell **4**(4): 549-60.

Mishima, M. and Glotzer, M. (2003). "Cytokinesis: a logical GAP." Curr Biol **13**(15): R589-91.

Mishima, M., Kaitna, S. and Glotzer, M. (2002). "Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity." Dev Cell **2**(1): 41-54.

Mollinari, C., Reynaud, C., Martineau-Thuillier, S., Monier, S., Kieffer, S., Garin, J., Andreassen, P.R., Boulet, A., Goud, B., Kleman, J.P. and Margolis, R.L. (2003). "The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression." Dev Cell **5**(2): 295-307.

Morrison, C., Henzing, A.J., Jensen, O.N., Osheroff, N., Dodson, H., Kandels-Lewis, S.E., Adams, R.R. and Earnshaw, W.C. (2002). "Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate." Nucleic Acids Res **30**(23): 5318-27.

Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M. and Hosoya, H. (2000). "Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat." J Biochem (Tokyo) **128**(6): 903-7.

Murnion, M.E., Adams, R.R., Callister, D.M., Allis, C.D., Earnshaw, W.C. and Swedlow, J.R. (2001). "Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation." J Biol Chem **276**(28): 26656-65.

Murray, A.W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." Cell **116**(2): 221-34.
Musacchio, A. and Hardwick, K.G. (2002). "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 731-41.

- N -

Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. and Macara, I.G. (2001). "Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B." Science **292**(5521): 1540-3.
Nicklas, R.B. and Arana, P. (1992). "Evolution and the meaning of metaphase." J Cell Sci **102 (Pt 4)**: 681-90.
Nigg, E.A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 21-32.
Nigg, E.A. (2002). "Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?" Nat Rev Cancer **2**(11): 815-25.
Norbury, C. and Nurse, P. (1990). "Controls of cell proliferation in yeast and animals." Ciba Found Symp **150**: 168-77; discussion 177-83.
Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.C., Scheibe, D.N., Swanson, R.V. and Thompson, D.A. (2002). "Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography." Structure (Camb) **10**(12): 1659-67.

- P -

Pascreau, G., Arlot-Bonnemains, Y. and Prigent, C. (2003). "Phosphorylation of histone and histone-like proteins by aurora kinases during mitosis." Prog Cell Cycle Res **5**: 369-74.
Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view." Biochem J **308 (Pt 3)**: 697-711.
Prigent, C. and Dimitrov, S. (2003). "Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?" J Cell Sci **116**(Pt 18): 3677-85.

- R -

Raff, J.W. (2002). "Centrosomes and cancer: lessons from a TACC." Trends Cell Biol **12**(5): 222-5.
Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. and Tremethick, D.J. (2003). "Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development." Embo J **22**(7): 1599-607.
Rangasamy, D., Greaves, I. and Tremethick, D.J. (2004). "RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 650-5.
Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M. and Wittinghofer, A. (1998). "The 1.7 A crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller." Nature **392**(6671): 97-101.

Richards, E.J. and Elgin, S.C. (2002). "Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects." Cell **108**(4): 489-500.

Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. and Prigent, C. (1998). "The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly." J Cell Sci **111 (Pt 5)**: 557-72.

- S -

Saitoh, Y. and Laemmli, U.K. (1994). "Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold." Cell **76**(4): 609-22.

Sampath, S.C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A. and Funabiki, H. (2004). "The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly." Cell **118**(2): 187-202.

Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R. and Sen, S. (2004). "Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells." Cell Motil Cytoskeleton **59**(4): 249-63.

Schmiesing, J.A., Gregson, H.C., Zhou, S. and Yokomori, K. (2000). "A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of Xenopus XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation." Mol Cell Biol **20**(18): 6996-7006.

Schumacher, J.M., Ashcroft, N., Donovan, P.J. and Golden, A. (1998). "A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in Caenorhabditis elegans embryos." Development **125**(22): 4391-402.

Schumacher, J.M., Golden, A. and Donovan, P.J. (1998). "AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos." J Cell Biol **143**(6): 1635-46.

Scrittori, L., Hans, F., Angelov, D., Charra, M., Prigent, C. and Dimitrov, S. (2001). "pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in Xenopus egg extract." J Biol Chem **276**(32): 30002-10.

