



HAL
open science

Optineurine, un nouveau régulateur de la mitose

David Kachaner

► **To cite this version:**

David Kachaner. Optineurine, un nouveau régulateur de la mitose. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66221 . tel-00831584

HAL Id: tel-00831584

<https://theses.hal.science/tel-00831584>

Submitted on 7 Jun 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Ecole Doctorale Complexité du Vivant

Présentée par

M. DAVID KACHANER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la Thèse

OPTINEURINE, UN NOUVEAU REGULATEUR DE LA MITOSE

Soutenue le 24 septembre 2012, devant le jury constitué de :

Pr. Joëlle SOBCZAK-THEPOT, Président du Jury

Dr. Roger KARESS et **Dr. May MORRIS**, Rapporteurs

Dr. Arnaud ECHARD, Examineur

Dr. Robert WEIL, Directeur de Thèse

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Ecole Doctorale Complexité du Vivant

Présentée par

M. DAVID KACHANER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la Thèse

OPTINEURINE, UN NOUVEAU REGULATEUR DE LA MITOSE

Soutenue le 24 septembre 2012, devant le jury constitué de :

Pr. Joëlle SOBCZAK-THEPOT, Président du Jury

Dr. Roger KARESS et **Dr. May MORRIS**, Rapporteurs

Dr. Arnaud ECHARD, Examineur

Dr. Robert WEIL, Directeur de Thèse

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données

15 rue de l'Ecole de Médecine

Escalier G, 2^{ème} étage

75270 PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 44 27 28 10

Fax : 01 44 27 23 95

Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 44 27 28 07

Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 44 27 28 05

Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 44 27 28 02

E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

**Thèse de Doctorat effectuée sous la direction de Robert Weil
dans l'unité dirigée par Alain Israël :**

SIGNALISATION MOLECULAIRE ET ACTIVATION CELLULAIRE

Institut Pasteur

25 rue du Docteur Roux

75015 PARIS

Tél. 01 45 68 84 98

Fax : 01 40 60 30 40

E-mail : rweil@pasteur.fr

REMERCIEMENTS

RESUME

Optineurine (“Optic neuropathy-inducing”, Optn) est une protéine exprimée de façon ubiquitaire chez les vertébrés et impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du trafic vésiculaire associée à l’appareil de Golgi, la réponse immunitaire innée ou l’autophagie des bactéries.

Mon travail de thèse a permis de caractériser une nouvelle fonction d’Optn dans la régulation du cycle cellulaire. Plus précisément, j’ai pu montrer qu’Optn était un régulateur négatif de Polo-like kinase 1 (Plk1), une kinase qui joue un rôle clef dans chacune des étapes de la mitose : de la prophase à la cytokinèse.

L’expression, l’activité et la localisation de Plk1 sont régulées de façon très fine pendant le cycle cellulaire et des cellules provenant d’un grand nombre de cancers présentent une quantité anormalement élevée de Plk1. L’activité de cette kinase est en partie régulée par phosphorylation sur sa thréonine 210. Plk1 est phosphorylée en fin de phase G2 par la kinase Aurora A. Cette phosphorylation induit un changement de conformation de Plk1 qui permet à son domaine Polo-Box d’interagir avec ses substrats et à son domaine kinase de les phosphoryler. En fin de mitose, Plk1 est inactivée par déphosphorylation par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β (Myosin Phosphatase Targeting subunit 1 - Protein Phosphatase 1 β).

Les résultats présentés dans cette thèse montrent qu’Optn est phosphorylée par Plk1 sur la sérine 177 en début de mitose provoquant le détachement d’Optn de l’appareil de Golgi et son accumulation dans le noyau. Nous avons montré que la phosphorylation et la translocation nucléaire d’Optn étaient requises pour permettre la régulation négative de Plk1 par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β au cours de la mitose. Les conséquences fonctionnelles de la déplétion d’Optn et donc de l’hyperactivité de Plk1 sont des défauts de cytokinèse et de ségrégation des chromosomes, aboutissant à l’apparition de cellules plurinucléées. En conclusion, nos résultats mettent en évidence un mécanisme de rétrocontrôle négatif par lequel Plk1 module la localisation d’Optn pendant la mitose pour réguler sa propre activité.

SUMMARY

Optineurin (“Optic neuropathy-inducing”, Optn) is a protein ubiquitously expressed in vertebrates. This protein is involved in several cellular physiological processes such as vesicular trafficking, protein secretion, innate immune response and bacterial autophagy.

My thesis work led to the identification of Optn as a negative regulator of Polo-like kinase 1 (Plk1), a kinase that participates in regulating each step of mitosis from prophase to cytokinesis.

Plk1 activity must be precisely regulated both in time and space during the cell cycle: temporal control is achieved by transcriptional regulation, phosphorylation and proteolysis, while spatial control is achieved by protein interactions that define its subcellular localization. Plk1 phosphorylation is tightly controlled during cell cycle: at mitotic entry, Plk1 is phosphorylated at threonine 210 by the Aurora A kinase to induce its kinase activity, whereas the myosin phosphatase complex MYPT1-PP1 β (Myosin Phosphatase Targeting subunit 1 - Protein Phosphatase 1 β) inactivates Plk1 by removing phosphorylation at threonine 210.

We have shown that Plk1 phosphorylates Optn at serine 177 during the G2/M transition, leading to the dissociation of Optn from the Golgi apparatus and its accumulation into the nucleus. Interestingly, both events are required for the negative regulation of Plk1 by the phosphatase complex MYPT1-PP1 β during mitosis. These results indicate a negative feedback mechanism by which Plk1 modulates Optn localization in order to regulate its own activity. Consistently, Plk1 activity is sustained in Optn-deficient cells, inducing major mitotic anomalies, such as defects of chromosome segregation and abscission failures and eventually multi-nucleated cells. Altogether, our results uncover a cell cycle regulatory function for Optn, a protein that have also been linked to the development of several pathologies such as glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and Paget’s disease of bone.

TABLE DES MATIERES

RESUME / SUMMARY	3, 4
INDEX DES FIGURES	9

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE	11
-----------------------	----

CHAPITRE 1 : CYCLE CELLULAIRE & POLO-LIKE KINASES

I. Le cycle de division cellulaire	15
1. Généralités	15
A. L'interphase	15
B. La mitose	16
2. Régulations moléculaires du cycle cellulaire	17
A. Les principaux acteurs du cycle cellulaire : Cdk et Cyclines	17
B. Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire	19
C. Les kinases mitotiques régulent la division cellulaire	19
II. La famille des Polo-like kinases	20
1. Découverte de la protéine Polo chez la drosophile	20
2. La famille « Polo », des protéines conservées au cours de l'évolution	21
3. Les Polo-like kinases de mammifères	22

CHAPITRE 2 : POLO-LIKE KINASE 1

I. Structure de Plk1	29
1. Le domaine kinase de Plk1	29
2. Le domaine PBD de Plk1	30
3. Interaction intramoléculaire entre le domaine kinase et le domaine PBD	31
4. Localisation nucléaire de Plk1	32
5. Dégradation de Plk1	32

II. Régulation de l'activité de Plk1	33
1. Régulation transcriptionnelle de Plk1	33
A. Activation transcriptionnelle du promoteur de Plk1	33
B. Répression transcriptionnelle du promoteur de Plk1	34
C. Les facteurs de transcription E2F : Activateurs & Répresseurs	35
2. Régulation de Plk1 : phosphorylation vs déphosphorylation	36
A. Phosphorylation et déphosphorylation de la thréonine 210 de Plk1	36
B. Phosphorylation de la sérine 137 et de la sérine 49	38
3. Régulation de la localisation subcellulaire de Plk1 par le domaine PBD	39
4. Dégradation protéolytique de Plk1	40
A. Ubiquitination de Plk1 par Chfr	40
B. Ubiquitination de Plk1 par le complexe APC/C	40
III. Fonctions de Plk1 au cours de la mitose	42
1. Plk1 régule l'entrée des cellules en mitose	42
2. Plk1 régule la fragmentation de l'appareil de Golgi	44
A. Généralités sur l'appareil de Golgi	44
B. Fragmentation de l'appareil de Golgi en mitose	44
3. Plk1 régule la maturation des centrosomes et la mise en place du fuseau mitotique	
4. Plk1 régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C	47
5. Plk1 régule la séparation des chromosomes en anaphase	48
A. Fonction du kinétochore en mitose	48
B. Evidences du rôle de Plk1 aux kinétochores	49
C. Recrutement de Plk1 aux kinétochores	49
D. Fonctions de Plk1 aux kinétochores	50
6. Plk1 régule la cytokinèse	52
A. Définition de la cytokinèse	52
B. Evidences du rôle de Plk1 dans la cytokinèse	53
C. Plk1 régule la formation et la contraction de l'anneau d'actomyosine	53
D. Plk1 régule l'abscission	57
IV. Plk1 et cancers	59
1. Rôle de Plk1 dans la transformation oncogénique	59
2. Plk1, une cible thérapeutique dans les cancers ?	60
3. Le BI 2536, un inhibiteur de Plk1	60

CHAPITRE 3 : OPTINEURINE	61
I. Généralités	62
II. Principales caractéristiques du gène <i>Optineurine</i>	63
III. Structure d'Optineurine	63
IV. Optineurine, une protéine multifonctionnelle	64
1. Optineurine, un régulateur du trafic vésiculaire associé à l'appareil de Golgi	64
2. Optineurine, un régulateur des voies de sécrétion	66
3. Optineurine, un effecteur de la voie d'activation NF-κB	67
A. La voie classique d'activation de NF- κ B	67
B. Optineurine, un régulateur négatif de la voie NF- κ B stimulée par le TNF- α	67
C. Optineurine, un régulateur positif de la voie NF- κ B stimulée par la protéine Tax	
4. Optineurine, un effecteur de la réponse interféron	70
A. Induction des gènes interférons au cours de l'immunité innée antivirale	70
B. Optineurine, un régulateur de la voie d'activation du facteur IRF3	70
5. Optineurine, un récepteur de l'autophagie des bactéries	72
A. Définition de l'autophagie	72
B. Optineurine régule l'adressage sélectif des salmonelles vers les autophagosomes	
V. Pathologies associées à Optineurine	74
1. Optineurine et le glaucome à angle ouvert	74
2. Optineurine et la sclérose latérale amyotrophique	75
3. Optineurine et la maladie osseuse de Paget	76

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse	78
------------------------------	----

RESULTATS

Résumé des résultats	81
Article	82

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Phosphorylation d'Optineurine par Plk1 en mitose	122
1. Mis en évidence de la phosphorylation d'Optineurine au cours de la mitose	122
2. Optineurine est-elle un substrat des autres Polo-like kinases ?	124
II. Effets de la phosphorylation d'Optineurine par Plk1 sur sa localisation subcellulaire	
1. Dissociation d'Optineurine de l'appareil de Golgi	126
2. Import d'Optineurine dans le noyau	127
3. Export nucléaire d'Optineurine	128
III. Optineurine interagit avec le complexe myosine phosphatase MYPT1-PP1β	130
1. Le complexe myosine phosphatase	130
2. Cartographie du domaine d'interaction d'Optineurine avec MYPT1	131
3. MYPT1 régule-t-elle la localisation nucléaire d'Optineurine en début de mitose ?	
IV. Optineurine est un régulateur négatif de l'activité de Plk1 pendant la mitose	133
1. Optineurine et le complexe myosine phosphatase font partie d'une même voie d'inactivation de Plk1	133
2. A quel moment de la mitose a lieu la régulation négative de Plk1 ?	134
3. Optineurine, un régulateur négatif d'Aurora A ?	135
V. Conséquences fonctionnelles de la déplétion d'Optineurine au cours de la mitose	
1. La déplétion d'Optineurine génère la formation de cellules multinucléées	136
2. Quels sont les mécanismes moléculaires responsables des défauts mitotiques observés dans les cellules déplétées pour Optineurine ?	136
VI. Perspectives	138
1. Régulation du trafic vésiculaire en mitose par Optn ?	138
2. Régulation de l'autophagie en mitose par Optn ?	140
BIBLIOGRAPHIE	143
ANNEXE	166

INDEX DES FIGURES

- Figure 1** – Le cycle cellulaire
- Figure 2** – Les différentes étapes de la mitose
- Figure 3** – Représentation schématique des phases de la mitose
- Figure 4** – Les complexes Cdk/Cyclines contrôlent la progression du cycle cellulaire
- Figure 5** – Principales fonctions des Polo-like kinases de mammifères
- Figure 6** – Localisations et fonctions de Plk1 pendant la mitose
- Figure 7** – Structure de Plk1
- Figure 8** – Les différents mécanismes de régulation de Plk1
- Figure 9** – Inactivation de Plk1 par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β
- Figure 10** – Plk1 régule l'activation du MPF
- Figure 11** – Plk1 régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C
- Figure 12** – Plk1 régule l'attachement des microtubules aux kinétochores
- Figure 13** – Plk1 régule la séparation des chromatides sœurs
- Figure 14** – Prc1 recrute Plk1 au fuseau central
- Figure 15** – Plk1 contrôle l'élongation du fuseau en anaphase et l'initiation de la cytokinèse
- Figure 16** – Plk1 régule l'activation de RhoA
- Figure 17** – Plk1 régule l'assemblage et la contraction de l'anneau d'actomyosine
- Figure 18** – Plk1 régule l'abscission
- Figure 19** – Structures d'Optineurine et de NEMO
- Figure 20** – Rôles d'Optineurine dans le transport vésiculaire et dans les voies de sécrétion
- Figure 21** – Modèle d'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF- α
- Figure 22** – Modèle de régulation négative de la voie NF- κ B induite par le TNF- α
- Figure 23** – Modèle d'activation de la voie NF- κ B par la protéine virale Tax
- Figure 24** – Modèle de régulation de la voie IRF3
- Figure 25** – Elimination des salmonelles invasives par la machinerie autophagique
- Figure 26** – Mutations, polymorphismes et pathologies associés à Optineurine
- Figure 27** – Modèle de régulation négative de l'activité de Plk1

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

« *Omnis cellula e cellula* » ; ce célèbre adage énoncé en 1858 par le physiologiste allemand Rudolf Virchow résume la théorie cellulaire sous sa forme définitive : « Là où apparaît une cellule, il doit y avoir eu une autre cellule auparavant » écrit-il dans *Zellulärpathologie*.

Le cycle de division cellulaire est le processus biologique fondamental par lequel une cellule mère aboutit à deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Il peut être résumé schématiquement en deux temps : une phase de division appelée la mitose et une phase de croissance, l'interphase, qui sépare deux divisions successives.

Découverte il y a plus de 150 ans, la division cellulaire a fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental à toute vie. Grâce à ce processus, les cellules vont se multiplier, permettant à l'embryon de se développer à partir d'une cellule œuf unique, ou encore à l'organisme de grandir et de régénérer les tissus pendant la vie adulte. Chez l'Homme, une cellule œuf fertilisée va donner, par divisions successives, les 10 000 milliards de cellules qui composent le corps humain à l'âge adulte. A l'extrême, chez les organismes unicellulaires (bactéries, levures..) chaque division produit un organisme supplémentaire.

Les travaux entrepris au cours des dernières décennies sur des modèles aussi variés que les levures, les embryons d'oursin, les ovocytes d'étoile de mer et d'amphibiens ou les cellules de mammifères en culture ont permis de poser les bases de la régulation du cycle cellulaire. Ces études décrivent un mécanisme de division extrêmement complexe et régulé par un grand nombre de protéines intervenant transitoirement et dans un ordre défini, permettant ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire.

Par ailleurs des mécanismes de surveillance appelés « checkpoints » assurent en quelque sorte le « contrôle qualité » du cycle cellulaire en bloquant la division si des anomalies sont constatées (lésions ou anomalies de réplication de l'ADN, chromosomes non attachés au fuseau mitotique par exemple). Cet arrêt de la division est suivi de la mise en place de mécanismes capables de réparer la lésion cellulaire et ainsi de permettre à la division

de se poursuivre. Lorsque les dommages sont trop importants pour être réparés, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) est déclenchée. Il arrive toutefois que des dérégulations incontrôlées de la division cellulaire – qui échappent à l'ensemble des points de contrôle – aboutissent à une hyperprolifération des cellules, un processus souvent à l'origine des cancers. On comprend alors l'intérêt d'étudier le rôle des régulateurs connus du cycle cellulaire, de préciser leurs mécanismes d'action, ou encore d'identifier de nouveaux acteurs de cette régulation.

En conclusion, l'étude du cycle cellulaire reste, encore aujourd'hui, un vaste domaine de la recherche fondamentale, comme en témoignent les articles publiés quotidiennement à ce sujet.

CHAPITRE 1 : CYCLE CELLULAIRE & POLO-LIKE KINASES

I. Le cycle de division cellulaire

1. Généralités

A. L'interphase

B. La mitose

2. Régulations moléculaires du cycle cellulaire

A. Les principaux acteurs du cycle cellulaire : Cdk et Cyclines

B. Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire

C. Les kinases mitotiques régulent la division cellulaire

II. La famille des Polo-like kinases

1. Découverte de la protéine Polo chez la drosophile

2. La famille « Polo », des protéines conservées au cours de l'évolution

3. Les Polo-like kinases de mammifères

CHAPITRE 1 : CYCLE CELLULAIRE & POLO-LIKE KINASES

I. Le cycle de division cellulaire

1. Généralités

Le cycle cellulaire correspond à un ensemble d'évènements ordonnés dans le temps conduisant à la division d'une cellule en deux cellules filles. Il s'agit d'un processus extrêmement régulé qui permet la duplication des différents éléments d'une cellule mère et leur répartition entre les deux cellules filles.

Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dans un état quiescent aussi appelé phase G0 (Gap 0). Sous l'effet de signaux mitogènes (facteurs de croissance, hormones..), elles amorcent un cycle de division, classiquement divisé en deux grandes phases : l'interphase et la mitose (**Figure 1**).

A. L'interphase

L'interphase est une phase de croissance cellulaire pendant laquelle les cellules vont se préparer à l'entrée en mitose. Elle est subdivisée en 3 phases appelées G1, S et G2.

La phase G1 (« Gap », intervalle), est généralement la phase la plus longue du cycle cellulaire et correspond principalement à une période de croissance initiale. C'est une phase d'activité métabolique intense avec transcription des ARNs et synthèse des protéines nécessaires à l'accroissement de la cellule. Au cours de cette phase, les cellules passent le point de restriction, une barrière de non-retour, à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence des signaux mitogènes.

La phase S (« Synthesis », synthèse) correspond à une phase de synthèse d'ADN qui permet la duplication de la totalité de l'information génétique par un mécanisme de réplication dit « semi-conservatif ». A la fin de la phase S, chaque chromosome possède deux chromatides sœurs strictement identiques entre elles et physiquement attachées l'une à l'autre

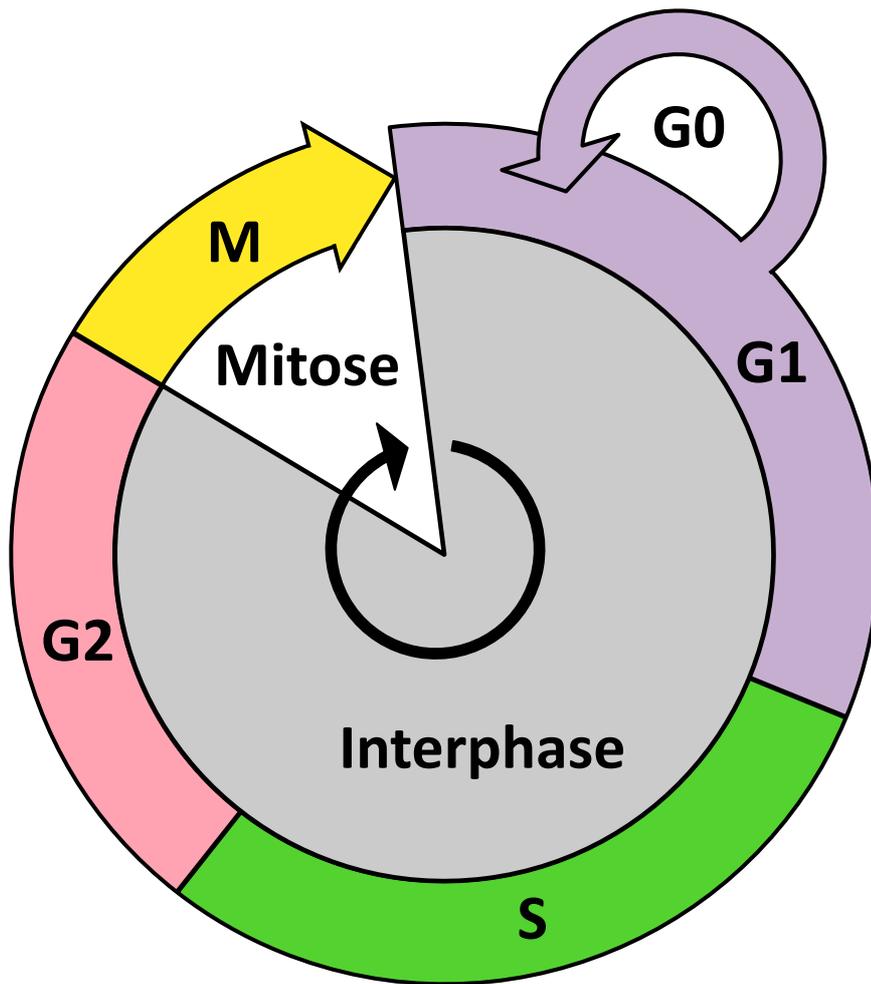


Figure 1 : Le cycle cellulaire

L'interphase est la période entre les divisions cellulaires. Elle est caractérisée par un accroissement du volume cellulaire, l'expression des gènes et la duplication des chromosomes. Elle est subdivisée en 3 phases : G1, S et G2.

La mitose correspond à la division cellulaire proprement dite pendant laquelle une cellule mère se divise en deux cellules filles.

La phase G0 est une phase de quiescence pendant laquelle la cellule est dans un état de repos.

au niveau de leur centromère. La cellule entame également la duplication de son centrosome au cours de cette phase.

La phase G2 est une phase de croissance pendant laquelle la cellule synthétise la plupart des protéines nécessaires à l'entrée en mitose.

B. La mitose

La mitose se divise en cinq étapes de la prophase à la télophase. La cytokinèse est, quant à elle, l'étape finale de la division cellulaire. Elle conduit à l'individualisation des deux cellules filles (**Figures 2 & 3**).

La prophase se caractérise essentiellement par la compaction de la chromatine en chromosomes très denses à deux chromatides facilement visibles en microscopie photonique. Une autre caractéristique de la prophase correspond à la maturation des centrosomes. Riches en tubuline- γ , ils constituent des centres organisateurs de microtubules (MTOC, Microtubule Organizing Center), qui s'écartent et migrent progressivement de façon diamétralement opposée. Cette migration des centrosomes préfigure la localisation du fuseau mitotique.

En prométaphase, l'enveloppe nucléaire se rompt (NEBD pour Nuclear Envelope Breakdown) sous forme de petites vésicules membranaires. Cette modification de l'organisation membranaire interne, incluant aussi le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, facilite la réorganisation des microtubules en éliminant les barrières physiques que pourraient constituer ces organites dans le cytoplasme. Parallèlement, le fuseau mitotique s'organise dans toute la cellule. A partir des deux centrosomes vont rayonner plusieurs types de microtubules : les microtubules astraux, qui s'orientent des centrosomes en direction du cortex et qui participent au positionnement du fuseau mitotique, les microtubules polaires qui irradiant de chacun des centrosomes et interagissent entre eux au milieu du fuseau, ainsi que les microtubules kinétochoriens qui s'attachent aux kinétochores des chromosomes, une structure protéique associée à l'ADN centromérique.

En métaphase, l'attachement bipolaire des chromosomes est achevé ; chaque chromatide de chaque paire de chromosomes est reliée à un pôle opposé du fuseau mitotique par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens. De par l'équilibre des tensions exercées

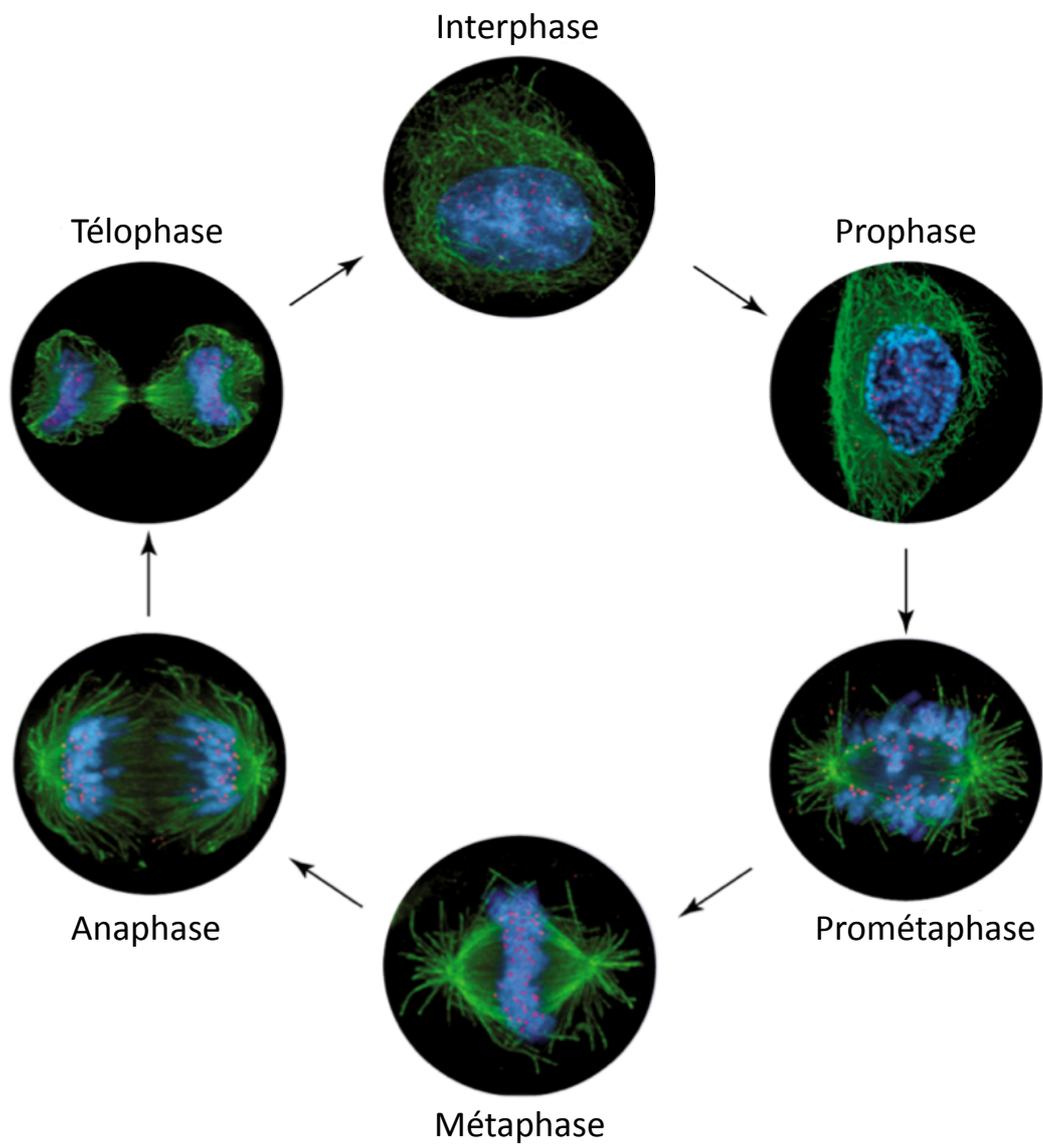


Figure 2 : Les différentes étapes de la mitose

Ces photos d'immunofluorescence montrent la localisation de l'ADN (bleu), des microtubules (vert) et des kinétochores (rouge) au cours des différents stades de la division cellulaire. (Adapté de Cheeseman and Desai, 2008)

par ces microtubules, les chromosomes vont s'aligner sur un même plan, perpendiculaire au fuseau mitotique, appelée la plaque métaphasique (ou plaque équatoriale).

L'anaphase marque la ségrégation des chromatides sœurs de chaque chromosome, en deux lots égaux de chromosomes à une chromatide, qui migrent vers les pôles opposés du fuseau. Dans un premier temps, appelé anaphase A, les microtubules kinétochoriens se dépolymérisent et tractent les chromatides vers chacun des pôles. Puis dans un second temps, appelé anaphase B, les microtubules polaires s'allongent par polymérisation éloignant de fait l'un de l'autre les deux pôles du fuseau.

En télophase, les chromatides regroupées à chacun des deux pôles de la cellule se décondensent et les vésicules de l'enveloppe nucléaire se regroupent pour délimiter les deux nouveaux noyaux. Les microtubules astraux se dépolymérisent, et les microtubules polaires du fuseau central se condensent pour former le corps intermédiaire, ou « midbody », à l'intérieur du pont intercellulaire qui relie les deux cellules filles. Cette structure, décrite pour la première fois par Flemming en 1891, contient des protéines indispensables à la cytokinèse, c'est-à-dire au clivage de la cellule mère en deux cellules filles.

La cytokinèse est l'étape finale de la division qui conduit à l'individualisation des deux cellules filles. Elle est caractérisée par la mise en place, dès l'anaphase, d'un anneau contractile constitué principalement de filaments d'actine et de myosine. Il conduit à l'apparition d'un sillon de clivage marqué par l'invagination de la membrane plasmique, dans un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique. En fin de télophase, l'invagination de la membrane plasmique à l'équateur de la cellule induite par la contraction de l'anneau d'actomyosine est totale, et le clivage proprement dit, l'abscission, s'opère.

2. Régulations moléculaires du cycle cellulaire

A. Les principaux acteurs du cycle cellulaire : Cdk et Cyclines

Les différentes phases du cycle se succèdent dans un ordre immuable ; chacune d'entre elles ne pouvant débiter que si la phase précédente s'est achevée correctement. Cette régulation précise du cycle cellulaire fait intervenir une famille de protéines kinases cycline-dépendantes, appelée Cdk (Cyclin-dependent kinases), qui interviennent transitoirement dans

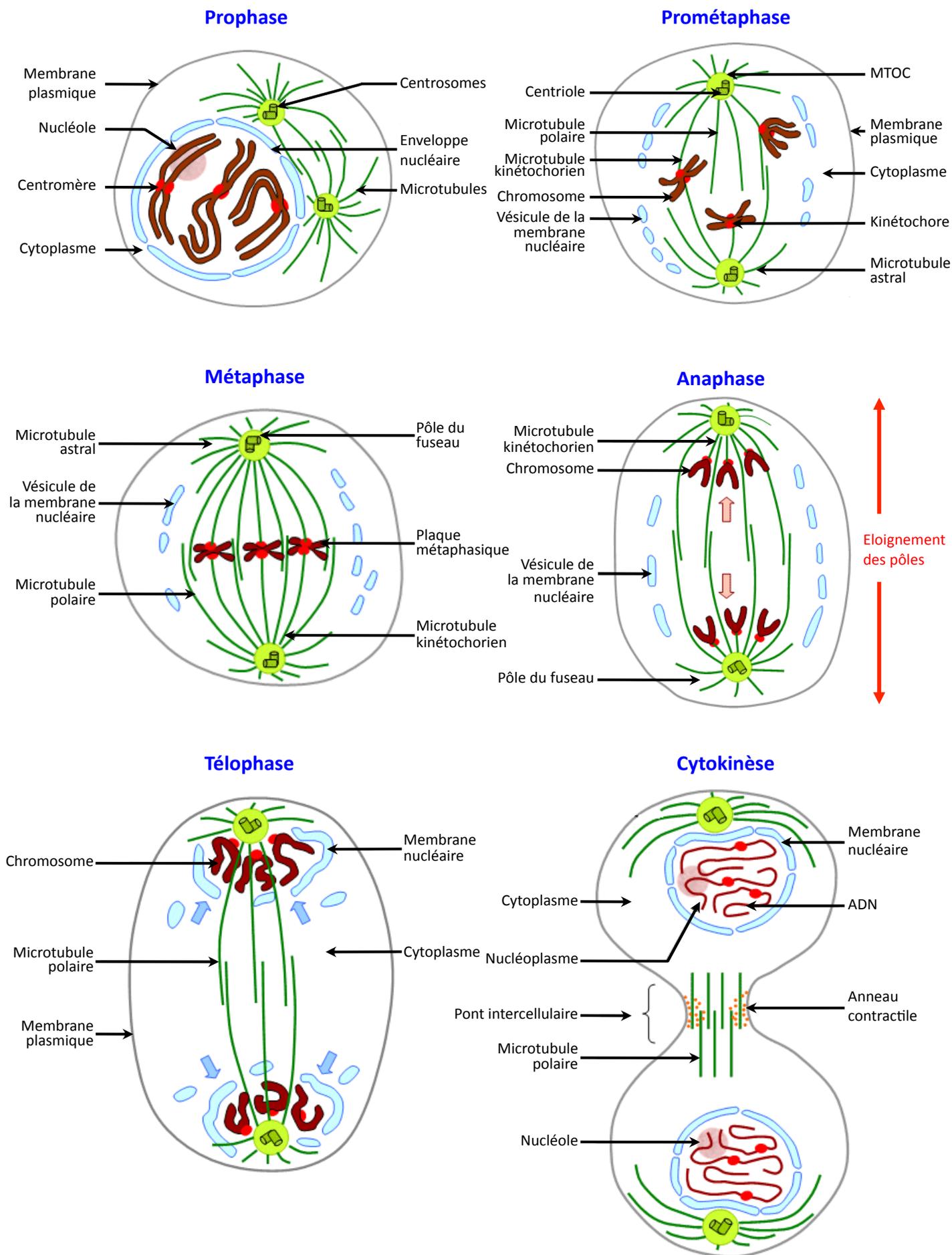


Figure 3 : Représentation schématique des phases de la mitose

un ordre déterminé pour orchestrer la progression harmonieuse des différentes phases du cycle, depuis les organismes eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères (Gopinathan et al., 2011).

Chez les levures fissipares (*Schizosaccharomyces pombe*) et les levures bourgeonnantes (*Saccharomyces cerevisiae*), tous les évènements du cycle cellulaire sont contrôlés par une unique et essentielle Cdk : appelée respectivement Cdc2 et Cdc28. Dans les cellules animales, quatre Cdk majeures régulent ces évènements : Cdk4 et Cdk6 participent au contrôle de l'entrée dans le cycle en réponse à des facteurs extracellulaires, Cdk2 intervient plutôt pendant la phase S, alors que Cdk1 agit essentiellement pendant la phase G2 et la mitose (Satyanarayana and Kaldis, 2009).

L'activation des différentes Cdk est régulée par leur association avec une famille de sous-unités régulatrices, appelée les Cyclines. Ces protéines subissent des variations de concentration extrêmement fines et rapides au cours du cycle, essentiellement par régulation de l'expression de leurs gènes et de leur dégradation protéolytique, ce qui permet d'assurer les variations d'activité des Cdk indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire (Satyanarayana and Kaldis, 2009).

Le cycle cellulaire des mammifères est contrôlé par au moins six complexes Cdk/Cyclines différents qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire (chaque Cdk agissant sur des substrats définis) (**Figure 4**). Brièvement, Cdk4 et Cdk6, associées aux cyclines D, régulent le déroulement de la phase G1. Le complexe Cdk2/Cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivi du complexe Cdk2/Cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Cdk1/Cycline A intervient en G2 alors que le complexe Cdk1/Cycline B, également connu sous le nom de MPF (M-phase Promoting Factor), régule la transition G2/M et la mitose (Meijer, 2003 ; Murray, 2004).

Il est également intéressant de préciser que certaines Cdk sont impliquées dans d'autres fonctions que la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, Cdk7, Cdk8 et Cdk9 sont des régulateurs de la transcription, tandis que Cdk5 et Cdk11 ont des fonctions dans la biologie des neurones (Meijer, 2003).

Par ailleurs, si pas moins de 21 Cdk et 15 Cyclines différentes ont été identifiées dans le génome humain, toutes les associations Cdk/Cyclines ne sont pas encore connues et on peut donc supposer que d'autres complexes régulent le cycle cellulaire (Gopinathan et al., 2011).

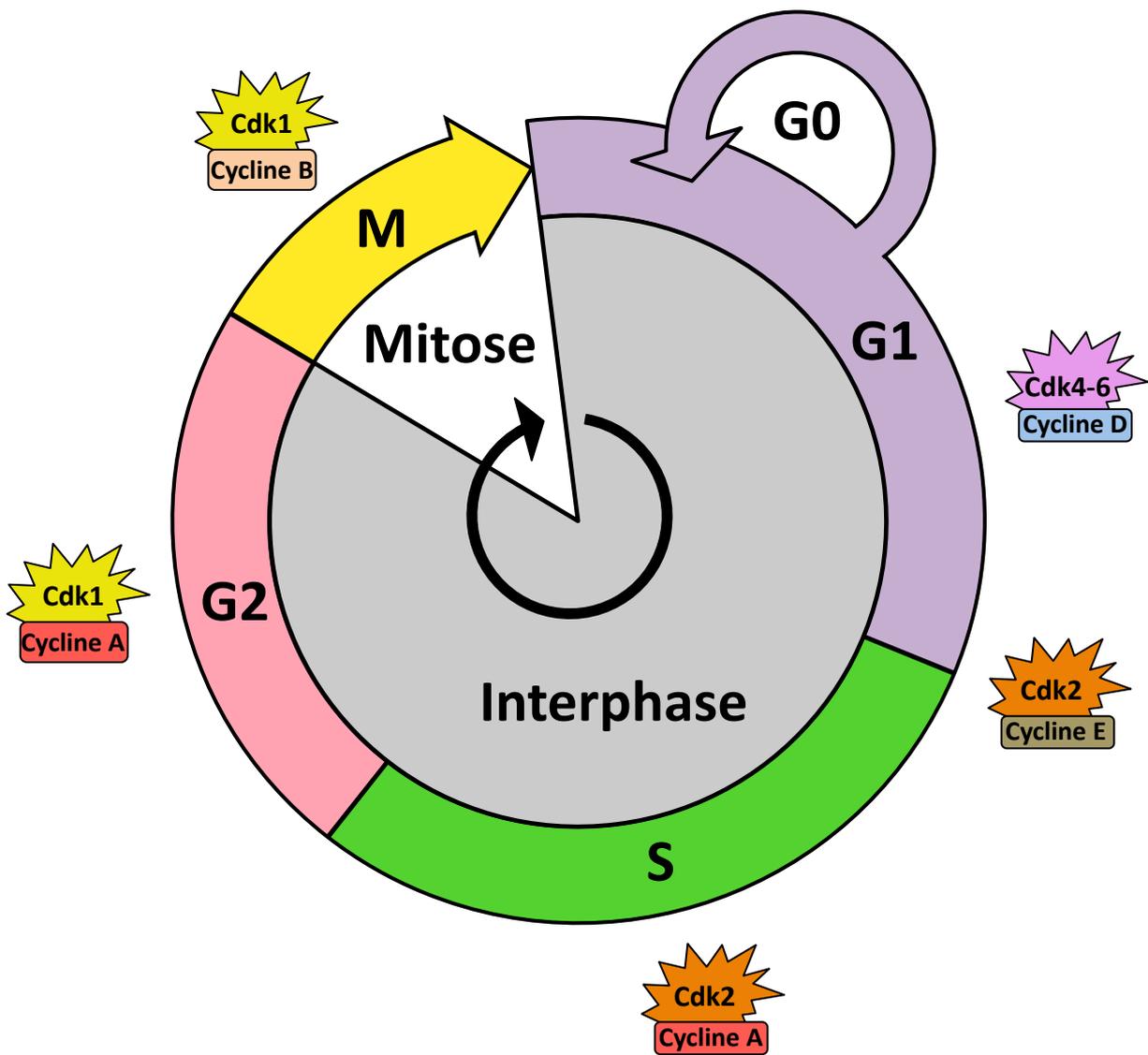


Figure 4 : Les complexes Cdk/Cyclines contrôlent la progression du cycle cellulaire

L'activité transitoire des différents complexes Cdk/Cyclines au cours des différentes phases du cycle est également régulée par des modifications post-traductionnelles (essentiellement des phosphorylations/déphosphorylations) conduisant à l'activation ou à l'inactivation des Cdk. De plus, des protéines inhibitrices appelées CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors) inhibent les complexes Cdk/Cyclines.

B. Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire

Les mécanismes de surveillance, appelés également « checkpoints », s'ajoutent à la régulation de la succession des quatre phases du cycle par les Cdk. Ces mécanismes sont capables de surveiller des processus très importants du cycle, de détecter des anomalies et, auquel cas, d'imposer un arrêt du cycle. Ils interviennent par exemple lorsque des lésions (DNA damage checkpoint) ou des anomalies de réplication de l'ADN (DNA replication checkpoint) sont détectées, ou encore pour contrôler le bon alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique et leur attachement aux deux pôles du fuseau (spindle assembly checkpoint) (Boddy and Russell, 2001 ; Kastan and Bartek, 2004 ; Musacchio, 2011).

Lorsqu'un de ces points de contrôle est activé, le blocage de la division est suivi de la mise en place de mécanismes capables de réparer la lésion cellulaire et ainsi de permettre à la division de se poursuivre. Dans tous les cas, si les anomalies sont trop importantes ou si les mécanismes de réparation échouent, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) est déclenchée (Kastan and Bartek, 2004).

C. Les kinases mitotiques régulent la division cellulaire

La mitose est sans nul doute l'étape la plus spectaculaire du cycle cellulaire qui permet la répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles naissantes. Des anomalies de la chorégraphie mitotique conduisent fréquemment à l'apparition de cellules filles aneuploïdes, caractéristiques de nombreux cancers (Nigg, 2001).

De nombreuses kinases sont impliquées dans la régulation de la mitose de la prophase jusqu'à la cytokinèse, parmi lesquelles Cdk1, le membre fondateur de la famille des kinases cyclines dépendantes (Cdk), mais également les protéines de la famille Aurora, les kinases de la famille NIMA (Never In Mitosis A) ou encore les kinases de la famille Polo (Nigg, 2001 ; Salaün et al., 2008). Les fonctions de ces différentes protéines seront décrites ultérieurement.

II. La famille des Polo-like kinases

1. Découverte de la protéine Polo chez la drosophile

Les premiers phénotypes associés à des mutations du gène *polo* ont été identifiés chez *Drosophila melanogaster* en 1988 par Sunkel et Glover, qui décrivaient des défauts de divisions cellulaires dans les cellules larvaires de drosophile (Sunkel and Glover, 1988). Deux mutations, *polo*¹ et *polo*² furent alors décrites. Les larves homozygotes pour *polo*¹ présentent des divisions mitotiques aberrantes au niveau des cellules neurales. Ces défauts qui résultent d'anomalies d'orientation des chromosomes en métaphase aboutissent à la production de cellules polyploïdes. Par ailleurs, les embryons des femelles homozygotes pour *polo*¹ sont caractérisés par des pôles et des fuseaux mitotiques anormaux : les chromosomes présentent un arrangement circulaire autour d'un fuseau monopolaire. Des méioses anormales ont été également observées chez les mâles homozygotes qui sont stériles. L'allèle *polo*² contient une insertion de l'élément transposable P. Ce mutant ne permet plus la production d'une protéine fonctionnelle et est par conséquent létal à l'état homozygote.

Le gène *polo* fut cloné trois années plus tard et code pour une protéine de 577 acides aminés dont l'extrémité N-terminale est homologue aux protéines sérine/thréonine kinases (Llamazares et al., 1991). Llamazares et ses collaborateurs montrent alors que les transcrits du gène *polo* sont abondants dans les stades de développement embryonnaire et dans les tissus où l'activité mitotique est intense. Ils découvrent également que la distribution subcellulaire de cette kinase varie au cours du cycle cellulaire : Polo, majoritairement cytoplasmique dans les cellules interphasiques, est ensuite associée aux chromosomes de la fin de la prophase jusqu'à la télophase, avant de redevenir cytoplasmique au cycle suivant.

Ces travaux pionniers chez la drosophile ont permis l'identification d'une protéine dont on pouvait déjà suspecter le rôle crucial dans la régulation de la division cellulaire. Ils ont ouvert de nouvelles perspectives en permettant le clonage des orthologues de Polo et en montrant que leurs fonctions sont conservées dans le cycle cellulaire. Ces études sont toujours d'actualité et précisent chaque fois un peu plus les mécanismes d'action des protéines de la famille Polo.

2. La famille « Polo », des protéines conservées au cours de l'évolution

Quelques années après la découverte de la protéine Polo de drosophile, de nombreuses études ont montré que cette protéine appartient à une famille de kinases conservées au cours de l'évolution, des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Ainsi, des orthologues de Polo ont-ils été retrouvés chez les levures (*S. cerevisiae*, *S. pombe*), chez les invertébrés (*C. elegans*), chez les amphibiens (*X. laevis*) et chez les mammifères (*M. musculus*, *H. sapiens*)... Chacun de ces organismes possède un ou plusieurs orthologues de Polo, dont les rôles sont parfois variés, et dont il faut citer quelques exemples.

Le gène codant Cdc5 (Cell division cycle 5) est l'orthologue de Polo chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*. Il a été identifié par complémentation fonctionnelle dans une souche portant une mutation thermosensible pour *DBF4*, un gène connu pour réguler l'initiation de la réplication de l'ADN chez la levure (Kitada et al., 1993). L'analyse des séquences de Polo et Cdc5 révèle alors une grande homologie entre ces deux protéines. Les auteurs observent également que la transcription du gène codant pour Cdc5 varie au cours du cycle cellulaire, produisant notamment une quantité maximale d'ARN messager lors de la transition G2/M. De plus, la délétion de Cdc5 est létale et affecte la division cellulaire : les levures présentent une morphologie anormale « en forme d'haltères » avec une division incomplète des noyaux qui restent connectés.

Plc1, l'orthologue de Polo chez la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe*, a été découvert en 1995 et présente une grande homologie de séquence avec les protéines Cdc5 (*S. cerevisiae*) et Polo (*D. melanogaster*) (Ohkura et al., 1995). Ohkura et ses collaborateurs montrent alors que la mutation de *plc1* affecte d'une part la formation du fuseau bipolaire pendant la mitose et d'autre part la formation du septum de division.

Plc1 (Polo-like kinase of *Caenorhabditis elegans*) est l'orthologue de Polo chez le nématode (Ouyang et al., 1999). Il a été identifié en 1999, en même temps que son paralogue Plc2, suite au séquençage du génome de *C. elegans*. Dan Chase et ses collaborateurs montrent que l'invalidation de l'expression de Plc1 par ARN interférent dans les ovocytes du nématode entraîne un retard de la rupture de l'enveloppe nucléaire avant l'ovulation (Chase et al., 2000). De plus, une fois fécondés, les ovocytes déficients pour Plc1 n'achèvent pas leur méiose – la reprise de la méiose étant normalement successive à la fécondation. En

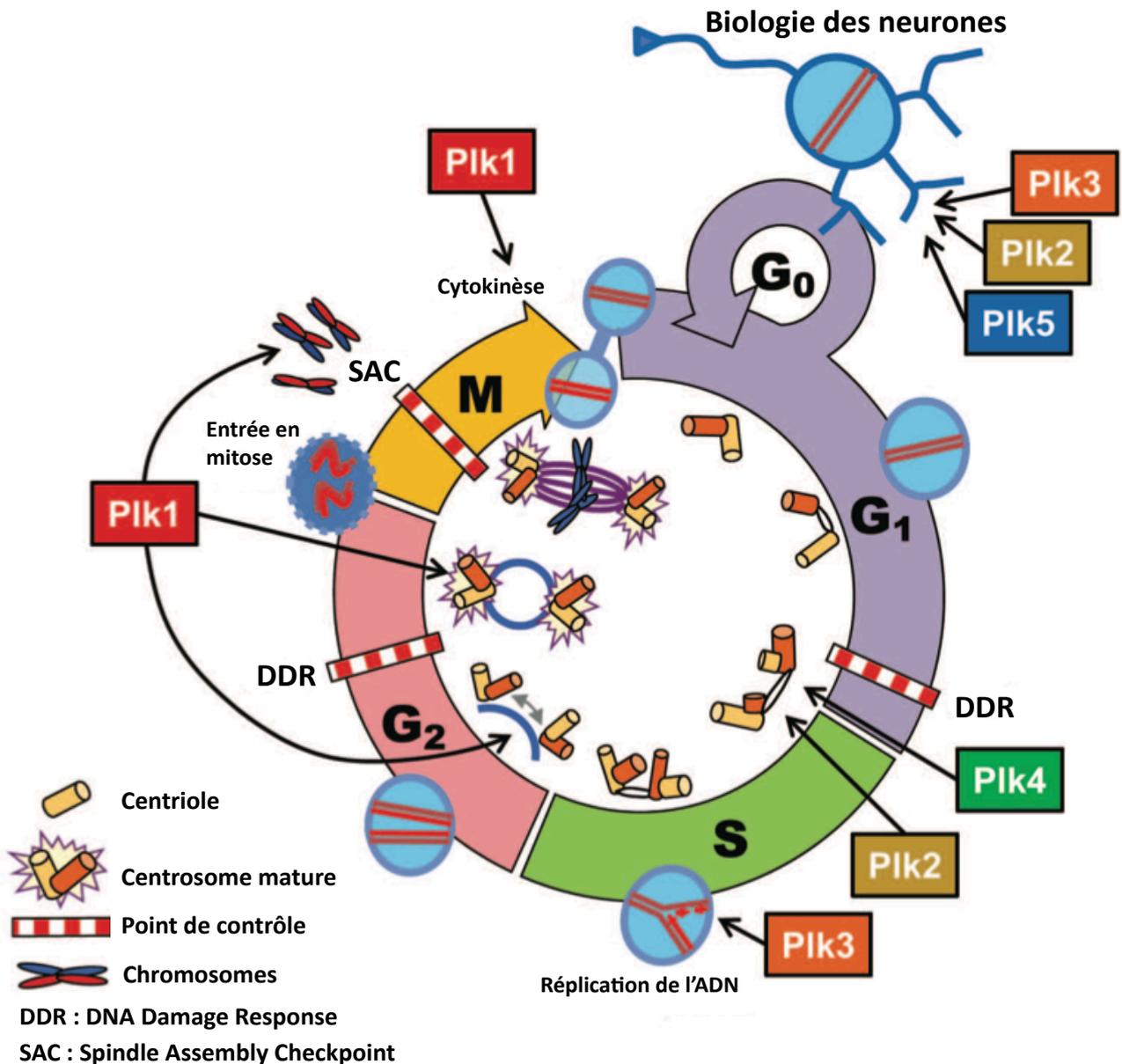


Figure 5 : Principales fonctions des Polo-like kinases de mammifères

Plk1, Plk2, Plk3 et Plk4 régulent diverses fonctions au cours du cycle cellulaire comme par exemple la duplication des centrosomes (Plk2 et Plk4), la réplication de l'ADN (Plk3), la séparation et la maturation des centrosomes (Plk1), l'entrée des cellules en mitose (Plk1), la formation du fuseau mitotique (Plk1), la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (Plk1). D'autre part, Plk2, Plk3 et Plk5 sont impliquées dans des fonctions cellulaires non-prolifératives comme par exemple la biologie des neurones (plasticité synaptique, différenciation neuronale).