Scrittori, L., Skoufias, D.A., Hans, F., Gerson, V., Sassone-Corsi, P., Dimitrov, S. and Margolis, R.L. (2005). "A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function." Mol Biol Cell **16**(1): 292-305.

Sen, S., Zhou, H. and White, R.A. (1997). "A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines." Oncogene **14**(18): 2195-200.

Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L.B., Schneider, T.R., Stukenberg, P.T. and Musacchio, A. (2005). "Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin." Mol Cell **18**(3): 379-91.

Sloboda, R.D., Dentler, W.L. and Rosenbaum, J.L. (1976). "Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro." Biochemistry **15**(20): 4497-505.

Speliotes, E.K., Uren, A., Vaux, D. and Horvitz, H.R. (2000). "The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone." Mol Cell **6**(2): 211-23.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.

Sullivan, K.F., Hechenberger, M. and Masri, K. (1994). "Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere." J Cell Biol **127**(3): 581-92.

Swedlow, J.R. and Hirano, T. (2003). "The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions." Mol Cell **11**(3): 557-69.

- T -

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J. and Nasmyth, K. (2002). "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections." Cell **108**(3): 317-29.

Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S. and Otsu, M. (1998). "AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis." Embo J **17**(3): 667-76.

Terada, Y., Uetake, Y. and Kuriyama, R. (2003). "Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells." J Cell Biol **162**(5): 757-63.

Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979). "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 403-27.

Tsai, M.Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003). "A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly." Nat Cell Biol **5**(3): 242-8.

- U -

Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L. and Choo, K.H. (2000). "Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype." Curr Biol **10**(21): 1319-28.

- V -

Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. (2004). "Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events." Chromosoma **113**(5): 211-22.

van Holde, K. and Zlatanova, J. (1995). "Chromatin higher order structure: chasing a mirage?" J Biol Chem **270**(15): 8373-6.

- W -

Walczak, C.E., Vernos, I., Mitchison, T.J., Karsenti, E. and Heald, R. (1998). "A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity." Curr Biol **8**(16): 903-13.

Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. and Lees, E. (2000). "The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation." Oncogene **19**(42): 4906-16.

Wang, B.C., Rose, J., Arents, G. and Moudrianakis, E.N. (1994). "The octameric histone core of the nucleosome. Structural issues resolved." J Mol Biol **236**(1): 179-88.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999). "Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation." Cell **97**(1): 99-109.

Wheatley, S.P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C. (2001). "INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis." Curr Biol **11**(11): 886-90.

Wheatley, S.P., Henzing, A.J., Dodson, H., Khaled, W. and Earnshaw, W.C. (2004). "Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo." J Biol Chem **279**(7): 5655-60.

Wheatley, S.P. and Wang, Y. (1996). "Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells." J Cell Biol **135**(4): 981-9.

Widom, J. and Klug, A. (1985). "Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples." Cell **43**(1): 207-13.

Wittmann, T., Hyman, A. and Desai, A. (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors." Nat Cell Biol **3**(1): E28-34.

Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. and Vernos, I. (2000). "TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization." J Cell Biol **149**(7): 1405-18.

Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1999). "Chromatin disruption and modification." Nucleic Acids Res **27**(3): 711-20.

Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001). "Higher-order structure of chromatin and chromosomes." Curr Opin Genet Dev **11**(2): 130-5.

Wordeman, L. and Mitchison, T.J. (1995). "Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis." J Cell Biol **128**(1-2): 95-104.

- Y -

Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K., Takahashi, T., Izawa, I. and Inagaki, M. (2004). "Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis." J Biol Chem **279**(13): 12997-3003.

- Z -

Zeitlin, S.G., Barber, C.M., Allis, C.D. and Sullivan, K.F. (2001). "Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M." J Cell Sci **114**(Pt 4): 653-61.

Zeitlin, S.G., Shelby, R.D. and Sullivan, K.F. (2001). "CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis." J Cell Biol **155**(7): 1147-57.

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995). "Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex." Nature **378**(6557): 578-83.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R. and Sen, S. (1998). "Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." Nat Genet **20**(2): 189-93.