(schéma adapté de de Carcer et al., 2011)

conséquence, le globule polaire n'est plus formé puis expulsé, ce qui entraîne un arrêt du développement embryonnaire. Deux autres orthologues de Polo ont été caractérisés ultérieurement chez le nématode : Plc3 et Zyg-1 (Chase et al., 2000 ; Pearson and Winey, 2010).

Plx1 (Polo-like kinase of *Xenopus laevis*) a été purifiée et clonée en 1996 à partir d'extraits d'œufs de xénope (Kumagai and Dunphy, 1996). Les auteurs de cette étude montrent que Plx1 phosphoryle et active Cdc25, une phosphatase dont l'activité est requise pour l'entrée des cellules en mitose, ce qui suggère un rôle de Plx1 dans la régulation de la progression mitotique. Plus tardivement trois autres protéines de la famille Polo ont été identifiées chez le Xénope : Plx2, Plx3 et Plx4 (Duncan et al., 2001 ; Eckerdt et al., 2011). Plx1, Plx2 et Plx3 sont activées dans les ovocytes et les œufs fécondés de xénope. Par la suite, leurs profils d'expression diffèrent à chaque stade embryonnaire, ce qui suggère des fonctions distinctes de ces paralogues au cours du développement (Duncan et al., 2001). Plx4 est quant à elle impliquée dans la formation des centrioles dans les ovocytes de xénope (Eckerdt et al., 2011).

L'orthologue murin de Polo, appelé Plk (Polo-like kinase), a été cloné en 1993 peu avant celui du gène humain codant Plk1 (Polo-like kinase 1) (Clay et al., 1993 ; Golsteyn et al., 1994 ; Hamanaka et al., 1995).

3. Les Polo-like kinases de mammifères

Cinq membres appartenant à la famille des Polo-like kinases (Plk1-5) ont été décrits chez les mammifères (de Carcer et al., 2011) (**Figure 5**). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine kinase en position N-terminale et d'un domaine appelé PBD (Polo-Box Domain), composé de deux boîtes Polo (ou une seule pour Plk4) en position C-terminale, qui régule la localisation subcellulaire de ces protéines. Malgré une grande homologie de structure, ces Polo-like kinases se différencient par leur régulation spatio-temporelle (expression et localisation subcellulaire), leur spécificité de substrat et leurs fonctions biologiques. Les données de la littérature montrent que ces Polo-like kinases sont des régulateurs cruciaux du cycle cellulaire aussi bien au cours de l'interphase (G1, S, G2) que pendant la mitose, mais qu'elles agissent également en réponse à un stress génotoxique, ou encore qu'elles sont impliquées dans la biologie des neurones.

Plk1 est le plus étudié et le mieux caractérisé des cinq membres de la famille des Polo-like kinases. C'est un acteur essentiel de la mitose qui a aussi d'autres fonctions au cours de l'interphase : initiation de la réplication de l'ADN, redémarrage du cycle suite à un arrêt causé par des dommages à l'ADN, régulation de la dynamique des microtubules, régulation de p53, inhibition de l'expression des interférons et de l'immunité innée antivirale (Petronczki et al., 2008 ; Takaki et al., 2008 ; Vitour et al., 2009 ; Liu et al., 2010). Dans la suite du manuscrit, ne sont décrites que les fonctions mitotiques de Plk1.

Par ailleurs l'inactivation de Plk1 (Plk1^{-/-}) dans des embryons de souris conduit à un arrêt du développement au stade 8 cellules, ce qui montre que le gène codant Plk1 est essentiel au développement embryonnaire (Lu et al., 2008). Par contre, les souris hétérozygotes (Plk1^{+/-}) sont viables et fertiles mais près de 30 % d'entre elles développent des tumeurs hépatiques et pulmonaires à un âge avancé.

Plk2, également dénommée Snk (Serum-inducible kinase), a été identifiée à l'origine comme un membre de la famille des Polo-like kinases de part sa grande homologie avec Plk1 (Simmons et al., 1992). La fonction principale de Plk2 est probablement celle d'un régulateur de la progression de la phase G1 et de la phase S, où l'expression et l'activité de la kinase sont maximales (Simmons et al., 1992 ; Ma et al., 2003). Le domaine en position C-terminale de Plk2, appelé Polo-Box Domain (PBD), régule sa localisation au niveau des centrosomes. Des mutations de résidus critiques de ce domaine entraînent une délocalisation de la kinase des centrosomes ainsi qu'une absence de duplication centriolaire (Cizmecioglu et al., 2008). Par ailleurs, la surexpression ou la déplétion de Plk2 entraînent respectivement une augmentation ou une diminution du nombre de centrosomes ce qui suggère que Plk2 est impliquée dans la régulation de la duplication des centrioles au cours de la phase S (Warnke et al., 2004).

En plus de sa fonction au cours de la phase G1/S, Plk2 semble pouvoir agir plus tardivement au cours du cycle cellulaire pour permettre l'activation de « checkpoints » cellulaires tel le point de contrôle de dommages à l'ADN ou le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique. A ces moments cruciaux l'expression de Plk2 est induite par le suppresseur de tumeur p53 (Shimizu-Yoshida et al., 2001 ; Burns et al., 2003).

Plk2 est également impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique. Elle est fortement exprimée dans des neurones où elle phosphoryle la protéine SPAR (Spine-Associated Rap guanosine triphosphatase-activating protein) ce qui entraîne sa dégradation protéolytique (Ang et al., 2008 ; Seeburg et al., 2008). Cette dernière est une protéine de liaison au cytosquelette d'actine, particulièrement présente dans les épines dendritiques neuronales dont

elle favoriserait la formation. Par ce mécanisme, Plk2 entraîne des modifications structurales des connexions synaptiques, à la base des phénomènes de plasticité synaptique (Pak and Sheng, 2003).

Enfin, les embryons de souris déficientes pour Plk2 (Plk2^{-/-}) sont viables bien que la croissance et le développement de leur squelette soient retardés. De plus, les cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) issues des souris Plk2^{-/-}, se divisent plus lentement que des MEF issues de souris WT ce qui est probablement dû à un retard d'entrée des cellules en phase S au cours du cycle cellulaire (Ma et al., 2003).

Plk3, a été identifiée à l'origine comme une kinase impliquée dans la prolifération des fibroblastes murins et fut appelée en conséquence Fnk (Fibroblast growth factor-inducible kinase) puis Prk (Prolifération-related kinase) (Donohue et al., 1995 ; Li et al., 1996). L'implication de Plk3 dans le cycle cellulaire est controversée du fait de plusieurs études décrivant des profils d'expression différents au cours du cycle cellulaire. En effet, alors que certains travaux montrent que la quantité de la protéine Plk3 est constante pendant le cycle, d'autres détectent une expression maximale de Plk3 pendant la mitose ou, à l'inverse, au cours de la phase G1 et pas pendant la mitose (Ouyang et al., 1997 ; Chase et al., 1998 ; Holtrich et al., 2000 ; Bahassi et al., 2002 ; Zimmerman and Erikson, 2007).

Plusieurs fonctions de Plk3 ont été décrites pendant le cycle cellulaire. Tout d'abord, Plk3 pourrait être impliquée dans la transition G1/S en régulant l'expression de la Cycline E (Zimmerman and Erikson, 2007). Deux études suggèrent par ailleurs que Plk3 régule la fragmentation de l'appareil de Golgi pendant la phase G2/M (Ruan et al., 2004 ; Lopez-Sanchez et al., 2009). Plk3 serait également importante pour réguler l'entrée des cellules en mitose en phosphorylant Cdc25C, induisant ainsi à son activation et à sa translocation nucléaire (Bahassi et al., 2004). Plk3 agirait aussi comme un acteur cellulaire important pour la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Concernant ce dernier point, il a en effet été montré que Plk3 est activée par la cascade de signalisation ATM lors de lésions de l'ADN ce qui lui permettrait d'activer p53 en le phosphorylant (Xie et al., 2001). Ces résultats suggèrent que lors d'un dommage à l'ADN, Plk3 induit l'arrêt du cycle cellulaire et déclenche l'apoptose via la voie ATM/p53. Une autre fonction de Plk3 serait également directement liée aux mécanismes de réparation de l'ADN en régulant l'activité de l'ADN polymérase δ (Xie et al., 2005).

Tout comme Plk2, Plk3 est constitutivement exprimée dans les neurones et phosphoryle la protéine SPAR ce qui laisse penser que Plk3 est impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique (Kauselmann et al., 1999 ; Pak and Sheng, 2003).

Plusieurs études indiquent que Plk3 pourrait être un suppresseur de tumeur, son expression étant réprimée dans certains cancers (poumon, cerveau, cou) et son gène étant situé dans une région chromosomique souvent impliquée dans la perte de l'hétérozygotie de cellules tumorales (Li et al., 1996 ; Dai et al., 2000). Par ailleurs, des souris déficientes pour Plk3 (Plk3^{-/-}) sont viables mais subissent à un âge avancé une augmentation de masse corporelle et développent des tumeurs dans de nombreux organes (poumon, rein, foie, utérus) (Yang et al., 2008).

Plk4, aussi connue sous le nom de Sak (Snk akin kinase) ou Stk18 est, d'un point de vue structural, la plus divergente des cinq membres de la famille des Polo-like kinases car elle ne possède qu'une seule boîte Polo dans sa partie C-terminale (au lieu de deux pour les autres Plk) (Fode et al., 1994 ; de Carcer et al., 2011). Tout comme celle de Plk1, l'expression de Plk4 est faible au cours de la phase G1, augmente progressivement à partir de la phase S et est maximale pendant la mitose (Sillibourne et al., 2010).

Plusieurs travaux montrent que Plk4 est impliquée dans la régulation de la duplication des centrosomes au cours du cycle cellulaire (Habedanck et al., 2005 ; Bettencourt-Dias et al., 2005 ; Sillibourne et al., 2010). En effet, des expériences « gain de fonction » comme « perte de fonction » ont clairement montré que la présence de Plk4 est requise pour la duplication des centrioles. D'ailleurs, la surexpression de Plk4 dans des cellules de drosophiles ou humaines entraîne la formation d'un nombre anormalement élevé de centrosomes. D'un point de vue mécanistique, Plk4 pourrait recruter SAS-6 et SAS-5, deux protéines nécessaires à l'assemblage et à l'élongation du précurseur cylindrique du centriole (Rodrigues-Martins et al., 2008).

Par ailleurs, une autre étude montre que l'inactivation de Plk4 dans des cellules embryonnaires de souris entraîne une augmentation de la proportion de cellules aux stades tardifs de la mitose (anaphase et télophase) ; ces cellules exprimant des taux importants de Cycline B. Ces travaux suggèrent que Plk4 est requise pour permettre la dégradation de la Cycline B par le complexe ubiquitine ligase APC/C, cette dégradation étant nécessaire pour la sortie de la mitose (Hudson et al., 2001).

Plus récemment, Li et ses collaborateurs montrent que l'expression de Plk4 est réprimée par le suppresseur de tumeur p53, cette répression étant nécessaire pour l'induction de l'apoptose médiée par p53 (Li et al., 2005).

Enfin, l'invalidation de Plk4 (Plk4^{-/-}) dans des embryons de souris est létale au stade E7.5. Des souris hétérozygotes (Plk4^{+/-}) sont par contre viables bien que certaines d'entre elles développent des tumeurs hépatiques (30%) ou pulmonaires (15%) (Ko et al., 2005).

Plk5 est la dernière des Polo-like kinases à avoir été caractérisée dans des cellules murines (mPlk5) et humaines (hPlk5) (Andrysiak et al., 2010). L'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques a révélé que Plk5 présente davantage d'homologie avec Plk2 et Plk3 qu'avec Plk1 et Plk4. De manière cohérente avec ces observations, tout comme Plk2 et Plk3, l'expression de mPlk5 est induite en réponse à des dommages à l'ADN.

mPlk5 est localisée au niveau des nucléoles. La délétion de la séquence putative de localisation nucléolaire, dans la première partie de l'extrémité N-terminale, délocalise Plk5. La surexpression de mPlk5 entraîne une accumulation des cellules en G1 et déclenche l'apoptose mais, contrairement à Plk2 et Plk3, indépendamment de p53 (Andrysiak et al., 2010).

De manière intéressante, à la différence de mPlk5, la séquence codante du gène hPlk5 comporte un codon STOP prématuré suivi d'une seconde phase ouverte de lecture ce qui conduit à la production d'une protéine catalytiquement inactive, contenant un tiers du domaine kinase suivi du domaine PBD (Andrysiak et al., 2010). A la différence des autres Polo-like kinases, hPlk5 ne semble pas être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Son expression est réprimée dans les cellules prolifératives alors que la protéine s'accumule dans les cellules quiescentes (G0). Chez l'Homme, Plk5 est principalement exprimée au sein du tissu nerveux où elle régule la formation des neurites (axones, dendrites) (de Carcer et al., 2011). De plus, l'expression de Plk5 est réprimée dans des tumeurs du cerveau comme le glioblastome et la réexpression de Plk5 dans ces cellules tumorales empêche la prolifération cellulaire.

CHAPITRE 2 : POLO-LIKE KINASE 1

I. Structure de Plk1

1. Le domaine kinase de Plk1
2. Le domaine PBD de Plk1
3. Interaction intramoléculaire entre le domaine kinase et le domaine PBD
4. Localisation nucléaire de Plk1
5. Dégradation de Plk1

II. Régulation de l'activité de Plk1

1. Régulation transcriptionnelle de Plk1
 - A. Activation transcriptionnelle du promoteur de Plk1
 - B. Répression transcriptionnelle du promoteur de Plk1
 - C. Les facteurs de transcription E2F : Activateurs & Répresseurs
2. Régulation de Plk1 : phosphorylation vs déphosphorylation
 - A. Phosphorylation et déphosphorylation de la thréonine 210 de Plk1
 - B. Phosphorylation de la sérine 137 et de la sérine 49
3. Régulation de la localisation subcellulaire de Plk1 par le domaine PBD
4. Dégradation protéolytique de Plk1
 - A. Ubiquitination de Plk1 par Chfr
 - B. Ubiquitination de Plk1 par le complexe APC/C

III. Fonctions de Plk1 au cours de la mitose

1. Plk1 régule l'entrée des cellules en mitose
2. Plk1 régule la fragmentation de l'appareil de Golgi
 - A. Généralités sur l'appareil de Golgi
 - B. Fragmentation de l'appareil de Golgi en mitose
3. Plk1 régule la maturation des centrosomes et la mise en place du fuseau mitotique
4. Plk1 régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C
5. Plk1 régule la séparation des chromosomes en anaphase
 - A. Fonction du kinétochore en mitose
 - B. Evidences du rôle de Plk1 aux kinétochores
 - C. Recrutement de Plk1 aux kinétochores
 - D. Fonctions de Plk1 aux kinétochores

6. Plk1 régule la cytokinèse

- A. Définition de la cytokinèse
- B. Evidences du rôle de Plk1 dans la cytokinèse
- C. Plk1 régule la formation et la contraction de l'anneau d'actomyosine
- D. Plk1 régule l'abscission

IV. Plk1 et cancers

- 1. Rôle de Plk1 dans la transformation oncogénique**
- 2. Plk1, une cible thérapeutique dans les cancers ?**
- 3. Le BI 2536, un inhibiteur de Plk1**

CHAPITRE 2 : POLO-LIKE KINASE 1

Plk1 est une protéine kinase qui joue un rôle clef au cours de la mitose, de la prophase à la cytokinèse (**Figure 6**). L'expression, l'activité et la localisation de cette kinase sont régulées de façon très fine pendant le cycle cellulaire et des dérégulations de son expression ont été décrits dans un grand nombre de cancers.

I. Structure de Plk1

Plk1 est une sérine/thréonine kinase composée de 603 acides aminés avec un poids moléculaire de 66 kDa. Plk1 possède un domaine kinase dans sa partie N-terminale et un domaine Polo-Box (Polo-Box Domain, PBD) dans sa partie C-terminale, caractéristique des membres de la famille des Polo-like kinases (**Figure 7**).

Le domaine kinase porte l'activité catalytique de la protéine alors que le domaine PBD est un motif d'interaction protéine-protéine qui permet d'une part à Plk1 d'interagir avec ses substrats et d'autre part de cibler Plk1 au niveau de différentes structures subcellulaires pendant la mitose (centrosomes, kinétochores, fuseau central, midbody).

1. Le domaine kinase de Plk1

Le domaine kinase de Plk1 est localisé entre les acides aminés 53 et 305 de la partie N-terminale de la protéine et permet la phosphorylation de protéines cibles sur des sérines ou des thréonines (Petronczki et al., 2008).

L'analyse des séquences des substrats connus de Plk1 et des expériences de phosphorylation *in vitro* sur différents peptides mutés dérivés de Cdc25C (un substrat de Plk1) ont permis de définir une séquence consensus de phosphorylation : D/E-X-S/T- ϕ -X-D/E (ϕ , un acide aminé hydrophobe et X, n'importe quel acide aminé) (Nakajima et al., 2003).

La plupart des résidus indispensables à l'activité kinase de Plk1 ont été identifiés par homologie de séquence avec d'autres kinases. Par exemple, l'acide aspartique en position 194 est important pour l'activité catalytique de Plk1 et fut identifié par homologie avec la séquence des kinases Cdk. De fait, la mutation de cet acide aspartique abolit l'activité kinase des Cdk et de Plk1 (Lee and Erikson, 1997).

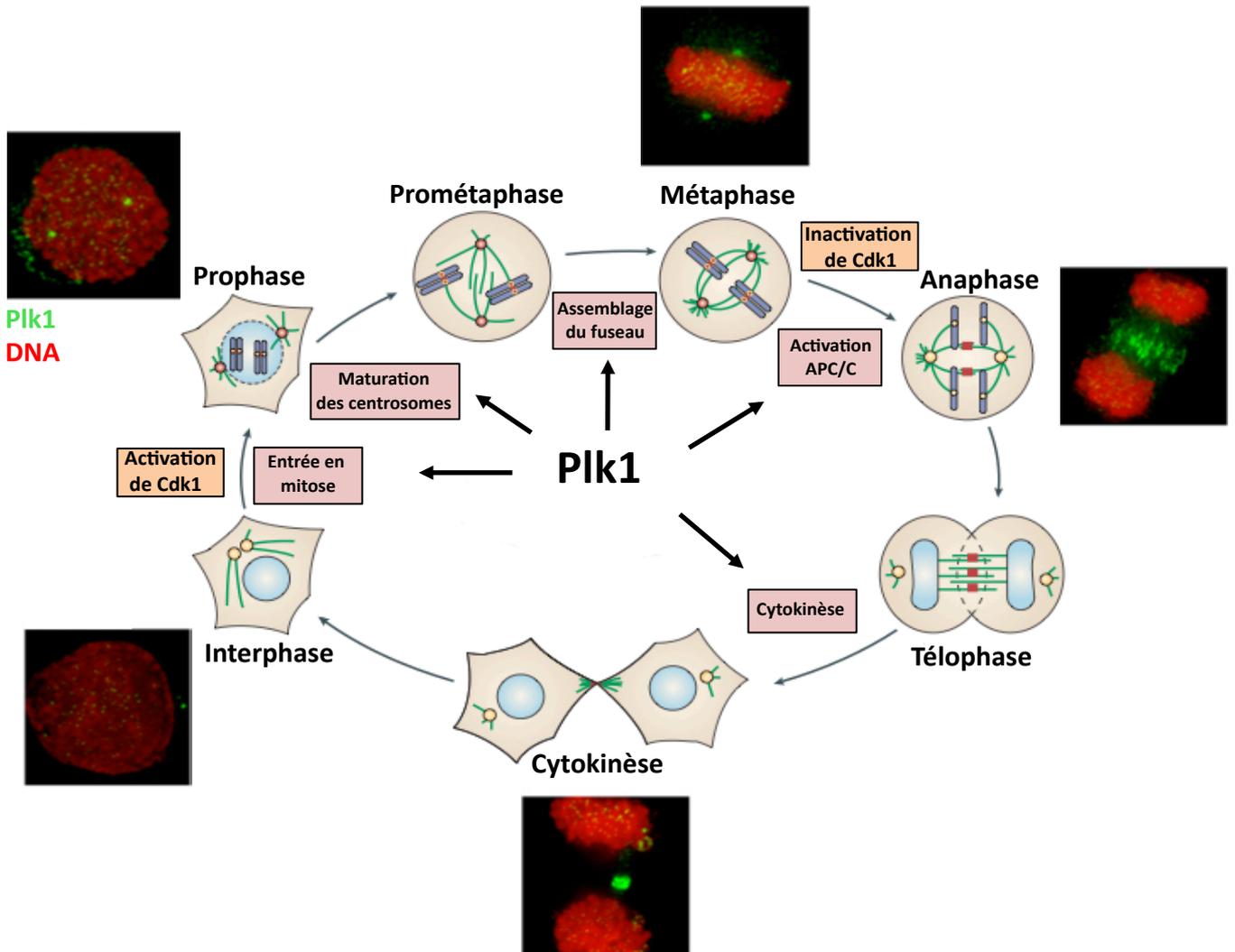


Figure 6 : Localisations et fonctions de Plk1 pendant la mitose

Plk1 (vert) est localisée aux centrosomes pendant la prophase, aux centrosomes et aux kinétochores pendant la métaphase, au fuseau central pendant l'anaphase et au niveau du pont intercellulaire pendant la cytokinèse.

Un autre résidu critique pour l'activité de Plk1 est la lysine en position 82, localisée dans la poche de liaison de l'ATP (Lee et al., 1995). Par conséquent la mutation de ce résidu (Plk1 K82M) abolit totalement l'activité kinase de Plk1. La surexpression de ce mutant dans des cellules retarde l'entrée en mitose puis provoque un arrêt mitotique dû à une compétition de substrat avec la forme endogène de Plk1 (Jang et al., 2002).

La thréonine 210 est également un résidu clef pour l'activité de Plk1. La phosphorylation de ce résidu, situé dans la boucle d'activation (T-loop), induit un changement de conformation de Plk1 qui passe d'un état « replié » à un état « ouvert », lui permettant d'interagir avec ses substrats et de les phosphoryler (Jang et al., 2002 ; Lowery et al., 2005).

La sérine 137 est également importante pour réguler l'activité de Plk1 et la phosphorylation de cet acide aminé pourrait modifier la spécificité du domaine kinase vis-à-vis de ses substrats et conduire à la phosphorylation de cibles alternatives de Plk1 (Lowery et al., 2005).

En effet, plusieurs travaux montrent que la surexpression de mutants phosphomimétiques Plk1 T210D ou Plk1 S137D – pour lesquels la thréonine 210 ou la sérine 137 ont été mutées en acide aspartique – provoque une augmentation de l'activité kinase et une entrée prématurée des cellules en mitose (van de Weerd et al., 2005).

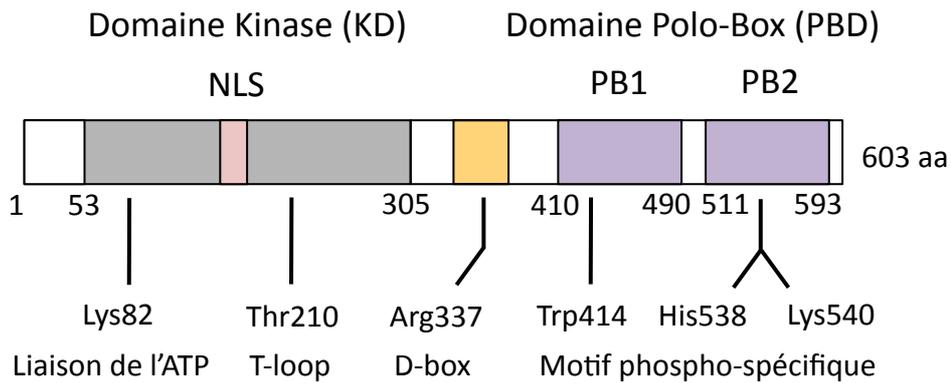
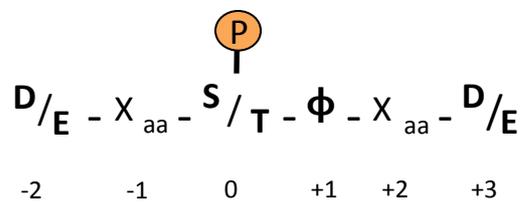
Plk1 ne phosphoryle pas uniquement d'autres protéines mais semble également pouvoir s'auto-phosphoryler (Hamanaka et al., 1995).

Des expériences montrent en effet que Plx1 (l'homologue de Plk1 chez le xénope) s'auto-phosphoryle sur les sérines en position 260 et 326 (Kelm et al., 2002). Ces résidus sont conservés chez Plk1 en position 269 et 335 mais aucune étude n'a jusqu'à présent montré que Plk1 s'auto-phosphoryle *in vivo*. L'auto-phosphorylation permettrait à Plk1 de stimuler sa propre activité kinase.

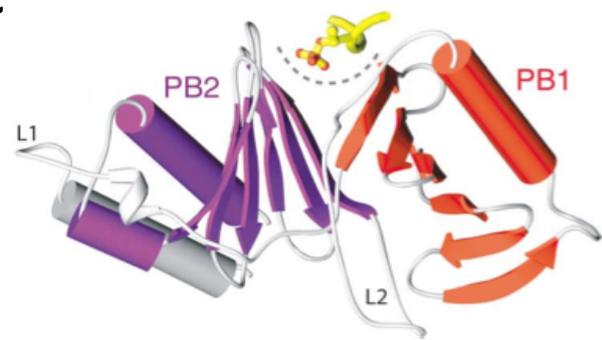
2. Le domaine PBD de Plk1

Le domaine Polo-Box (Polo-Box Domain, PBD) de Plk1 est situé entre les acides aminés 407 et 594 de la partie C-terminale de la protéine et se compose de deux boîtes Polo, respectivement Polo-Box 1 (PB1, aa 410-490) et Polo-Box 2 (PB2, aa 511-593) (Petronczki et al., 2008).

Il s'agit d'un domaine important pour la fonction de Plk1 qui régule la localisation subcellulaire et l'interaction de Plk1 avec ses substrats.

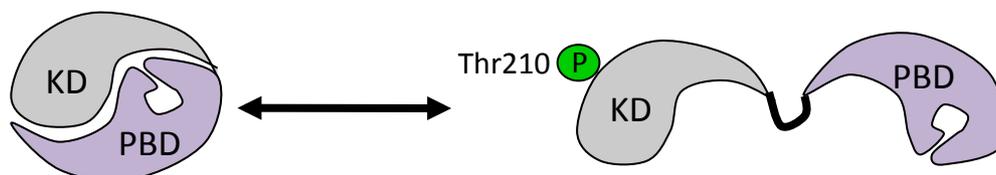
A**B**

ϕ : aa hydrophobe

C**D**

Conformation inactive de Plk1

Conformation active de Plk1



KD : Kinase Domain
PBD : Polo-Box Domain

Figure 7 : Structure de Plk1

- A. Principaux domaines de Plk1
- B. Séquence consensus de phosphorylation par Plk1
- C. Structure du PBD de Plk1
- D. Conformations de Plk1

Les premières études sur la fonction du PBD datent de 1998, lorsque Lee et ses collaborateurs observent qu'une mutation ponctuelle du domaine PBD (qui n'altère pas l'activité kinase proprement dite) affecte la localisation subcellulaire et abolit les fonctions mitotiques de Plk1 (Lee et al., 1998).

Le mécanisme moléculaire de l'interaction entre le domaine PBD de Plk1 et ses substrats a été mis en évidence en 2003 (Elia et al., 2003). Cette étude montre que le PBD de Plk1 est un domaine de liaison à un motif phospho-peptidique spécifique, préalablement phosphorylé sur une sérine ou sur une thréonine.

L'analyse d'une banque de peptides a permis de déterminer le motif phospho-peptidique optimal reconnu par le PBD : Ser-pSer/pThr-Pro. De façon intéressante, la séquence Ser-Ser/Thr-Pro correspond au site consensus de phosphorylation par Cdk1.

Par conséquent, comme nous le verrons dans de nombreux exemples tout au long de ce manuscrit, Cdk1 est bien souvent la kinase initiateur (ou la « priming kinase ») qui phosphoryle un de ces substrats sur une sérine ou une thréonine, générant ainsi un motif d'ancrage reconnu par le PBD de Plk1 (Elia et al., 2003).

La structure cristallographique du PBD a montré que les boîtes Polo forment les deux parois d'un sillon dans lequel le phospho-peptide est pris en tenaille (Elia et al., 2003 ; Cheng et al., 2003). A l'intérieur de ce sillon, seuls les résidus histidine 538 et lysine 540 du PBD interagissent directement avec le groupe phosphate du motif peptidique phosphorylé (Elia et al., 2003). Par conséquent, la mutation de ces deux résidus respectivement en alanine et en méthionine (Plk1 H538A/K540M) empêche l'interaction du PBD avec ses partenaires phosphorylés et entraîne une délocalisation de la kinase pendant la mitose (Elia et al., 2003). Les acides aminés tryptophane 414, valine 415 et leucine 427 sont également des résidus clés pour réguler la localisation de Plk1. Les données de cristallographie montrent en effet que le tryptophane 414 est critique pour l'interaction du PBD avec ses ligands tandis que les résidus valine 415 et leucine 427 sont importants pour stabiliser la structure du domaine (Elia et al., 2003 ; Cheng et al., 2003).

3. Interaction intramoléculaire entre le domaine kinase et le domaine PBD

Les premiers indices de l'existence d'une interaction intramoléculaire entre le domaine kinase et le domaine PBD viennent d'une expérience de délétion de la partie C-terminale de Plk1 qui augmente considérablement son activité kinase, suggérant que le PBD

inhibe le domaine catalytique (Mundt et al., 1997 ; Lee and Erikson, 1997 ; Jang et al., 2002). En fait, dans sa forme inactive, Plk1 adopte une conformation dite « repliée » dans laquelle le domaine kinase est inhibé par une interaction intramoléculaire avec le domaine PBD (Jang et al., 2002). Réciproquement, dans cette conformation inactive, le domaine kinase empêche également toute interaction entre le domaine PBD et ses partenaires phosphorylés. L'ensemble de ces données montre donc que cette interaction intramoléculaire inhibe les fonctions de chacun des deux domaines (Elia et al., 2003).

Par ailleurs, l'interaction intramoléculaire entre le PBD et le domaine kinase est inhibée lorsque Plk1 est phosphorylée sur la thréonine 210 en mitose ou lorsque la thréonine est mutée par un acide aspartique (mutant phosphomimétique de Plk1, Plk1 T210D) (Jang et al., 2002 ; Lowery et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210 dissocie l'interaction intramoléculaire inhibitrice entre le domaine kinase et le domaine PBD.

4. Localisation nucléaire de Plk1

Dans les cellules en phase G2, Plk1 est localisée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Plk1 possède, au sein du domaine kinase, une séquence de localisation nucléaire NLS bipartite (Nuclear Localization Signal) qui régule la translocation nucléaire de Plk1 pendant la mitose (Taniguchi et al., 2002). En effet, les séquences comprises entre les acides aminés 134-136 (Arg-Arg-Arg) et 143-146 (Lys-Arg-Arg-Lys) sont nécessaires et suffisantes pour permettre la localisation nucléaire de Plk1. Par conséquent, l'expression d'un mutant de Plk1 (Plk1 7A), pour lequel l'ensemble des arginines et des lysines qui composent ce NLS est muté en alanine, bloque l'accumulation nucléaire de Plk1 et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G2.

5. Dégradation de Plk1

Plk1 possède également un motif consensus de dégradation appelé Destruction-box ou D-box (Arg₃₃₇-X-X-Leu₃₄₀) situé entre le domaine kinase et le domaine PBD. La mutation de ce motif (Plk1 R337A/L340A) stabilise Plk1 pendant l'anaphase ce qui retarde la sortie des cellules de mitose (Lindon and Pines, 2004).

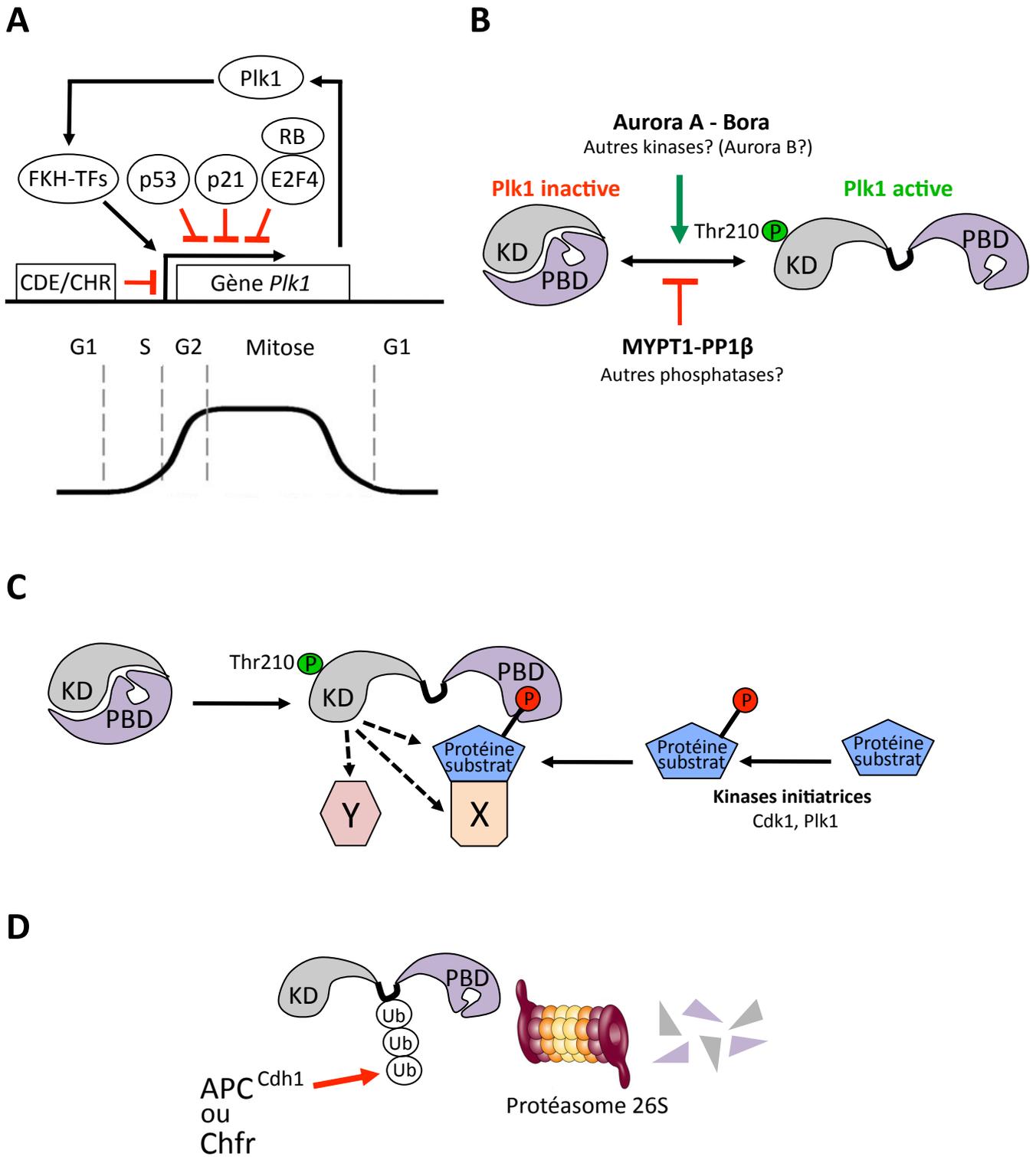


Figure 8 : Les différents mécanismes de régulation de Plk1

- A. Régulation transcriptionnelle
- B. Phosphorylation vs déphosphorylation
- C. Régulation de l'interaction de Plk1 avec ses partenaires
- D. Dégradation protéolytique

II. Régulation de l'activité de Plk1

L'expression et l'activité de la protéine Plk1 varient au cours du cycle cellulaire : elles sont minimales en phase G1, et maximales à la transition G2/M (Golsteyn et al., 1995 ; Hamanaka et al., 1995). Des événements complexes assurant une régulation fine de l'activité de Plk1 se produisent de façon spatio-temporelle durant le cycle cellulaire. Au niveau temporel, l'expression de Plk1 est d'abord régulée au niveau transcriptionnel, puis l'activité de la protéine est modulée par phosphorylation ou dégradation par protéolyse. Au niveau spatial, l'activité de Plk1 dépend de sa localisation subcellulaire et de ses interactions avec ses protéines cibles (**Figure 8**).

1. Régulation transcriptionnelle de Plk1

Le contrôle transcriptionnel de Plk1 est un processus clef de la régulation de l'expression de Plk1. En effet, la transcription du gène codant pour Plk1 varie lors des différentes phases du cycle cellulaire : la quantité d'ARN messager codant pour Plk1 est faible durant la phase G1, augmente progressivement pendant la phase S et la phase G2 et est maximale lors de la transition G2/M – où l'on observe jusqu'à huit fois plus de transcrits qu'en phase G1 – correspondant au pic d'activité de Plk1. En fin de mitose la transcription de Plk1 décroît rapidement pour revenir à un niveau basal avant le début du cycle suivant (Lee et al., 1995 ; Uchiumi et al., 1997).

L'analyse du promoteur de Plk1 a permis d'identifier des séquences consensus de fixation de divers facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs.

A. Activation transcriptionnelle du promoteur de Plk1

Les facteurs de transcription de la famille Forkhead (FKH-TF pour Forkhead transcription factor) activent la transcription de Plk1 en se liant à leurs sites de fixation (FKH binding sites) situés dans la région -375/-724 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Alvarez et al., 2001). Des expériences de chromatine-immunoprécipitation ont montré que ces facteurs de transcription interagissent avec le promoteur de Plk1. *Ex vivo*, la surexpression des facteurs Forkhead dans des cellules NIH3T3 augmente les niveaux d'ARN messager de Plk1 et par conséquent la quantité de protéine exprimée.

Parmi ces facteurs de transcription, FoxM1 (Forkhead Box M1) – dont l'expression est elle-même variable au cours du cycle cellulaire – est connu pour activer la transcription de Plk1 spécifiquement pendant la phase G2 (Laoukili et al., 2005). De façon intéressante, Plk1 phosphoryle certains facteurs de la famille Forkhead (dont FoxM1) lors de la transition G2/M, ce qui renforce leur activité transcriptionnelle et par conséquent la transcription de Plk1 (Fu et al., 2008).

Un autre exemple d'activateur de l'expression de Plk1 est le facteur de transcription FOXO1 qui appartient à une sous-classe de la famille Forkhead. Lors de la transition G2/M, FOXO1 est phosphorylé par Cdk1 sur la sérine 249 – au sein du domaine Forkhead – ce qui le dissocie des protéines 14-3-3 qui le séquestrent dans le cytoplasme. Cette phosphorylation permet l'accumulation de FOXO1 dans le noyau où il va induire l'expression de ses gènes cibles, dont Plk1 (Yuan et al., 2008).

B. Répression transcriptionnelle du promoteur de Plk1

A l'inverse, la transcription de Plk1 est réprimée durant la phase G1, majoritairement via un élément répresseur bipartite appelé CDE/CHR (Cell cycle-Dependent Element/Cell cycle genes Homology Region), dont la séquence est située juste en amont du site d'initiation de la transcription (Uchiumi et al., 1997). En effet, des mutations de cet élément répresseur dans la séquence promotrice de Plk1 entraîne une perturbation de la régulation de la transcription de Plk1 au cours du cycle cellulaire, avec des niveaux d'ARN messager plus élevés lors de la phase G1.

Par contre, les facteurs de transcription susceptibles de se lier à cette séquence et d'inhiber la transcription de Plk1 n'ont pas clairement été identifiés.

De façon intéressante, on retrouve ces séquences CDE/CHR dans les promoteurs de divers autres agents du cycle cellulaire impliqués dans la transition G2/M – tels que la Cycline B, Cdk1, Aurora A et Cdc25C – ce qui suggère un rôle crucial de ces éléments répresseurs dans la régulation de la transcription de gènes spécifiquement impliqués dans le cycle cellulaire. Dans le cas de Cdc25C, le facteur de transcription qui se lie à l'élément répresseur est CDF-1 (CDE/CHR binding Factor-1) (Zwicker et al., 1998). Parmi d'autres facteurs, CDF-1 pourrait également intervenir dans l'inhibition de la transcription de Plk1 pendant la phase G1.

Le facteur de transcription p53, un suppresseur de tumeur crucial qui contrôle l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, réprime la transcription de Plk1 dans des cellules

cancéreuses (Jackson et al., 2005 ; Incassati et al., 2006). Etant donné que la déplétion de Plk1 inhibe la prolifération cellulaire et entraîne l'apoptose – toujours dans des cellules cancéreuses – on peut penser qu'un des mécanismes par lesquels p53 induit l'apoptose est la répression de l'expression de Plk1.

p53 réprime la transcription de Plk1 par deux mécanismes.

D'une part, il a été montré qu'il peut se fixer directement sur la séquence promotrice de Plk1 au niveau de deux séquences consensus, respectivement p53RE1 et p53RE2 (p53 Responsive Element). L'interaction de p53 avec p53RE2 permettrait le recrutement d'une histone déacétylase qui réprimerait l'expression de Plk1 (McKenzie et al., 2010).

D'autre part, p53 pourrait également agir indirectement sur l'expression de Plk1.

p53 est par exemple connu pour inhiber la transcription de Cdc25C en se liant directement au promoteur, ou en agissant via d'autres facteurs (non identifiés) qui se fixent à l'élément CDE/CHR. On peut donc supposer que p53 régule aussi la transcription de Plk1 via ces mêmes séquences CDE/CHR.

p21, dont l'expression est induite directement par p53, est un inhibiteur du cycle cellulaire qui réprime la transcription de Plk1 (Zhu et al., 2002). Cette répression se fait via l'élément bipartite CDE/CHR, puisque des mutations de cet élément abolissent l'inhibition de la transcription de Plk1 induite par p21. On peut aisément supposer que p21 est un des intermédiaires par lesquels p53 inhibe indirectement la transcription de Plk1. Un mécanisme similaire a été décrit dans le cas de la répression transcriptionnelle de Cdk1 par p53 qui est médiée par l'expression de p21 (l'expression de p21 induite par p53 est d'ailleurs suffisante pour cette répression de Cdk1) (Taylor et al., 2001). Dans tous les cas, on ne sait via quels facteurs de transcription p21 agit sur les éléments CDE/CHR.

C. Les facteurs de transcription E2F : Activateurs & Répresseurs

Les facteurs de transcription de la famille E2F régulent également la transcription de Plk1. Ils se fixent sur une séquence appelée « E2F binding site », située dans la région -131/-122 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Au sein de cette famille E2F, on trouve aussi bien des activateurs que des inhibiteurs de la transcription de Plk1.

Le facteur E2F4 est par exemple connu pour inhiber la transcription de Plk1 lorsqu'il est associé aux protéines p107/p130 de la famille de la protéine du Rétinoblastome (pRB). L'interaction du complexe p107/p130/E2F4 avec le promoteur de Plk1 entraîne le

recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF qui déacétyle les histones et répriment la transcription du gène Plk1 (Gunawardena et al., 2004).

A l'inverse, les facteurs E2F1 et E2F2 sont des régulateurs positifs du promoteur de Plk1 (Tategu et al., 2008).

2. Régulation de Plk1 : phosphorylation vs déphosphorylation

A. Phosphorylation et déphosphorylation de la thréonine 210 de Plk1

Phosphorylation de la thréonine 210 par Aurora A

A l'instar de nombreuses kinases mitotiques, l'activité de Plk1 est également régulée par phosphorylation. Cette phosphorylation se produit au niveau de la thréonine 210 située dans la boucle d'activation (T-loop) de Plk1, un résidu équivalent à la thréonine 201 de Plx1, l'homologue de Plk1 chez le xénope (Qian et al., 1999 ; Jang et al., 2002). Un mutant phosphodéficient de Plk1, dont la thréonine 210 est mutée en alanine, abroge l'activité de la kinase, tandis qu'un mutant phosphomimétique, dont la thréonine 210 est mutée en acide aspartique, provoque une entrée prématurée et une sortie retardée des cellules en mitose (Qian et al., 1999 ; Lindon and Pines, 2004 ; Macurek et al., 2008). Ces données, ajoutées au fait que le résidu thréonine 210 est très conservé parmi l'ensemble des membres de la famille des Plks, suggèrent que ce site de phosphorylation est crucial pour l'activation de ces kinases. Cette phosphorylation de Plk1 dissocie une interaction intramoléculaire, entre le domaine kinase et le domaine Polo-Box, qui inhibe les fonctions de chacun de ses deux domaines (Jang et al., 2002 ; Lowery et al., 2005).

Deux études indépendantes, publiées dans Nature et Science, identifient la protéine Aurora A comme la kinase initiatrice de l'activation de Plk1 au cours de la phase G2 (Macurek et al., 2008 ; Seki et al., 2008). Cette activation requiert également la protéine Bora, un cofacteur d'Aurora A, identifiée chez *D. melanogaster* (Hutterer et al., 2006). Ainsi, Bora s'accumule au cours de la phase G2 et interagit avec le domaine Polo-Box de Plk1. Cette interaction induit un changement de conformation de Plk1 ce qui permet à Aurora A de phosphoryler Plk1 sur la thréonine 210 et de l'activer (Seki et al., 2008).

De façon intéressante, Plk1 régule sa propre activation par Aurora A en agissant directement sur Bora. En effet, suite à sa phosphorylation par Aurora A, Plk1 phosphoryle Bora en début de mitose. Cette phosphorylation de Bora permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase β -TrCP, la polyubiquitination de Bora et sa dégradation finale par le protéasome avant même la fin de la mitose (Chan et al., 2008 ; Seki et al., 2008).

Sachant que Plk1 a également un rôle crucial à la fin de la mitose et lors de la cytokinèse, et sachant aussi que le complexe Aurora A – Bora n'est plus actif en fin de mitose, on peut supposer qu'une ou plusieurs autres kinases pourraient phosphoryler et activer Plk1 sur la thréonine 210 dans ces étapes finales de la division cellulaire. Cette hypothèse est confortée par une étude montrant que lors de l'inhibition de Bora et Aurora A, l'activation de Plk1 est retardée mais toujours présente en fin de mitose (Macurek et al., 2008).

Cette autre kinase pourrait être Aurora B. En effet, une étude récente montre que Aurora B phosphoryle et active Polo (l'homologue de Plk1 chez la drosophile) au niveau des centromères (Carmena et al., 2012). Cette phosphorylation, indépendante de l'activité d'Aurora A, est critique pour la fonction de Polo aux kinétochores pendant la prométaphase. Chez les mammifères, Plk1 et Aurora B sont par ailleurs décrites comme interagissant au cours de la métaphase au niveau des centromères, et sont toutes deux impliquées dans la régulation de l'alignement des chromosomes (Rosasco-Nitcher et al., 2008). Plus tardivement, les deux protéines colocalisent au niveau du fuseau mitotique et au midbody au cours de la cytokinèse. Toutefois, aucune donnée ne montre précisément qu'Aurora B phosphoryle Plk1.

Déphosphorylation de la thréonine 210 par MYPT1-PP1 β

Sachant que les processus de phosphorylation sont réversiblement contrôlés par les déphosphorylations, il n'est pas surprenant que Plk1 soit inactivée par déphosphorylation sur le même résidu thréonine 210.

Une étude publiée en 2008, montre que l'activation de Plk1 est contrebalancée par la phosphatase MYPT1-PP1 β (Yamashiro et al., 2008). Ce complexe est composé d'une sous-unité régulatrice appelée MYPT1 (Myosin Phosphatase-Targeting subunit 1) et d'une sous-unité catalytique PP1 β (Protein Phosphatase 1 β). Ces travaux montrent que la déplétion de MYPT1 mène à une augmentation de la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210 et de

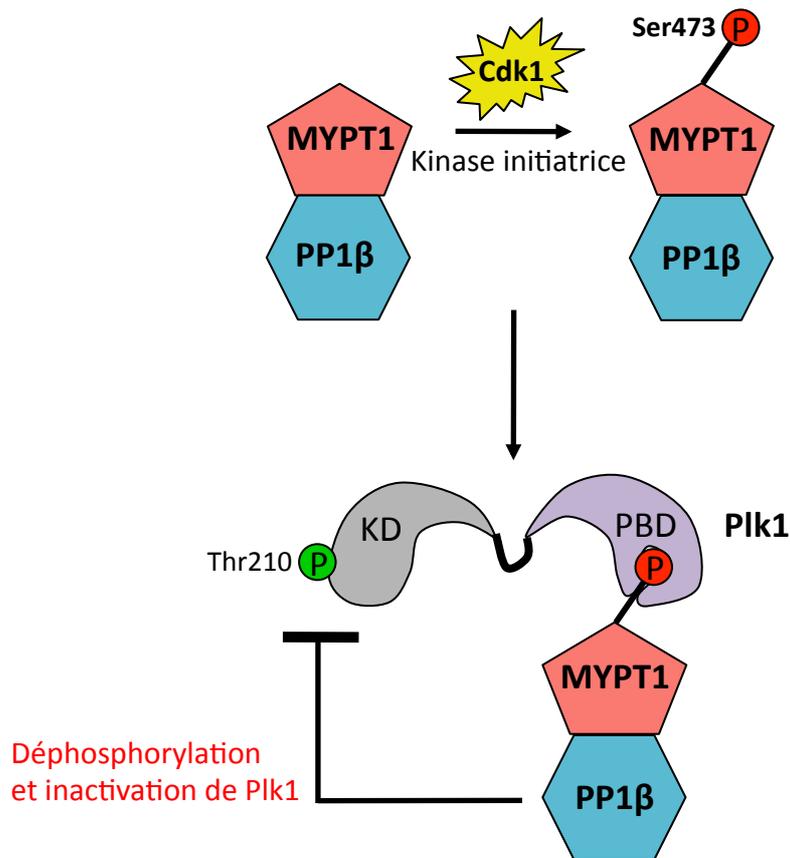


Figure 9 : Inactivation de Plk1 par le complexe phosphatase MYPT1-PP1β

Au cours de la mitose, MYPT1 est phosphorylé par Cdk1 sur la sérine 473. Cette phosphorylation entraîne l'interaction entre MYPT1 et Plk1 via son domaine PBD. Puis PP1β déphosphoryle et inactive Plk1.

l'activité de la kinase. MYPT1-PP1 β est par ailleurs capable de déphosphoryler Plk1 sur la thréonine 210 *in vitro*. D'autre part, dans un contexte de déplétion partielle de Plk1, la déplétion supplémentaire de MYPT1 restaure les fonctions mitotiques de Plk1, suggérant à nouveau l'antagonisme entre MYPT1 et Plk1. D'un point de vue mécanistique, le mécanisme conduisant à l'inactivation de Plk1 est le suivant : MYPT1 est phosphorylé par Cdk1 sur la sérine 473 ce qui permet son interaction avec le domaine Polo-Box de Plk1 et la déphosphorylation de la thréonine 210 de Plk1 par PP1 β (**Figure 9**).

L'activité phosphatase de MYPT1-PP1 β est elle-même contrôlée par des phosphorylations inhibitrices de la sous-unité MYPT1 par différentes kinases : la ZIP-like kinase, la Rho-kinase (ROCK), PAK et Aurora B (Hartshorne et al., 2004). Ces kinases pourraient donc réguler l'activité de Plk1 de façon spatiotemporelle au cours de la division cellulaire. Par exemple, les kinases Rho, localisées au niveau des centrosomes, pourraient phosphoryler et inhiber MYPT1-PP1 β à cet endroit, conduisant en conséquence à l'activation de Plk1. De même, Aurora B pourrait phosphoryler MYPT1-PP1 β au niveau des kinétochores avant la transition métaphase/anaphase et au niveau du fuseau équatorial au cours de la cytokinèse. Dans ce cas, si l'on suppose qu'Aurora B est capable de phosphoryler Plk1 – hypothèse que nous avons déjà abordée – Aurora B pourrait activer Plk1 de deux façons bien différentes.

Aucun orthologue de MYPT1 n'a été identifié chez les invertébrés, ce qui pourrait laisser penser que le mécanisme de régulation de l'activité de Plk1 par le complexe MYPT1-PP1 β n'est pas évolutivement conservé. Des orthologues de PP1 β sont toutefois retrouvés chez ces invertébrés et l'on peut supposer que d'autres adaptateurs permettent le recrutement de ces phosphatases à leurs substrats spécifiques tels que Plk1.

B. Phosphorylation de la sérine 137 et de la sérine 49

Deux autres résidus que la thréonine 210 peuvent être phosphorylés et participer à la régulation de l'activité de Plk1 au cours de la mitose : la sérine 137 et la sérine 49. La phosphorylation de chacun de ces trois résidus n'est pas exclusive.

La phosphorylation de la sérine 137, tout comme celle sur la thréonine 210 que nous venons de décrire, est activatrice de Plk1. En effet, un mutant phosphomimétique, pour lequel la sérine 137 est mutée en acide aspartique, entraîne une augmentation de l'activité kinase de Plk1 et une entrée prématurée des cellules en mitose. Cette phosphorylation semble se produire consécutivement à celle sur la thréonine 210 et plus tardivement au cours de la mitose, mais la kinase qui catalyse cette réaction n'a pas été identifiée (Jang et al., 2002 ; van de Weerd et al., 2005). Cette seconde phosphorylation de Plk1 pourrait modifier la spécificité du domaine kinase de Plk1 vis-à-vis de ses substrats (Lowery et al., 2005).

La phosphorylation de la sérine 49 de Plk1 est catalysée par la kinase PAK (p21-activated protein kinase 1), et pourrait être requise pour l'activité de Plk1 lors de la transition métaphase/anaphase (Maroto et al., 2008).

Ces deux phosphorylations de Plk1 semblent nécessaires à l'exécution ordonnée des différents événements mitotiques. Aucune phosphatase régulant ces phosphorylations n'a jusqu'à présent été identifiée.

3. Régulation de la localisation subcellulaire de Plk1 par le domaine PBD

La localisation subcellulaire de Plk1 varie au long de la division cellulaire. En effet, Plk1 est située principalement dans le cytoplasme des cellules en interphase. Puis, pendant la mitose, Plk1 est associée successivement aux centrosomes (prophase), aux kinétochores (prométaphase et métaphase), au fuseau central (anaphase et télophase) et au midbody (cytokinèse).

De nombreuses études ont permis d'identifier quelques-unes des protéines qui régulent la localisation subcellulaire de Plk1 à chacune des différentes phases mitotiques. Ces protéines contiennent pour la plupart d'entre elles des motifs consensus d'interaction avec le domaine Polo-Box (PBD) de Plk1 (Lowery et al., 2007). Comme nous l'avons déjà vu, ces protéines doivent être préalablement phosphorylées par une kinase initiatrice pour pouvoir ensuite interagir avec le PBD de Plk1.

La séquence consensus de phosphorylation par Cdk1 correspond au motif phosphopeptidique optimal reconnu par le PBD de Plk1, ce qui explique pourquoi Cdk1 est souvent la kinase initiatrice. Par exemple, la phosphorylation en début de mitose des protéines INCENP

(Inner centromere protein) et Bub1 (Budding uninhibited by benzimidazole 1) par Cdk1 permet le recrutement de Plk1 aux kinétochores via son domaine PBD (Qi et al., 2006 ; Goto et al., 2006).

Cependant, suite à l'inactivation de Cdk1 en anaphase, Plk1 est capable de générer elle-même son motif d'ancrage par un mécanisme d'auto-initiation au cours des étapes plus tardives de la mitose. Ainsi, la phosphorylation des protéines du fuseau central Prc1 (Protein regulator of cytokinesis 1) et Mklp2 (Mitotic kinesin-like protein 2) par Plk1 crée son propre site d'interaction pour son PBD, permettant le recrutement de la kinase au fuseau central en anaphase (Neef et al., 2003 ; Neef et al., 2007). Par ailleurs, Plk1 permet également son propre recrutement aux centromères au cours de la phase G2 en phosphorylant la protéine centromérique PBIP1 (Polo-Box Interacting Protein 1) (Kang et al., 2006).

En conclusion, le recrutement de Plk1 à ses partenaires via son domaine PBD est initié par Cdk1 dans les premières étapes de la mitose (prophase, métaphase), alors qu'il est initié par Plk1 pendant la phase G2 et les étapes plus tardives de la division (anaphase, cytokinèse).

4. Dégradation protéolytique de Plk1

A. Ubiquitination de Plk1 par Chfr

L'ubiquitine ligase Chfr (Checkpoint with Forkhead-associated and RING finger domains) est un régulateur important du cycle cellulaire. Elle est capable de retarder l'entrée des cellules en mitose en réponse à un stress mitotique survenu pendant l'interphase (Scolnick and Halazonetis, 2000).

En cas de stress mitotique, Chfr polyubiquitine Plk1 ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome et retarde ainsi l'entrée des cellules en mitose. Une fois ce stress terminé, l'ubiquitine ligase Chfr est inactivée et Plk1 néosynthétisée permet la reprise de la division cellulaire (Kang et al., 2002).

B. Ubiquitination de Plk1 par le complexe APC/C

A l'instar de nombreuses protéines mitotiques (comme par exemple la Cycline B), en fin de mitose, Plk1 est polyubiquitinée et dégradée en conséquence par le protéasome (Ferris et al., 1998).

Comme nous l'avons déjà mentionné, Plk1 possède un motif consensus de dégradation de

type D-Box (Arg₃₃₇-Lys-Pro-Leu₃₄₀) reconnu par un complexe ubiquitine ligase appelé APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome). L'activité de ce complexe est régulée par son interaction exclusive avec Cdc20 (Cell-division cycle protein 20) ou Cdh1 (Cdc20 homologue 1), deux protéines activatrices d'APC/C, formant ainsi des complexes APC/C^{Cdc20} ou APC/C^{Cdh1}. Ces deux protéines activatrices interviennent successivement pendant la mitose : le complexe APC/C^{Cdc20} est activé pendant la métaphase, alors que le complexe APC/C^{Cdh1} est activé plus tardivement au cours de l'anaphase.

Ainsi, dès l'anaphase, Plk1 est polyubiquitinée par APC/C^{Cdh1} puis dégradée par la sous-unité 26S du protéasome (Lindon and Pines, 2004). Par conséquent, aussi bien la mutation du motif D-box de Plk1 (Plk1 R337A/L340A) que la déplétion de Cdh1 par ARN interférent entraînent une accumulation de Plk1 dans les cellules et affectent le bon déroulement de la mitose (défauts de séparation des chromosomes et de cytokinèse). Ces expériences suggèrent ainsi que la dégradation protéolytique de Plk1 est requise pour la sortie des cellules de mitose et la cytokinèse (Lindon and Pines, 2004 ; Engelbert et al., 2008).

Enfin, il est intéressant de préciser que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Plk1 (mutant phosphomimétique Plk1 T210D) inhibe également la dégradation protéolytique de la kinase et retarde la sortie des cellules de mitose. Ces données suggèrent ainsi que la déphosphorylation du résidu thréonine 210 est requise pour la dégradation de Plk1 en fin de division (Lindon and Pines, 2004).

III. Fonctions de Plk1 au cours de la mitose

1. Plk1 régule l'entrée des cellules en mitose

L'entrée des cellules en mitose est provoquée par l'activation du MPF (M-phase Promoting Factor), une protéine kinase hétérodimérique formée d'une sous-unité catalytique, Cdk1, et d'une sous-unité activatrice, la Cycline B.

Au début de l'interphase, Cdk1 est présente sous une forme monomérique inactive. Puis au fur et à mesure de la synthèse de Cycline B lors de la progression du cycle (à partir de la phase S jusqu'au début de la mitose), les complexes Cdk1/Cycline B s'accumulent dans la cellule et sont maintenus inactifs jusqu'à la transition G2/M.

Les complexes Cdk1/Cycline B subissent une phosphorylation dite activatrice au niveau de la thréonine 161 de la sous-unité catalytique Cdk1. Cette phosphorylation activatrice est catalysée par le complexe CAK (Cdk Activating Kinase, ou complexe Cdk7/CyclineH/Mat1), et produit un changement conformationnel du site actif de Cdk1, lui permettant l'accès à ses substrats.

Toutefois, les complexes phosphorylés par CAK sont systématiquement maintenus inactifs par la phosphorylation inhibitrice de deux résidus de Cdk1 – la thréonine 14 et la tyrosine 15 – par les kinases Wee1 et Myt1. La phosphorylation de ces résidus empêche la liaison des molécules d'ATP, coenzymes nécessaires à l'activité catalytique, inactivant ainsi l'enzyme Cdk1.

Ainsi, quand la cellule atteint la fin de la phase G2, elle contient un stock abondant de Cdk1/Cycline B (stock de pré-MPF inactif) prêt à agir (phosphorylation activatrice de la thréonine 161) mais dont l'activité est réprimée par la présence de 2 groupes phosphate qui inhibent la kinase (phosphorylations inhibitrices de la thréonine 14 et de la tyrosine 15).

Au moment de la transition G2/M, les complexes phosphorylés inactifs sont activés par la déphosphorylation spécifique des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdk1, résultant en des complexes uniquement phosphorylés sur la thréonine 161 et donc catalytiquement actifs. Cette déphosphorylation est catalysée par les phosphatases de la famille Cdc25.

Dans un premier temps, la phosphatase Cdc25B déphosphoryle les résidus 14 et 15 de Cdk1 lors de la transition G2/M, ce qui active le complexe Cdk1/Cycline B et déclenche l'entrée en mitose.

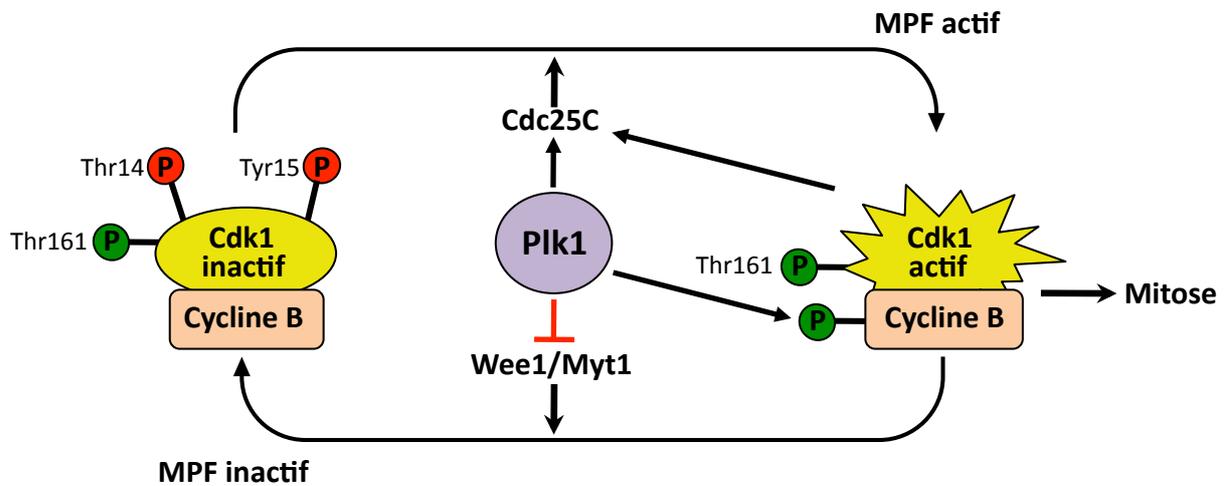


Figure 10 : Plk1 régule l'activation du MPF

Plk1 phosphoryle et active la phosphatase Cdc25C qui déphosphoryle les deux phosphates inhibiteurs (Thr14 et Tyr15) des complexes Cdk1/Cycline B. Plk1 phosphoryle et inactive les kinases inhibitrices Wee1 et Myt1. Plk1 phosphoryle également la Cycline B ce qui induit son accumulation nucléaire.

Le complexe Cdk1/Cycline B alors activé phosphoryle la phosphatase Cdc25C. Cette phosphorylation entraîne l'apparition d'un motif reconnu par le PBD (Polo-Box Domain) de Plk1 et permet l'interaction entre Plk1 et Cdc25C (Elia et al., 2003). Puis Plk1 phosphoryle à son tour Cdc25C, ce qui stimule son activité phosphatase et lui permet de déphosphoryler les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 du MPF, générant ainsi un système d'auto-amplification de l'activation du complexe Cdk1/Cycline B (Abrieu et al., 1998 ; Qian et al., 1998).

Plk1 phosphoryle probablement Cdc25C au niveau des centrosomes (où les complexes Cdk1/Cycline B sont initialement activés), et cette phosphorylation provoque la translocation nucléaire de Cdc25C (Toyoshima-Morimoto et al., 2002 ; Jackman et al., 2003).

Par ailleurs, la Cycline B est également un substrat de Plk1 qui la phosphoryle durant la prophase au niveau des centrosomes. La Cycline B, qui possède une séquence d'import nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal) et une séquence d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal), est localisée majoritairement dans le cytoplasme au cours de l'interphase car l'export nucléaire domine sur l'import nucléaire (Yang et al., 1998). La phosphorylation de la Cycline B par Plk1 en début de mitose masque la séquence d'export nucléaire, et entraîne par conséquent l'accumulation de la Cycline B dans le noyau (Toyoshima-Morimoto et al., 2001 ; Yuan et al., 2002). Cette relocalisation permet au complexe Cdk1/Cycline B d'agir sur ses substrats nucléaires (lamines, histones H1 ou H3...).

Plk1 phosphoryle également Wee1, la kinase inhibitrice du MPF (phosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdk1). Cette phosphorylation de Wee1 permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase SCF- β -TrCP (Skp1-Cullin-F-Box), sa polyubiquitination et sa dégradation finale par le protéasome (Watanabe et al., 2004).

Plusieurs indices laissent penser que Plk1 pourrait agir de la même manière sur l'autre kinase inhibitrice, Myt1. D'une part, un motif consensus de phosphorylation par Plk1 a été identifié dans la séquence de Myt1, et d'autre part Plk1 phosphoryle Myt1 *in vitro* (Nakajima et al., 2003). On ne sait toutefois pas si ce mécanisme de phosphorylation de Myt1 par Plk1 survient *in vivo*. L'action de Plk1 sur ces kinases inhibitrices amplifie par conséquent l'activation des complexes Cdk1/Cycline B.

En somme, Plk1 active le complexe MPF via deux mécanismes distincts (**Figure 10**) :

- la stimulation de la phosphatase activatrice, Cdc25C
- la dégradation des kinases inhibitrices, Wee1 et Myt1.

2. Plk1 régule la fragmentation de l'appareil de Golgi

A. Généralités sur l'appareil de Golgi

Dans les cellules de mammifères, l'appareil de Golgi joue un rôle majeur dans la régulation du trafic vésiculaire et des voies d'exocytose puisqu'il fait l'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Marsh and Howell, 2002). Localisé dans la région périnucléaire, l'appareil de Golgi est le siège de modifications post-traductionnelles de certaines protéines (glycosylation, sulfatation, phosphorylation).

Au niveau structural, il est constitué d'un empilement de saccules membranaires de forme discoïdale (également appelées les citernes golgiennes), subdivisées en trois régions fonctionnellement différentes :

- une face *cis*, tournée vers le réticulum endoplasmique,
- une région médiane,
- une face *trans*, tournée vers la membrane plasmique, en continuité avec un réseau de vésicules trans-golgien.

B. Fragmentation de l'appareil de Golgi en mitose

En mitose, l'appareil de Golgi se fragmente sous forme de petites vésicules pour être ensuite réparti équitablement entre les deux cellules filles, puis se réassemble après la cytokinèse (Colanzi and Corda, 2007).

De façon intéressante, de nombreux travaux montrent que la fragmentation de l'appareil de Golgi est nécessaire à la transition G2/M, suggérant l'existence d'un point de contrôle du cycle cellulaire, appelé « Golgi mitotic checkpoint », associant l'état d'assemblage du Golgi avec le processus régulant l'entrée des cellules en mitose (Preisinger et al., 2005). La fragmentation du Golgi est le résultat de la phosphorylation de protéines golgiennes parmi lesquelles GRASP65 (Golgi Reassembly Stacking Protein 65kDa).

GRASP65 est une protéine localisée sur la face *cis* de l'appareil de Golgi. Elle est associée à la membrane golgienne par son interaction avec la protéine GM130 (cis-Golgi Matrix protein of 130 kDa) et par l'insertion de son domaine N-terminal myristoylé (Barr et al., 1997 ; Puthenveedu et al., 2006). GRASP65 est impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi en permettant la connexion des citernes golgiennes adjacentes via une

interaction homotypique GRASP65-GRASP65 (Wang et al., 2005 ; Puthenveedu et al., 2006 ; Feinstein and Linstedt, 2008 ; Bachert and Linstedt, 2010).

Plusieurs études montrent que Plk1 est directement impliquée dans la fragmentation de l'appareil de Golgi (Lin et al., 2000 ; Sütterlin et al., 2001 ; Sengupta and Linstedt, 2010). Au cours de la mitose, Plk1 interagit via son domaine PBD avec le domaine C-terminal de GRASP65 puis phosphoryle cette protéine sur la sérine 189 (Preisinger et al., 2005 ; Sengupta and Linstedt, 2010). Au niveau moléculaire, cette phosphorylation perturbe l'interaction entre deux GRASP65 localisées sur deux citernes adjacentes et régule de fait la dissociation des citernes golgiennes pendant la mitose (Sengupta and Linstedt, 2010). Ainsi, un mutant phosphodéficient de GRASP65 (mutation de la sérine 189 en alanine), empêche la dissociation des citernes golgiennes pendant la mitose, alors qu'un mutant phosphomimétique de GRASP65 (mutation de la sérine 189 en acide aspartique) inhibe le réassemblage post-mitotique de l'appareil de Golgi.

3. Plk1 régule la maturation des centrosomes et la mise en place du fuseau mitotique

Dans les cellules animales, les centrosomes sont les sites primaires de la nucléation des microtubules. Ils sont formés de deux centrioles de forme cylindrique, perpendiculaires l'un à l'autre, entourés d'un matériel péricentriolaire (PCM pour pericentriolar material). Les évènements précurseurs de la formation du fuseau mitotique débutent très tôt dans le cycle cellulaire avec la duplication des centrosomes pendant la phase S. Après leur duplication, les centrosomes doivent subir une étape de maturation pour être totalement fonctionnels. Cette maturation est réalisée par le recrutement aux centrosomes, en début de mitose, de complexes de tubuline- γ nécessaires pour la nucléation des microtubules à partir des centrosomes mitotiques.

Polo fut identifié chez *Drosophila melanogaster* comme gène dont les mutations entraînent la formation de centrosomes défectueux et de fuseaux mitotiques mono-polaires (Sunkel and Glover, 1988). De plus, Plk1 a été localisée au niveau des centrosomes (Golsteyn et al., 1995). Ces deux observations suggéraient que cette kinase jouait un rôle important dans le fonctionnement des centrosomes et dans la formation des fuseaux mitotiques. En effet, l'une des premières fonctions décrites de Plk1 pendant la prophase serait de permettre le recrutement de la tubuline- γ au niveau des centrosomes (Lane and Nigg, 1996).

Les mécanismes précis par lesquels Plk1 induit la maturation des centrosomes ne sont toujours pas totalement élucidés mais des travaux indiquent néanmoins que Plk1 contribue à la maturation des centrosomes en phosphorylant la protéine centromérique Nlp (Ninein-like protein). Cette phosphorylation entraîne sa dissociation des centrosomes en début de prophase et facilite le recrutement des complexes de tubuline- γ contribuant ainsi au processus de maturation des centrosomes (Casenghi et al., 2003 ; Casenghi et al., 2005).

Plk1 phosphoryle également Kizuna, une protéine requise pour la formation de centrosomes mitotiques fonctionnels (Oshimori et al., 2006). Un mutant phosphodéficient de Kizuna, pour lequel la thréonine 379 est mutée en alanine entraîne une instabilité des centrosomes. Le matériel péricentriolaire est alors dissocié des centrioles au cours de la prométaphase. En conséquence, les centrosomes se fragmentent – un phénomène accentué par les forces générées par les fuseaux de microtubules – ce qui engendre des fuseaux multipolaires. La phosphorylation de Kizuna par Plk1 semble donc cruciale pour l'architecture et l'organisation des centrosomes au cours de la mitose, et pour l'intégrité des pôles du fuseau mitotique.

Un autre substrat de la kinase Polo (au moins chez la drosophile) est Asp, une protéine associée aux microtubules au niveau des centrosomes (do Carmo Avides et al., 2001). La phosphorylation de Asp en début de mitose facilite ainsi la nucléation des microtubules aux centrosomes mitotiques ce qui permet l'établissement du fuseau mitotique.

Plk1 est également impliquée indirectement dans la maturation des centrosomes en permettant le recrutement d'Aurora A aux centrosomes et en régulant l'activité de cette kinase indispensable à ce processus de maturation (De Luca et al., 2006 ; Seki et al., 2008). Tout comme la déplétion de Plk1, la déplétion d'Aurora A entraîne la formation de fuseaux mitotiques mono-polaires, diminue l'accumulation de la tubuline- γ et restreint le recrutement des microtubules aux centrosomes pendant la mitose.

De façon intéressante, l'inactivation de Plk1 par des petites molécules inhibitrices avant et après l'assemblage du fuseau bipolaire a montré que Plk1 n'est pas seulement requise pour la maturation des centrosomes et la formation du fuseau bipolaire mais également pour le maintien d'un fuseau mitotique stable tout au long de la mitose (McInnes et al., 2006 ; Lenart et al., 2007 ; Santamaria et al., 2007). Ces études suggèrent que les substrats de Plk1

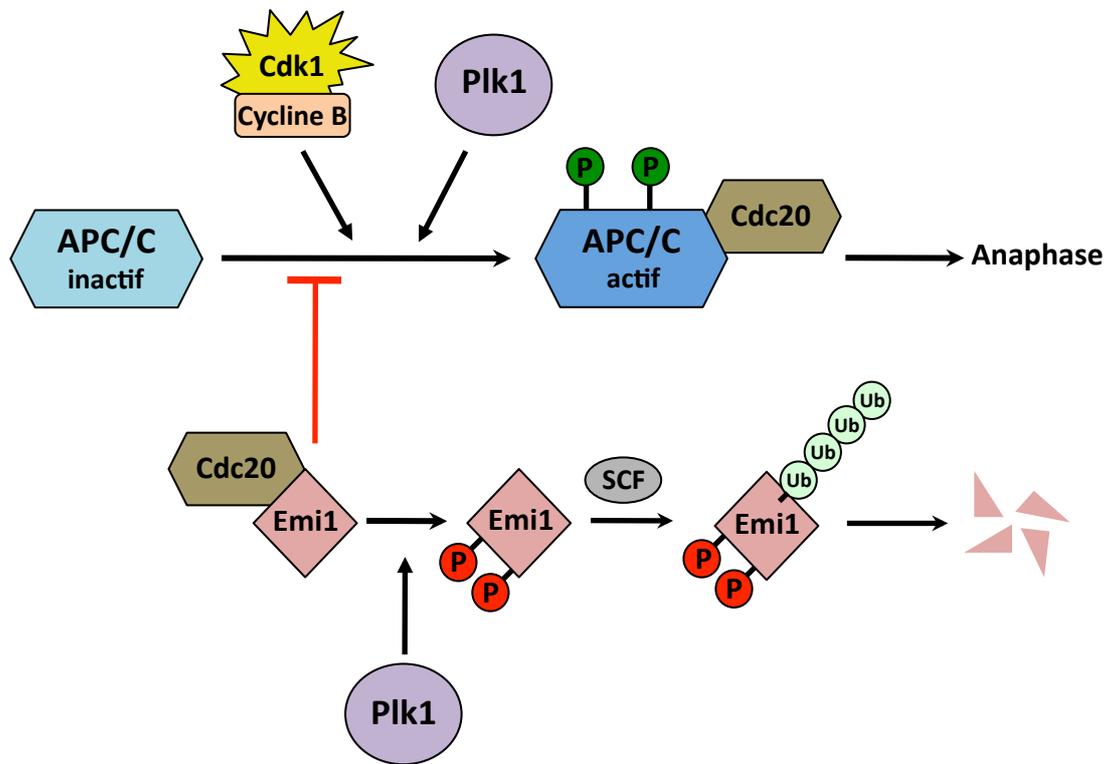


Figure 11 : Plk1 régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C

Plk1 régule l'activation du complexe APC/C^{Cdc20} par deux mécanismes distincts. D'une part, Plk1 et Cdk1 phosphorylent directement le complexe APC/C pour l'activer. D'autre part, Plk1 phosphoryle Emi1, l'inhibiteur de Cdc20, ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome permettant la formation du complexe APC/C^{Cdc20}.

impliqués dans la formation initiale du fuseau doivent être maintenus dans un état phosphorylé, et/ou que d'autres substrats doivent être phosphorylés afin de maintenir la bipolarité et la fonctionnalité du fuseau mitotique.

Cependant, la maturation des centrosomes et la stabilité du fuseau mitotique ne sont pas affectées lorsque Plk1 est maintenue dans le cytoplasme :

- par la surexpression du domaine PBD de Plk1 qui agit comme dominant négatif en interagissant avec les centrosomes
- ou par l'expression ectopique – dans des cellules déplétées pour Plk1 endogène – d'un mutant de Plk1 délété du PBD qui ne peut donc plus interagir avec les centrosomes (Hanisch et al., 2006).

Une des explications possibles est que les substrats de Plk1 aux centrosomes ne seraient pas stablement attachés aux centrosomes et qu'il y aurait un échange permanent avec le « pool » cytoplasmique qui serait suffisant pour permettre leur phosphorylation. L'autre explication est que Plk1 cytoplasmique serait capable de phosphoryler ses substrats même si ceux-ci sont stablement associés aux centrosomes.

4. Plk1 régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C

La coordination des phases tardives de la mitose est régulée par la dégradation de nombreuses protéines clefs par le protéasome, comme les cyclines (par exemple la Cycline B). Ces protéines sont dégradées par la sous-unité 26S du protéasome suite à leur ubiquitination par le complexe enzymatique ubiquitine ligase APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome).

L'activité ligase du complexe APC/C doit être finement régulée au cours du cycle cellulaire, par exemple pour empêcher la dégradation précoce de la Cycline B (ou d'autres protéines mitotiques) pendant les phases S et G2.

La protéine Emi1 (Early mitotic inhibitor 1) est un inhibiteur du complexe APC/C. Elle se lie à Cdc20 pendant l'interphase, empêche la formation du complexe APC/C^{Cdc20} et inhibe ainsi l'activité ligase du complexe (Reimann et al., 2001).

Plk1 régule l'activité du complexe APC/C par deux mécanismes distincts (**Figure 11**). D'une part, Plk1 phosphoryle Emi1 en fin de prophase. Cette phosphorylation permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase SCF- β -TrCP (Skp1-Cullin-F-Box), la

polyubiquitination de Emi1 et sa dégradation finale par le protéasome (Margottin-Goguet et al., 2003 ; Hansen et al., 2004 ; Moshe et al., 2004). La dégradation de Emi1 est nécessaire pour la formation des complexes APC/C^{Cdc20} lors de la transition métaphase/anaphase.

D'autre part, Plk1 phosphoryle APC/C, ce qui est une condition préalable à l'activation du complexe (Golan et al., 2002 ; Kraft et al., 2003). Différentes sous-unités de l'APC/C sont phosphorylées par Plk1 *in vitro*, mais seulement quelques unes ont été confirmées *in vivo* (Kotani et al., 1998).

On ne sait pas où ces phosphorylations de Emi1 et de APC/C par Plk1 se produisent dans la cellule. Toutefois, ces protéines étant toutes trois localisées aux centrosomes lors de la prophase, on peut supposer que les différentes phosphorylations ont lieu dans ces structures.

La phosphorylation du complexe APC/C et son activation peuvent survenir en l'absence de Plk1, probablement à l'aide de Cdk1 qui phosphoryle également le complexe (Kraft et al., 2003 ; Lenart et al., 2007). Dans ce cas, APC/C actif n'est plus situé aux centrosomes mais dans le cytoplasme (Kraft et al., 2003). Plk1 semble donc être responsable de la localisation centrosomale du complexe APC/C. Des interactions entre des sous-unités phosphorylées du complexe et le PBD de Plk1 pourraient contribuer directement au recrutement de l'APC/C aux centrosomes.

5. Plk1 régule la séparation des chromosomes en anaphase

A. Fonction du kinétochore en mitose

Pendant la prométaphase, les chromosomes établissent une connexion avec les microtubules qui émanent des pôles du fuseau. Cette connexion se fait entre les microtubules du fuseau mitotique et une structure protéique associée aux centromères des chromosomes appelée le kinétochore. En métaphase, l'attachement bipolaire des chromosomes est achevé et les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale. Ils sont maintenus sous tension par les kinétochores et les microtubules attachés aux pôles du fuseau.

Un système de contrôle, appelé « spindle assembly checkpoint » permet la vérification de l'attachement des chromosomes au fuseau et empêche la cellule d'entrer en anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement orientés sur la plaque métaphasique. En effet, tant que les kinétochores des chromosomes ne sont pas attachés aux microtubules du fuseau et ne sont donc pas sous tension, ces kinétochores libres inhibent le complexe APC/C, retardant

ainsi l'entrée des cellules en anaphase.

En anaphase, les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule.

B. Evidences du rôle de Plk1 aux kinétochores

Les premiers travaux qui suggéraient un rôle de Plk1 aux kinétochores datent de 1998 lorsque Arnaud et ses collaborateurs observaient une accumulation de Plk1 au niveau de ces sites en prométaphase (Arnaud et al., 1998). Des études complémentaires ont montré d'une part que l'inactivation de Plk1 réduit le nombre de microtubules accrochés aux kinétochores et d'autre part que Plk1 est nécessaire pour l'attachement des microtubules aux kinétochores (Sumara et al., 2004 ; Lenart et al., 2007) (**Figure 12**). Par ailleurs, la surexpression du domaine PBD de Plk1, qui agit comme dominant négatif en délocalisant Plk1 de ces structures, entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes caractéristiques d'anomalies d'attachement des microtubules du fuseau mitotique aux kinétochores (Hanisch et al., 2006).

C. Recrutement de Plk1 aux kinétochores

Le recrutement de Plk1 aux kinétochores est régulé par son interaction avec différentes protéines. Plk1 est exprimée pendant la phase S et est détectée dès la phase G2 aux centromères, le site chromosomique d'assemblage du kinétochore pendant la mitose (Hamanaka et al., 1994 ; Holtrich et al., 1994 ; Kang et al., 2006).

Plk1 y phosphoryle la protéine centromérique PBIP1 (Polo-Box Interacting Protein 1), ce qui crée un site de fixation pour son domaine PBD par un mécanisme d'auto-initiation et permet le recrutement de Plk1 aux centromères (Lee et al., 2008). Par contre, la phosphorylation de PBIP1 par Plk1 entraîne également la dégradation de PBIP1 dans les premières phases de la mitose, ce qui laisse penser que d'autres partenaires sont impliqués dans la localisation de Plk1 aux kinétochores jusqu'en télophase (Kang et al., 2006).

Un autre partenaire direct de Plk1 aux kinétochores est la kinase Bub1 (Budding uninhibited by benzimidazole 1) avec laquelle Plk1 interagit via son domaine PBD (Qi et al., 2006). La déplétion de Bub1 par ARN interférent entraîne une forte diminution de Plk1 au niveau des kinétochores ce qui suggère que cette protéine est cruciale pour le recrutement de

Plk1 aux kinétochores. D'un point de vue mécanistique, la protéine Bub1 est phosphorylée dans un premier temps par Cdk1 sur sa thréonine 609 ce qui permet son interaction avec le domaine PBD de Plk1.

Un mécanisme similaire de recrutement de Plk1 aux kinétochores a été décrit avec la protéine INCENP, une sous-unité du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) (Goto et al., 2006). Cdk1 phosphoryle INCENP sur la thréonine 388, permettant le recrutement de Plk1 via son domaine PBD. La déplétion de INCENP affecte fortement la localisation de Plk1 aux kinétochores. Ce phénotype est rétabli par l'expression ectopique de la forme WT de INCENP, mais pas par un mutant phosphodéficient pour lequel la thréonine 388 a été mutée en alanine.

Enfin la protéine externe des kinétochores NudC (Nuclear distribution protein C) est également un substrat de Plk1 (Nishino et al., 2006). La déplétion de cette protéine est caractérisée par une délocalisation de Plk1 des kinétochores, une diminution de l'attachement des microtubules aux kinétochores associée à des défauts de ségrégation des chromosomes.

Plusieurs protéines semblent donc importantes pour le recrutement de Plk1 au niveau des kinétochores. On ne peut toutefois pas exclure que la déplétion de ces protéines affecte indirectement la localisation de Plk1 par exemple en altérant plus généralement la structure même des kinétochores.

D. Fonctions de Plk1 aux kinétochores

Plusieurs fonctions de Plk1 ont été décrites aux kinétochores.

Un des rôles de Plk1 aux kinétochores est de réguler la compaction des chromosomes. Plk1 y phosphoryle PICH (Plk1-Interacting Checkpoint Helicase), une protéine hélicase localisée sur les centromères et les bras des chromosomes (Baumann et al., 2007). L'interaction de Plk1 avec PICH permet de recruter la kinase sur les bras des chromosomes. La surexpression d'un mutant de PICH incapable d'interagir avec Plk1 – mais qui a toujours la même localisation – entraîne des anomalies de condensation des chromosomes, ce qui suggère que Plk1 joue un rôle important dans ce processus (Leng et al., 2008).

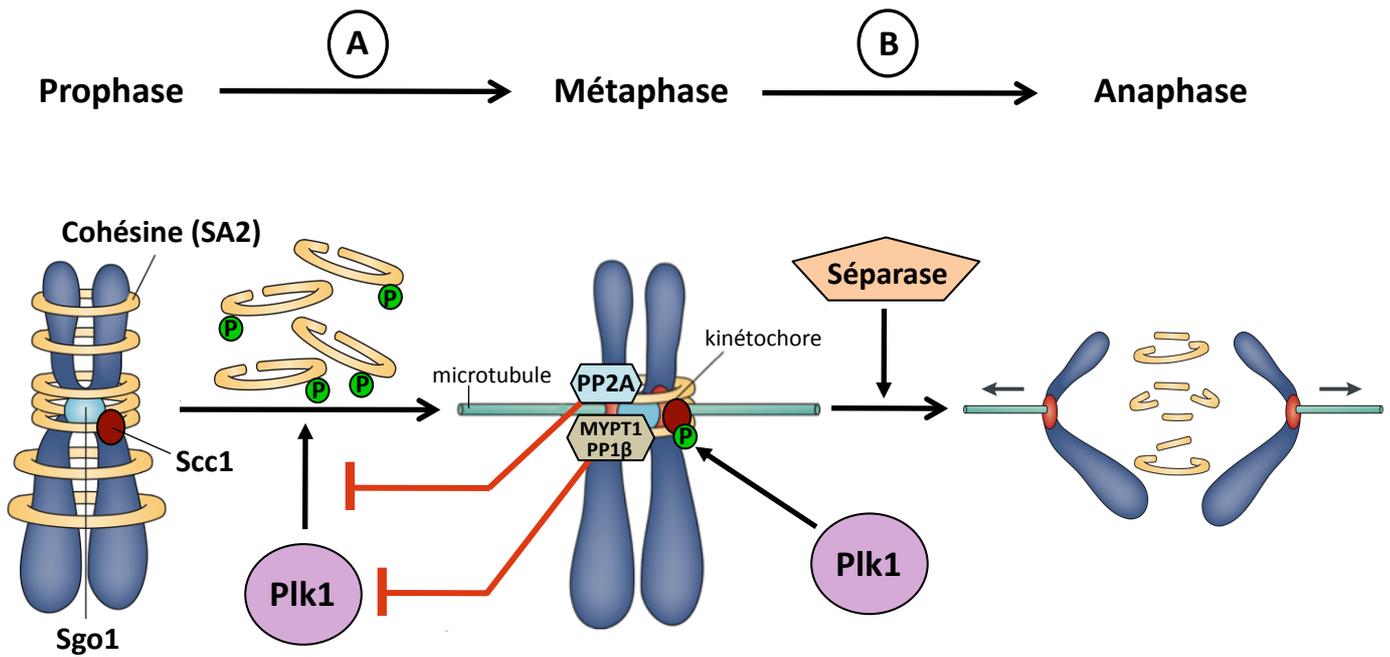


Figure 13 : Plk1 régule la séparation des chromatides sœurs

- A. Au cours de prophase, la phosphorylation de la sous-unité SA2 de la cohésine par Plk1 la dissocie des bras des chromosomes. La cohésine est maintenue au niveau des centromères par Sgo1 qui recrute la phosphatase PP2A et contrebalance la phosphorylation de SA2 par Plk1. Une autre phosphatase MYPT1-PP1 β inactive localement l'activité de Plk1 aux centromères.
- B. Lors de la transition métaphase-anaphase, Plk1 phosphoryle une autre sous-unité de la cohésine centromérique, Scc1, ce qui la rend sensible à la Séparase. En anaphase, les deux chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule en division. (schéma adapté de Archambault and Glover, 2009 et Strebhardt, 2010)

Un autre rôle de Plk1 aux kinétochores est de permettre un attachement stable des microtubules aux kinétochores, ce qui entraîne leur mise sous tension. Des expériences de microscopie électronique montrent en effet que l'inhibition de Plk1 empêche le recrutement normal des microtubules aux kinétochores. Deux types d'attachements entre les microtubules et les kinétochores sont observés dans une situation normale : d'abord un attachement dit latéral qui est transitoire, puis un attachement plus stable dit terminal entre les extrémités des microtubules et les kinétochores (Kapoor et al., 2006). Lorsque Plk1 est inhibée, les contacts latéraux sont toujours observés, mais les attachements normaux des extrémités des microtubules aux kinétochores ne se mettent pas en place (Lenart et al., 2007). Peut-être Plk1 est-elle impliquée dans la conversion des attachements latéraux en attachements terminaux.

Un des substrats de Plk1 qui permettrait l'attachement des microtubules aux kinétochores est la protéine BubR1 (Elowe et al., 2007 ; Lenart et al., 2007 ; Matsumura et al., 2007). BubR1 est nécessaire aussi bien pour le point de contrôle du fuseau mitotique que pour l'attachement des microtubules aux kinétochores. En prométaphase, lorsque la plupart des chromosomes ne sont pas attachés aux microtubules, BubR1 est phosphorylé par Plk1 sur la sérine 676 (Elowe et al., 2007). Cette phosphorylation est d'autant plus importante au niveau des kinétochores qui ne sont pas encore sous tension. En métaphase, lorsque l'ensemble des chromatides sont mises sous tension par leur liaison aux microtubules, BubR1 est déphosphorylé. Ces données suggèrent que la phosphorylation de BubR1 par Plk1 est impliquée dans l'attachement des microtubules aux kinétochores. De futurs travaux permettront sûrement de comprendre comment l'absence de tension active la phosphorylation de BubR1 par Plk1 et aussi comment cette forme « active » de BubR1 induit l'attachement des microtubules aux kinétochores.

Plus récemment, Mondal et ses collaborateurs ont montré que le recrutement aux kinétochores de Tex14 (Testis-expressed protein 14) par Plk1 est également requis pour l'attachement des microtubules aux kinétochores (Mondal et al., 2012). Par ailleurs, la phosphorylation de Tex14 par Plk1 au cours de la métaphase entraîne sa dégradation par le protéasome et régule la transition métaphase/anaphase.

Plk1 est également impliquée pour la séparation des chromatides sœurs avant leur migration vers les pôles mitotiques en anaphase (**Figure 13**). Après la réplication, les chromatides restent associées entre-elles grâce à un complexe protéique appelé cohésine. Afin de permettre la séparation des chromatides, la cohésine doit être dissociée des chromosomes. Chez les vertébrés, la dissociation de la cohésine se produit par deux mécanismes successifs dans lesquels Plk1 est impliquée.

Tout d'abord, Plk1 intervient dans la dissociation de la cohésine située le long des bras des chromosomes, au cours de la prophase et de la prométaphase. Plk1 phosphoryle la sous-unité SA2 (SCC3 homologue 2) de la cohésine ce qui permet la dissociation de la cohésine de l'ADN par un mécanisme encore inconnu (Losada et al., 2002 ; Sumara et al., 2002 ; Gimenez-Abian et al., 2004 ; Hauf et al., 2005).

Afin de permettre un alignement correct des chromosomes en métaphase, la présence de la cohésine est maintenue aux centromères par l'intermédiaire de Sgo1 (Shugoshin-like 1). Sgo1 recrute la protéine phosphatase 2A (PP2A) aux centromères. Celle-ci maintient SA2, dans un état non phosphorylé en contrebalançant la phosphorylation de SA2 par Plk1 (Kitajima et al., 2006 ; Tang et al., 2006).

Par ailleurs, Matsumura et ses collaborateurs montrent que le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β inhibe également l'activité de Plk1 aux centromères pendant la métaphase empêchant ainsi la ségrégation prématurée des chromatides (Matsumura et al., 2011).

En somme, l'inhibition de la phosphorylation de SA2 aux centromères pendant la métaphase est régulée via deux phosphatases :

- PP2A qui déphosphoryle directement SA2
- MYPT1-PP1 β qui inactive la kinase Plk1.

Lors de la transition métaphase-anaphase Plk1 intervient aussi dans le clivage de la cohésine centromérique par une protéase : la séparase. Plk1 phosphoryle alors une autre sous-unité de la cohésine, Scc1 (Sister chromatid cohesion protein 1), ce qui la rend particulièrement sensible à la séparase (Alexandru et al., 2001 ; Hornig and Uhlmann, 2004).

6. Plk1 régule la cytokinèse

A. Définition de la cytokinèse

La cytokinèse est l'étape finale de la division qui permet la séparation physique des deux cellules filles en fin de mitose. Dans les cellules animales, elle se caractérise par la mise en place dès l'anaphase d'un anneau contractile, constitué principalement de filaments d'actine et de myosine, dans un plan perpendiculaire au fuseau mitotique, le plus souvent à l'équateur. Au fur et à mesure de sa contraction, cet anneau forme un sillon de clivage de plus en plus prononcé par l'invagination de la membrane plasmique de la cellule mère, qui aboutit

finalement à la formation d'un pont intercellulaire qui connecte les cellules filles jusqu'au clivage final, l'abscission (Petronczki et al., 2008).

B. Evidences du rôle de Plk1 dans la cytokinèse

Les premières évidences du rôle de Plk1 dans la régulation de la cytokinèse datent des travaux réalisés chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura et al., 1995). Ohkura et ses collaborateurs observaient en effet que la mutation de *plp1* (l'homologue de Plk1 chez *S. pombe*) affecte la formation du septum de division.

La fonction de Plk1 fut plus difficile à caractériser chez les mammifères puisque la déplétion de cette kinase engendrait, bien en amont de la cytokinèse, des défauts précoces qui affectaient les premières phases de la division et le déroulement du cycle cellulaire. Toutefois, des travaux pionniers avaient montré que la surexpression de Plk1 génère des cellules multinucléées, caractéristiques de défauts de cytokinèse.

Le développement d'inhibiteurs spécifiques de Plk1 a par la suite permis d'inactiver Plk1 après la transition métaphase/anaphase pour entreprendre l'étude de sa fonction pendant les phases tardives de la mitose. Ces travaux ont mis en évidence de nouveaux rôles de Plk1 pendant la cytokinèse, aussi bien dans l'assemblage de l'anneau contractile que pour la formation du sillon de clivage et enfin pour l'abscission.

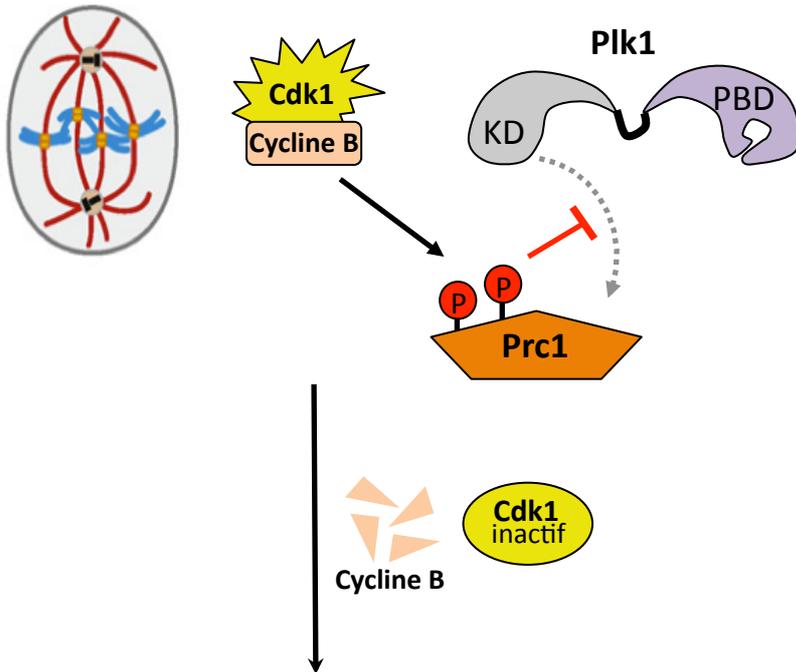
C. Plk1 régule la formation et la contraction de l'anneau d'actomyosine

L'initiation de la cytokinèse : mise en place du fuseau central et de l'anneau contractile

Comme dans la plupart des processus dépendants de l'actine, une GTPase de la famille Rho joue un rôle important dans la cytokinèse. Toutes les protéines G existent sous une forme active liée au GTP et sous une forme inactive liée au GDP. Le passage d'une forme à l'autre est régulé par des protéines qui favorisent soit l'hydrolyse du GTP en GDP (protéines GAP, GTPase Activating Protein) soit l'échange nucléotidique du GDP en GTP (protéines GEF, Guanine Exchange Factors).

Dans le cas de la cytokinèse, c'est la GTPase RhoA qui est activée localement au cortex équatorial et régule d'une part la polymérisation des filaments d'actine et d'autre part l'activité motrice de la myosine II, contrôlant ainsi l'assemblage et la contraction de l'anneau d'actomyosine (Piekny et al., 2005).

Métaphase



Anaphase

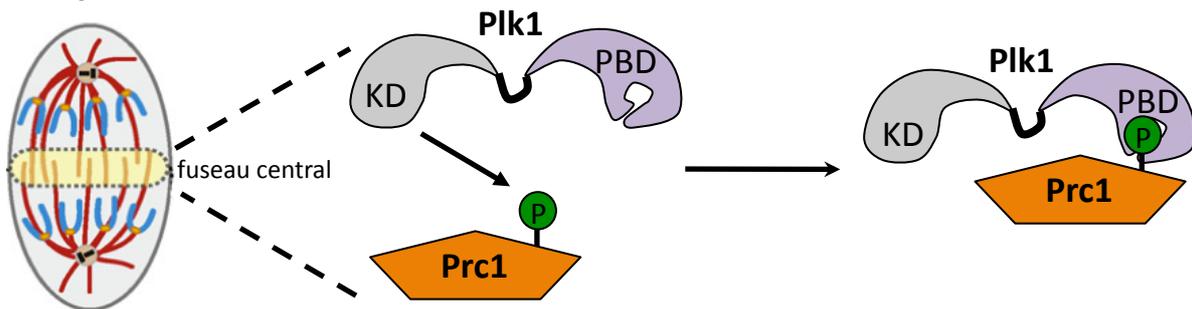


Figure 14 : Prc1 recrute Plk1 au fuseau central

En métaphase, la protéine Prc1 est phosphorylée par Cdk1 ce qui empêche sa phosphorylation par Plk1. En anaphase, Cdk1 est inactivée suite à la dégradation de la Cycline B. Plk1 phosphoryle et interagit avec Prc1 par un mécanisme d'auto-initiation.

La cytokinèse débute dès l'anaphase par l'assemblage d'une structure appelée fuseau central. Ce fuseau central est constitué de microtubules antiparallèles qui se compactent au centre du fuseau mitotique, entre les deux lots de chromatides en cours de séparation, au niveau du plan sur lequel les chromosomes étaient alignés en métaphase. Par ailleurs, ce fuseau central joue un rôle crucial dans l'activation de la GTPase RhoA et dans le positionnement du sillon de clivage (Barr and Gruneberg, 2007).

Un des composants essentiels du fuseau central est le complexe « centralspindlin » (Mishima et al., 2002). Ce complexe est un hétérotétramère protéique constitué d'un homodimère de la kinésine Mklp1 (Mitotic kinesin-like protein 1) et d'un homodimère de HsCyk4 (une protéine RhoGAP) (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). En anaphase, HsCyk4 interagit avec le facteur d'échange nucléotidique (RhoGEF) Ect2 (Epithelial cell transforming 2), ce qui permet son recrutement au niveau du fuseau central (Somers and Saint, 2003 ; Yuce et al., 2005 ; Zhao and Fang, 2005 ; Nishimura and Yonemura, 2006). Cette interaction stimule l'activité RhoGEF d'Ect2 et induit l'échange nucléotidique de RhoA-GDP en RhoA-GTP, activant ainsi RhoA (Yuce et al., 2005). Plus précisément, le complexe HsCyk4/Ect2 est recruté à la périphérie des microtubules du fuseau central, à proximité du cortex équatorial, ce qui active RhoA dans cette zone corticale équatoriale et permet l'initiation de la cytokinèse en stimulant la formation du sillon de clivage.

Recrutement de Plk1 au fuseau central

Plk1 est recrutée au niveau du fuseau central pendant l'anaphase (Petronczki et al., 2008). Ce recrutement se fait grâce à l'interaction de Plk1 avec une protéine associée aux microtubules du fuseau central et qui régule l'architecture de cette structure, Prc1 (Protein regulator of cytokinesis 1) (Neef et al., 2007) (**Figure 14**). L'interaction entre les deux protéines fait intervenir un mécanisme d'auto-initiation par lequel Plk1 phosphoryle Prc1 pour lui permettre d'interagir avec son domaine PBD. En conséquence, l'inhibition de l'activité de Plk1 abolit sa localisation au fuseau central (Brennan et al., 2007 ; Burkard et al., 2007 ; Petronczki et al., 2007 ; Santamaria et al., 2007).

Plk1 est également recrutée au fuseau central, par un mécanisme similaire, via la kinésine Mklp2 (Mitotic kinesin-like protein 2) (Neef et al., 2003). Ces deux protéines pourraient d'ailleurs coopérer pour permettre le recrutement de Plk1 au fuseau central.

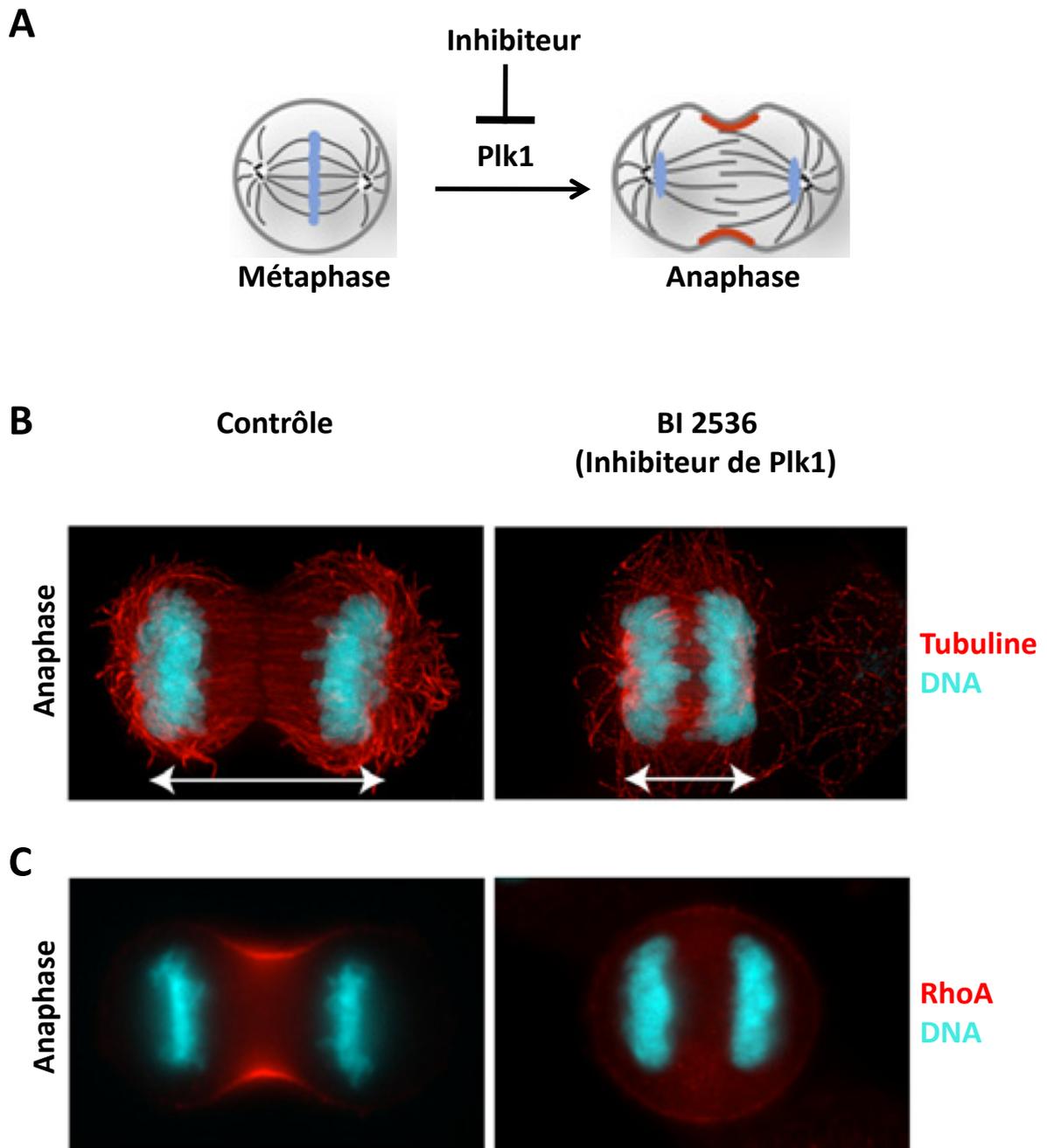


Figure 15 : Plk1 contrôle l'élongation du fuseau en anaphase et l'initiation de la cytokinèse

- A. L'inhibition de Plk1 bloque la formation du sillon de division.
 - B. L'inhibition de Plk1 restreint l'élongation du fuseau en anaphase.
 - C. L'inhibition de Plk1 empêche l'accumulation de RhoA au cortex équatorial.
- (Adapté de Petronczki et al., 2008)

Il est également important de souligner que l'interaction entre Plk1 et Prc1 est inhibée pendant les premières phases de la mitose. En effet avant le début de l'anaphase le complexe Cdk1/Cycline B phosphoryle Prc1 sur différents résidus ce qui prévient sa phosphorylation par Plk1 et par conséquent le recrutement prématuré de Plk1 au niveau du fuseau (Neef et al., 2007). Plk1 n'est recrutée au fuseau central qu'après inhibition de Cdk1, suite à la destruction de la sous-unité régulatrice Cycline B par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase APC/C – dont l'activité est elle-même régulée par Plk1.

Rôles de Plk1 dans la mise en place de l'anneau contractile

La localisation de Plk1 au fuseau central est requise pour l'initiation de la cytokinèse en anaphase. En effet, plusieurs études indépendantes montrent que l'inhibition de l'activité de Plk1 empêche l'accumulation de la GTPase RhoA au cortex équatorial et par conséquent la formation de l'anneau contractile et du sillon de clivage (Brennan et al., 2007 ; Burkard et al., 2007 ; Petronczky et al. 2007 ; Santamaria et al., 2007). Ces travaux suggèrent ainsi que Plk1 joue un rôle précoce, en amont de RhoA, dans l'initiation de la cytokinèse (**Figure 15**).

Par ailleurs, l'inhibition de Plk1 en anaphase abolit le recrutement d'Ect2 au fuseau central sans toutefois affecter la localisation des sous-unités HsCyk4 et Mklp1 du complexe « centralspindlin ». Des expériences biochimiques complémentaires, utilisant le BI 2536 (une drogue qui inhibe l'activité catalytique de Plk1 en bloquant son interaction avec l'ATP), ont montré que Plk1 est nécessaire à la formation du complexe HsCyk4/Ect2 pour permettre l'activation de RhoA au niveau du fuseau central au cours de l'anaphase (**Figure 16**).

En fait, Plk1 interagit avec la protéine du fuseau central HsCyk4 et la phosphoryle sur la sérine 157 (Burkard et al., 2009 ; Wolfe et al., 2009). Cette phosphorylation crée un motif de fixation pour Ect2 via son domaine BRCT et permet ainsi la formation du complexe HsCyk4/Ect2 au fuseau central. Par conséquent un mutant phosphodéficient de HsCyk4, pour lequel la sérine 157 a été mutée en alanine, ne permet plus de localiser Ect2 au fuseau central en anaphase et inhibe de formation du sillon de clivage.

De plus, Plk1 est également capable de phosphoryler Ect2 (du moins *in vitro*) (Niiya et al., 2006). Cette phosphorylation dissocie une interaction intra-moléculaire et auto-inhibitrice entre les parties N-terminale (qui possède le domaine BRCT de liaison à HsCyk4) et C-terminale (qui contient le domaine GEF (Guanine Exchange Factors)) d'Ect2 (Hara et al., 2006). Ce changement de conformation de Ect2 libère son domaine BRCT et permet son

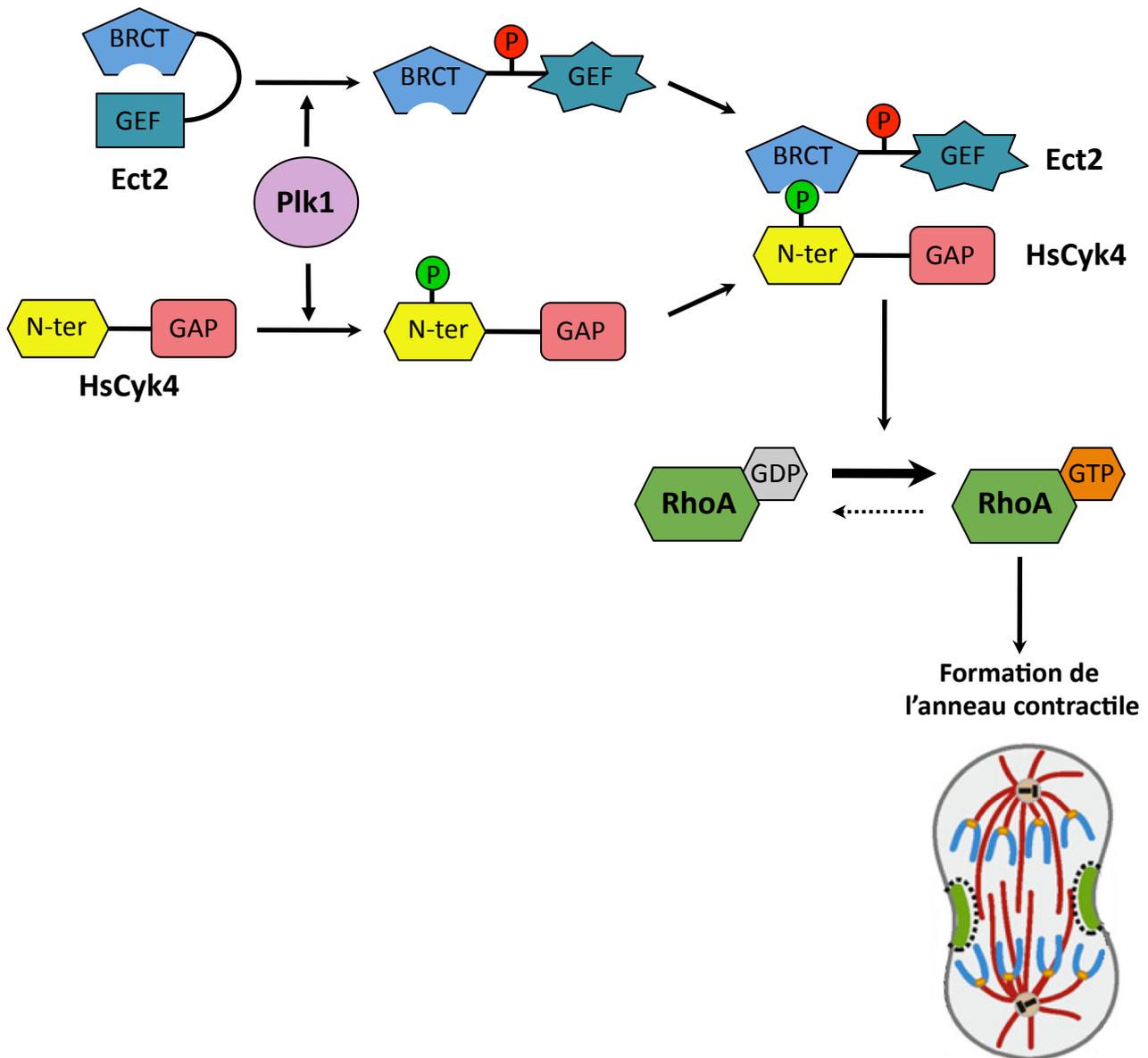


Figure 16 : Plk1 régule l'activation de RhoA

Plk1 phosphoryle HsCyk4 dans sa partie N-terminale. Cette phosphorylation crée un motif d'interaction pour Ect2 via son domaine BRCT. Plk1 phosphoryle également Ect2 ce qui dissocie une interaction intramoléculaire et inhibitrice. La phosphorylation d'Ect2 active le domaine GEF permettant ainsi l'activation de RhoA et la formation de l'anneau contractile.

interaction avec la protéine HsCyk4 (préalablement phosphorylée par Plk1) au niveau du fuseau central. D'autre part, cette phosphorylation active le domaine GEF d'Ect2 permettant ainsi l'activation de RhoA et la formation de l'anneau contractile (Tatsumoto et al., 1999).

L'activation de la GTPase RhoA est également régulée par le facteur d'échange nucléotidique MyoGEF (Myosin-interacting GEF).

Pendant l'anaphase, MyoGEF interagit avec Ect2 au fuseau central. Plk1 est capable de phosphoryler MyoGEF sur la thréonine 574 et l'inhibition de Plk1 empêche le recrutement de MyoGEF au fuseau central (Asiedu et al., 2008). Un mutant phosphodéficient MyoGEF T574A, pour lequel la thréonine 574 a été mutée en alanine, inhibe l'activation de RhoA. Tout comme pour Ect2, la phosphorylation de MyoGEF par Plk1 augmente son activité d'échange GDP-GTP. Par ailleurs, la déplétion de MyoGEF par ARN interférent engendre une délocalisation de RhoA au cours la cytokinèse et diminue son activité, ce qui génère des cellules multinucléées (Wu et al., 2006 ; Asiedu et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que Plk1 régule la localisation et l'activité de MyoGEF qui elle-même contrôle la localisation et l'activité de RhoA, nécessaires au déroulement de la cytokinèse.

L'activation de RhoA génère une cascade de signalisation via le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs qui aboutissent à la formation de l'anneau contractile. Ces effecteurs incluent d'une part les protéines qui régulent la polymérisation de l'actine, et d'autre part les kinases ROCKs (ROCK1 et ROCK2) et Citron qui phosphorylent la chaîne légère de la myosine (MLC, Myosin Light Chain) et stimulent l'activité motrice de la myosine au cours de la constriction de l'anneau (Matsumura et al., 2005).

Au cours de la cytokinèse, Plk1 régule l'ingression du sillon de clivage par l'intermédiaire d'un des effecteurs de RhoA : la kinase ROCK2 (Rho-associated kinase 2) qui est localisée au fuseau central pendant la cytokinèse (Lowery et al., 2007). Plk1 phosphoryle ROCK2, et interagit avec ROCK2 via son domaine PBD. Cette phosphorylation de ROCK2 par Plk1 augmente sa capacité à phosphoryler la chaîne légère de la myosine. De plus, un mutant phosphodéficient de ROCK2 inhibe son activité kinase, ce qui montre que Plk1 agit comme un activateur de ROCK2. L'ensemble de ces travaux suggère que Plk1 et RhoA pourraient agir en synergie pour activer ROCK2 au cours de la cytokinèse.

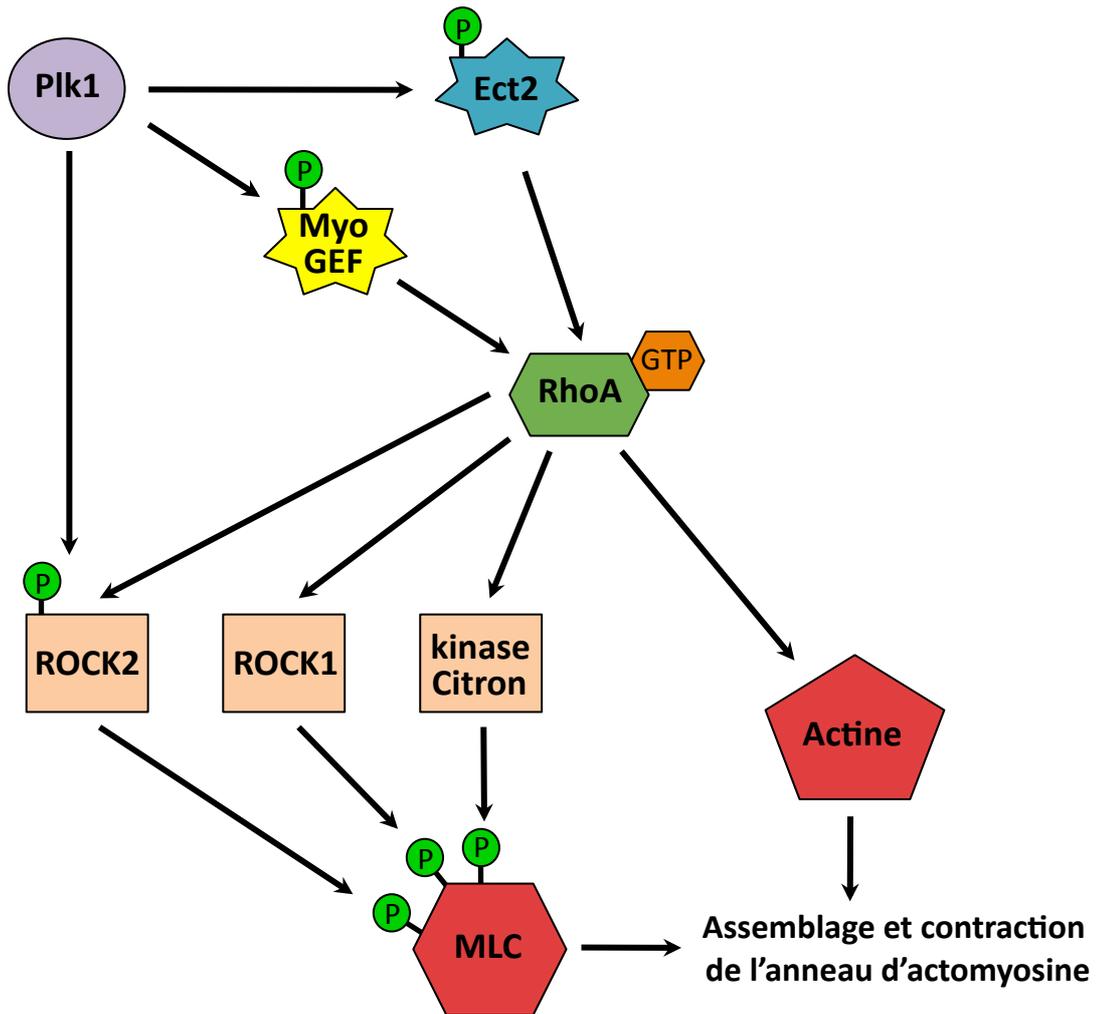


Figure 17 : Plk1 régule l'assemblage et la contraction de l'anneau d'actomyosine

Plk1 phosphoryle MyoGEF et Ect2 qui activent RhoA. La GTPase RhoA régule la polymérisation des filaments d'actine mais également l'activité motrice de la myosine via ses effecteurs (ROCK1, ROCK2 et la kinase Citron) qui phosphorylent la chaîne légère de la myosine (MLC). Plk1 phosphoryle ROCK2 ce qui augmente son activité.

En conclusion, Plk1 joue un rôle important dans l'initiation de la cytokinèse : Plk1 agit à la fois dans l'activation de RhoA (via les protéines Ect2 et MyoGEF), et en aval de RhoA (en renforçant l'activité de ses effecteurs) pour activer la contraction de l'anneau d'actomyosine (**Figure 17**).

D. Plk1 régule l'abscission

En parallèle de l'invagination du sillon, la formation du fuseau central et la compaction des microtubules centraux contribuent à la formation du pont intercellulaire qui connecte les deux cellules filles avant l'abscission. Le centre du pont intercellulaire, où se chevauchent les extrémités des microtubules antiparallèles du fuseau central, est composé d'une structure appelée corps intermédiaire ou « midbody ». Cette structure résulte de l'association robuste de faisceaux de microtubules et d'autres protéines, comme Cep55 et Nir2, qui régulent l'étape finale de la cytokinèse : l'abscission.

Cep55 (Centrosomal protein 55) est une protéine localisée au centrosome pendant l'interphase et au midbody pendant la cytokinèse, via son interaction avec la protéine Mklp1. La localisation de Cep55 au midbody est requise pour l'abscission (Zhao et al., 2006). En effet, Cep55 permet le recrutement au midbody des protéines Alix et Tsg101 (Tumor-susceptibility gene 101) qui sont des composants du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui est nécessaire aux fissions de membranes requises pour l'abscission (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Par conséquent, la déplétion de Cep55 génère la formation de cellules multinucléées.

Lors de l'entrée des cellule en mitose, Cdk1 phosphoryle Cep55. Cette phosphorylation dissocie d'une part Cep55 des centrosomes et permet d'autre part son interaction avec le PBD de Plk1 (Fabbro et al., 2005). Lors de la transition métaphase/anaphase, Plk1 phosphoryle alors Cep55 sur la sérine 436. Cette phosphorylation empêche le recrutement de Cep55 par la protéine Mklp1 du complexe « centralspindlin » et prévient ainsi d'une abscission prématurée (Bastos and Barr, 2010). Une fois Plk1 dégradée en fin de mitose, Cep55 n'est plus phosphorylée sur la sérine 436 et interagit ainsi avec la protéine Mklp1, localisée au midbody, ce qui permet l'abscission (**Figure 18**).

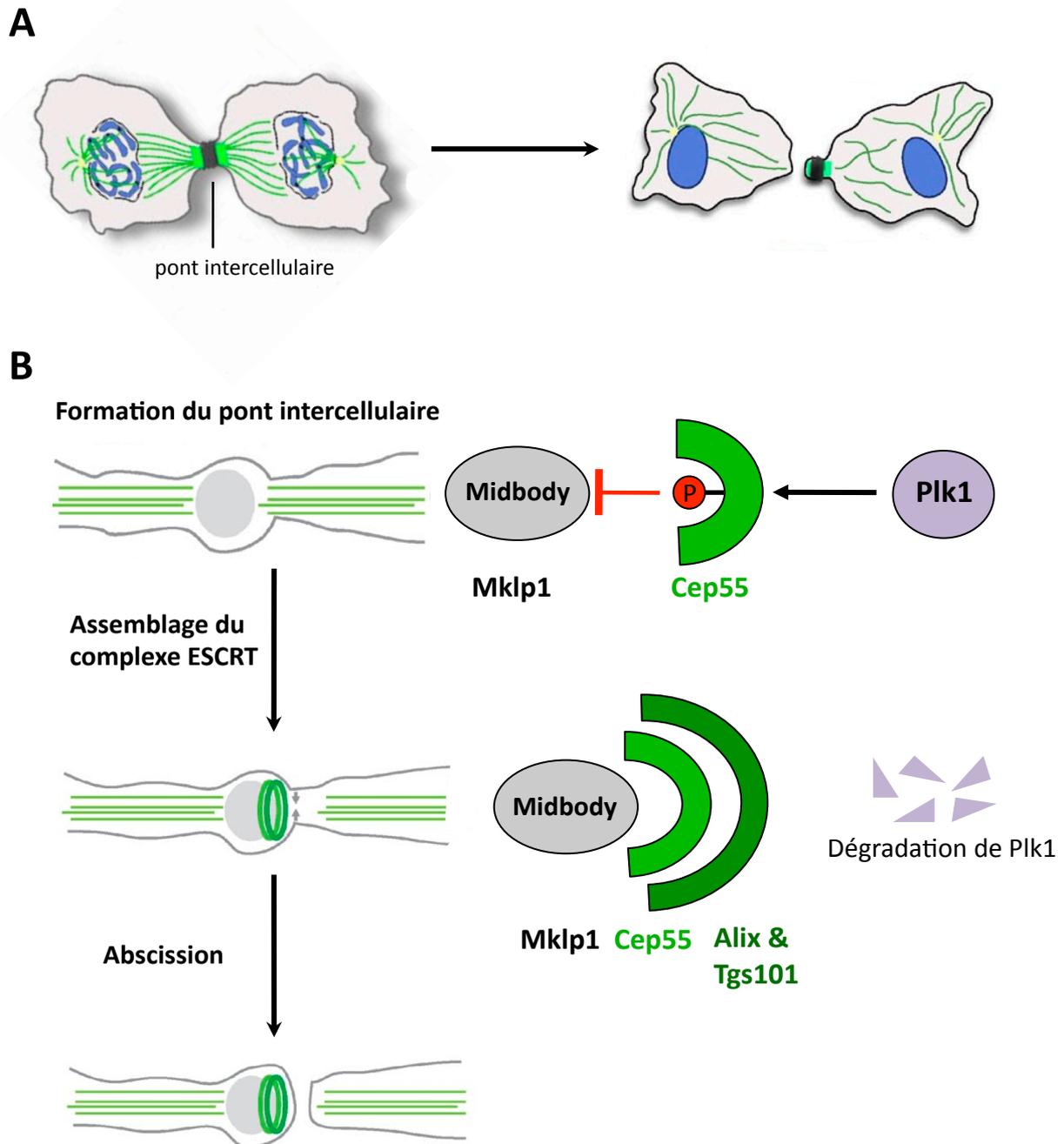


Figure 18 : Plk1 régule l'abscission

A. L'abscission

B. Plk1 régule le recrutement de Cep55 au midbody pour permettre l'abscission.

La phosphorylation de Cep55 par Plk1 inhibe son recrutement prématuré par la protéine Mklp1. La dégradation de Plk1 en fin de mitose permet l'interaction entre Cep55 et Mklp1 au midbody. Cep55 recrute les protéines Alix et Tgs101 du complexe ESCRT requises pour l'abscission. (schéma adapté de Bastos and Barr, 2010)

En début de mitose Cdk1 phosphoryle la protéine golgienne Nir2 sur la sérine 382 (Litvak et al., 2004). Cette phosphorylation dissocie Nir2 de l'appareil de Golgi et permet son recrutement au niveau du sillon de division et du midbody pendant la cytokinèse. Par ailleurs, la phosphorylation de Nir2 par Cdk1 lui permet d'interagir avec le domaine PBD de Plk1. Cette interaction semble importante pour réguler l'abscission car la surexpression d'un mutant phosphodéficient de Nir2, incapable d'interagir avec Plk1, affecte le bon déroulement de la cytokinèse entraînant *in fine* l'apparition de cellules plurinucléées.

IV. Plk1 et cancers

1. Rôle de Plk1 dans la transformation oncogénique

De manière cohérente avec ses fonctions au cours de la division cellulaire, plusieurs études suggèrent que Plk1 est impliquée dans le processus de transformation maligne (Eckerdt et al., 2005 ; van de Weerd and Medema, 2006 ; Luo and liu, 2012).

Bien que l'activité oncogénique de Plk1 n'ait pas encore été formellement démontrée, plusieurs indices laissent penser qu'une expression anormalement élevée de Plk1 pourrait être impliquée dans le développement de tumeurs (Smith et al., 1997). En effet, l'augmentation de l'activité de Plk1 dans les cellules favorise la division incontrôlée des cellules (qui échappent aux points de contrôle du cycle cellulaire), induit la formation de cellules aneuploïdes et stimule les propriétés invasives des cellules au travers la matrice extracellulaire; trois caractéristiques majeures des cellules tumorales (Mundt et al., 1997 ; Smits et al., 2000 ; Meraldi et al., 2002 ; Yamaguchi et al., 2005 ; Rizki et al., 2007 ; Fu et al., 2008).

Par exemple, la surexpression de Plk1 dans des fibroblastes murins entraîne leur transformation oncogénique, caractérisée par une capacité proliférative accrue des cellules, qui sont alors capables de se développer en suspension dans un milieu constitué d'agar mou (Smith et al., 1997). De plus, l'injection de ces cellules transformées chez des souris immunodéficientes provoque la formation de tumeurs (Smith et al., 1997).

Il n'est donc pas surprenant que Plk1 soit retrouvée surexprimée dans de nombreuses tumeurs chez l'Homme tels que les carcinomes, les lymphomes et les mélanomes. Par exemple, des niveaux particulièrement élevés d'expression de Plk1 ont été retrouvés dans les cancers du sein, des ovaires et de la prostate mais également dans des lymphomes non hodgkiniens ou encore les mélanomes de la peau (Takai et al., 2001 ; Kneisel et al., 2002 ; Weichert et al., 2004). Il est également important de souligner que la surexpression de Plk1 dans les cancers constitue un facteur de mauvais pronostic vital (Kneisel et al., 2002 ; Strebhardt, 2010).

Cependant, aucune étude n'a montré jusqu'à présent qu'une mutation de Plk1 soit directement responsable de la transformation tumorale. Puisque l'expression et l'activité de Plk1 atteignent leur maximum au cours de la mitose, la forte expression de Plk1 observée dans les tumeurs pourrait ne refléter que le pourcentage élevé de cellules en mitose, caractéristique de l'hyperprolifération des cellules tumorales.

2. Plk1, une cible thérapeutique dans les cancers ?

Comme nous venons de le voir dans ce manuscrit, Plk1 est un acteur clef de la division cellulaire dont l'expression est bien souvent dérégulée dans plusieurs types de tumeurs humaines.

Par ailleurs, des travaux pionniers sur l'étude de la fonction de Plk1 ont montré que la micro-injection d'anticorps dirigés contre Plk1 dans des cellules humaines immortalisées altère sévèrement la division des cellules et induit leur mort cellulaire alors que la micro-injection dans des cellules non immortalisées bloque transitoirement les cellules en phase G2 (Lane and Nigg, 1996). Cette réponse différentielle entre les cellules saines et tumorales suggère que l'inhibition de Plk1 pourrait être un outil intéressant pour cibler spécifiquement les cellules malignes.

Au cours des dernières années, Plk1 a ainsi suscité l'intérêt de la communauté scientifique (y compris celle de l'industrie pharmaceutique) en tant que cible thérapeutique pour entraver la prolifération anarchique des cellules cancéreuses. Afin d'inhiber l'expression et l'activité de Plk1 dans des cellules tumorales, différentes approches ont été testées parmi lesquelles l'utilisation d'anticorps bloquant, l'expression d'ARN interférent ou encore l'utilisation de molécules inhibitrices comme par exemple, le BI 2536 (Strebhardt, 2010).

3. Le BI 2536, un inhibiteur de Plk1

Le BI 2536 (dihydropteridinone derivative) est un inhibiteur spécifique de l'activité catalytique de Plk1 qui agit en empêchant la fixation de l'ATP sur Plk1 (Strebhardt, 2010).

Le traitement de cellules immortalisées en culture avec le BI 2536 affecte la progression du cycle cellulaire et les cellules restent bloquées en prométaphase puis meurent par apoptose (Lénart et al., 2007 ; Steegmaier et al., 2007).

Par ailleurs, l'analyse de xéno greffes de tumeurs humaines chez la souris, montre que l'administration du BI 2536 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses et induit la régression de la tumeur en provoquant l'apoptose des cellules tumorales (Steegmaier et al., 2007).

Chez l'Homme, des essais cliniques en phase II sont en cours chez des patients atteints de cancers de la prostate, du poumon et du pancréas (Strebhardt, 2010).

CHAPITRE 3 : OPTINEURINE

I. Généralités

II. Principales caractéristiques du gène *Optineurine*

III. Structure d'Optineurine

IV. Optineurine, une protéine multifonctionnelle

1. Optineurine, un régulateur du trafic vésiculaire associé à l'appareil de Golgi

2. Optineurine, un régulateur des voies de sécrétion

3. Optineurine, un effecteur de la voie d'activation NF- κ B

A. La voie classique d'activation de NF- κ B

B. Optineurine, un régulateur négatif de la voie NF- κ B stimulée par le TNF- α

C. Optineurine, un régulateur positif de la voie NF- κ B stimulée par la protéine Tax

4. Optineurine, un effecteur de la réponse interféron

A. Induction des gènes interférons au cours de l'immunité innée antivirale

B. Optineurine, un régulateur de la voie d'activation du facteur IRF3

5. Optineurine, un récepteur de l'autophagie des bactéries

A. Définition de l'autophagie

B. Optineurine régule l'adressage sélectif des salmonelles vers les autophagosomes

V. Pathologies associées à Optineurine

1. Optineurine et le glaucome à angle ouvert

2. Optineurine et la sclérose latérale amyotrophique

3. Optineurine et la maladie osseuse de Paget

CHAPITRE 3 : OPTINEURINE

I. Généralités

Optineurine est une protéine de 67 kDa, exprimée de façon ubiquitaire, qui a été isolée lors d'un crible double hybride chez la levure comme un partenaire d'interaction de la protéine adénovirale E3-14.7 (group C early transcription region 3 14.7 kDa protein). Elle a été appelée en conséquence FIP-2 (For 14.7K-Interacting Protein-2) (Li et al., 1998).

L'expression de FIP-2 est induite par le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) dans les cellules humaines 293 et dans les cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7. Ces premiers travaux montrent également que FIP-2 bloque la capacité de la protéine virale E3-14.7 de protéger les cellules 293 contre l'apoptose induite par le TNF- α (Li et al., 1998).

FIP-2 présente 53% d'homologie de séquence avec NEMO (NF- κ B Essential Modulator), un régulateur essentiel dans la voie des facteurs de transcription NF- κ B, et a été appelée par conséquent NRP (NEMO-Related Protein) (Schwamborn et al., 2000).

Des mutations dans le gène codant pour FIP-2 ont été trouvées chez des patients présentant un glaucome primaire à angle ouvert (POAG, primary open-angle glaucoma) et FIP-2 a été appelée par la suite Optineurine (Optn) pour « Optic neuropathy-inducing » (Rezaie et al., 2002).

Optn a été depuis impliquée dans d'autres pathologies. En effet, des mutations d'*Optn* ont été associées à la sclérose latérale amyotrophique et des variants d'*Optn* constituent un facteur de risque génétique pour la maladie osseuse de Paget (Marumaya et al., 2010 ; Albagha et al., 2010).

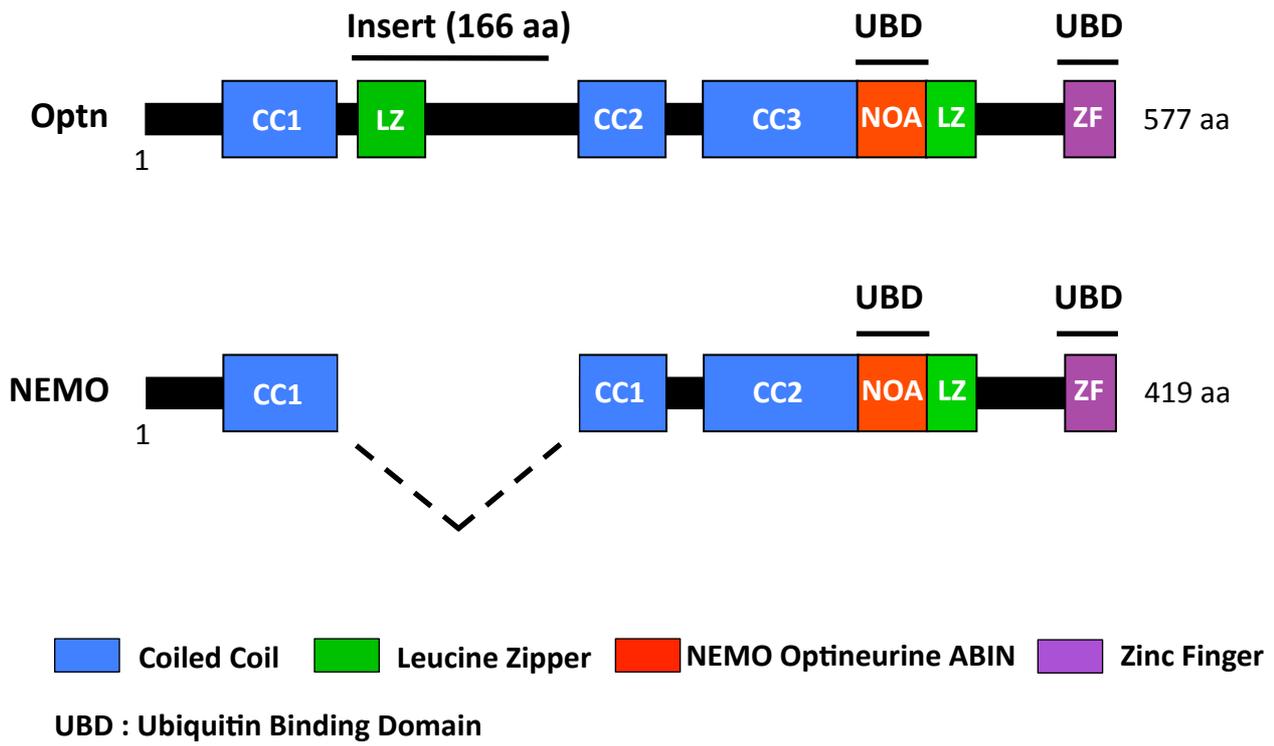


Figure 19 : Structures d'Optineurine et de NEMO

II. Principales caractéristiques du gène *Optineurine*

Chez l'Homme, le gène codant pour Optn est présent dans une région génomique d'environ 37 kb localisée sur le chromosome 10p13. Il est composé de 16 exons : 3 exons non-codant dans la région 5' non traduite (5'-UTR) suivis par 13 exons codant une protéine de 577 acides aminés. L'analyse de la région promotrice a permis d'identifier une séquence consensus de fixation aux facteurs de transcription NF-κB, ainsi que différents sites potentiels de liaison pour le facteur Sp1 (Specificity protein 1), localisés immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription (Sudhakar et al., 2009).

Quatre isoformes d'ARN messenger codant toutes pour la même protéine et issues de l'épissage alternatif de la région 5'-UTR de ce gène ont été identifiées (Rezaie and Sarfarazi, 2005 ; Ying and Yue, 2012).

Des homologues d'*Optn* ont été retrouvés exclusivement chez les vertébrés, des poissons jusqu'aux primates (chimpanzé) en passant par les oiseaux (poulet), les rongeurs (rat, souris) et les animaux domestiques (vache, chien) (Ying and Yue, 2012).

III. Structure d'*Optineurine*

L'alignement des séquences d'Optn et NEMO montre que ces deux protéines partagent 53% d'homologie à l'exception d'une région de 166 acides aminés localisée dans la partie N-terminale d'Optn, appelée domaine « Insert » (**Figure 19**).

Au niveau structural, Optn est une protéine dimérique à domaines « coiled-coil » (Schwamborn et al., 2000). De manière semblable à NEMO, Optn possède dans sa partie C-terminale deux domaines de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitin Binding Domain, UBD), composés d'un domaine NOA (conservé au niveau des protéines NEMO, Optineurine et ABINs) ainsi qu'un domaine en doigt de zinc (ZF), qui lui confèrent la capacité de se lier à des chaînes de poly-ubiquitines UbK63 (chaînes d'ubiquitine utilisant la lysine K63) (Laplantine et al., 2009). Optn contient également deux Leucine Zipper : le premier localisé dans le domaine « Insert » et un deuxième situé en position C-terminale.

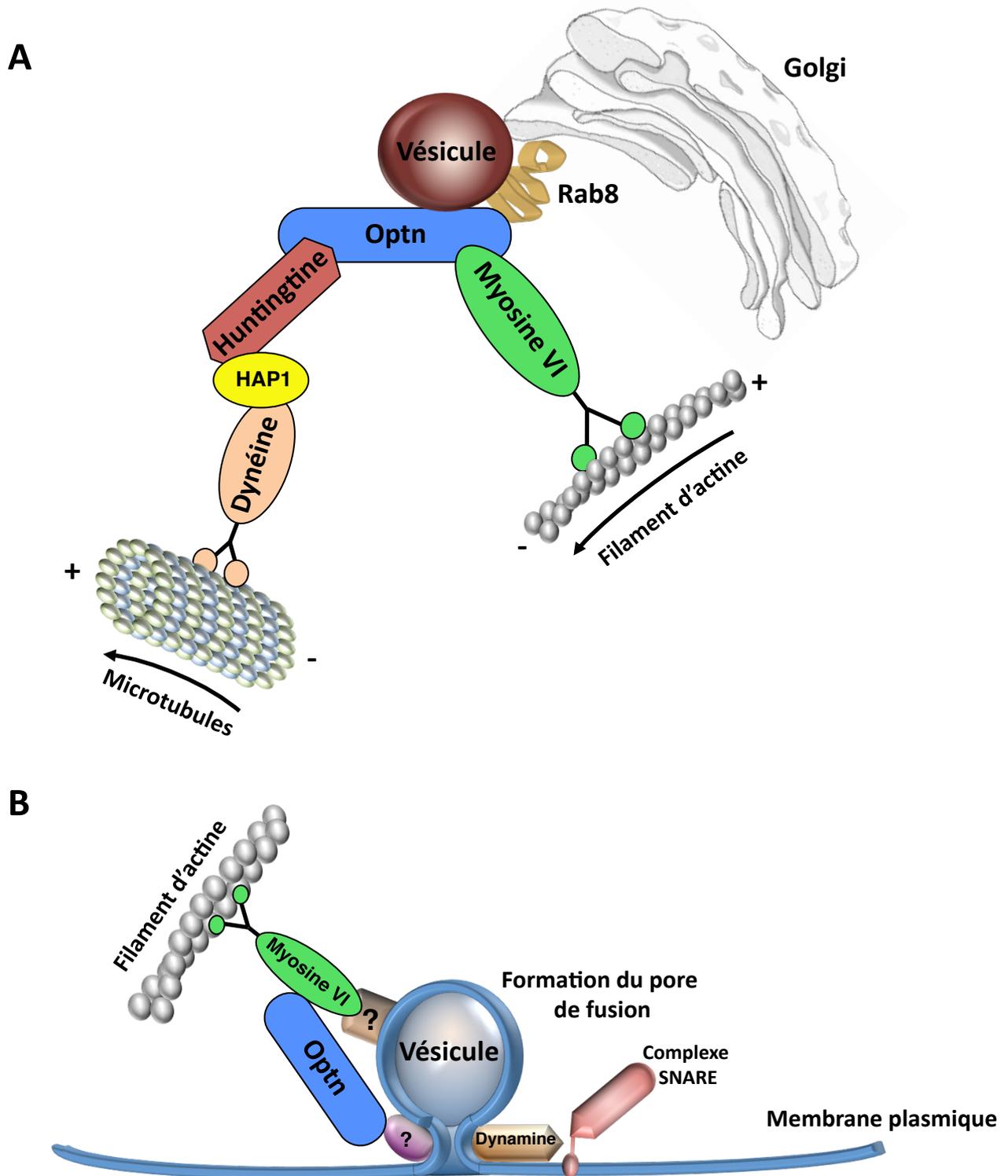


Figure 20 : Rôles d'Optineurine dans le transport vésiculaire associé au Golgi et dans les voies de sécrétion

A. Optn interagit avec Huntingtine, Myosine VI et Rab8 ; cette dernière interaction lui permettant de se localiser au niveau de l'appareil de Golgi. Optn permettrait de réguler le trafic vésiculaire associé aux microtubules (via Huntingtine) ou aux filaments d'actine (via la Myosine VI). (schéma adapté de Sahlender et al., 2005)

B. Optn et Myosine VI sont impliquées dans le mécanisme de fusion des vésicules de sécrétion des protéines à la membrane plasmique. (schéma adapté de Bond et al., 2011)

IV. Optineurine, une protéine multifonctionnelle

1. Optineurine, un régulateur du trafic vésiculaire associé à l'appareil de Golgi

Différentes études ont montré qu'Optn était localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Schwamborn et al., 2000 ; Hattula and Peränen, 2000). Différents interactants golgiens d'Optn impliqués dans le trafic membranaire ont par la suite été identifiés par des cribles doubles hybrides, suggérant qu'Optn pourrait jouer un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire (**Figure 20A**) :

- Rab8, une petite protéine G qui régule le trafic vésiculaire entre le réseau trans-golgien et la membrane plasmique, est la protéine d'ancrage permettant l'association d'Optn à l'appareil de Golgi (Hattula and Peränen, 2000 ; Sahlender et al., 2005). De façon intéressante, le mutant Rab8 T22N inactif ne peut plus s'associer avec Optn, alors que le mutant Rab8 Q67L actif interagit de façon constitutive avec le domaine N-terminal d'Optn, ce qui suggère que l'interaction d'Optn avec Rab8 nécessiterait l'activité de cette GTPase (Hattula and Peränen, 2000).
- Huntingtine (Htt), la protéine mutée dans la maladie neurodégénérative de Huntington (Faber et al., 1998). Bien que la fonction précise de cette protéine soit encore inconnue, plusieurs études récentes montrent que Htt joue un rôle crucial dans la régulation des voies de transport vésiculaire associées aux microtubules (Caviston and Holzbaur, 2009). Htt interagit avec la protéine HAP1 (Huntingtin-Associated Protein 1), elle-même associée aux dynéines qui régulent le transport de vésicules le long des microtubules (Hoffner et al., 2002 ; Harjes and Wanker, 2003 ; del Toro et al., 2009 ; Caviston et al., 2011). Cette fonction d'Htt semble être dépendante d'Optn et de Rab8, puisqu'une forme mutée d'Htt, présentant une expansion de polyglutamine, délocalise Optn et Rab8 de l'appareil de Golgi ce qui perturbe le trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et les lysosomes (del Toro et al., 2009). Il a ainsi été proposé qu'Optn puisse servir d'adaptateur entre Htt et Rab8 pour permettre la connexion entre l'appareil de Golgi et le réseau de microtubules (Hattula and Peränen, 2000 ; Sahlender et al., 2005).

De plus, Htt et Optn semblent également intervenir dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi puisque la délétion de l'une ou l'autre de ces protéines induit la

fragmentation de l'appareil de Golgi (Caviston et al., 2007 ; del Toro et al., 2009 ; Sippl et al., 2011). Par ailleurs, l'association d'Optn avec l'appareil de Golgi dépend de son domaine de liaison à l'ubiquitine puisque la mutation de son domaine d'interaction avec les ubiquitines (Optn D474N) entraîne sa relocalisation cytoplasmique (Mankouri et al., 2010 ; Nagabhushana et al., 2010). Ces résultats suggèrent qu'Optn pourrait interagir avec une autre protéine ubiquitinée, en plus de Rab8, pour se localiser à l'appareil de Golgi. Un des candidats potentiels serait Htt puisque cette protéine est constitutivement ubiquitinée et que son interaction avec Optn dépend d'une région incluant le domaine NOA (Hattula and Peränen, 2000 ; Zucchelli et al., 2011).

- Myosine VI, une protéine motrice associée aux filaments d'actine impliquée dans les voies d'endocytose et les voies de sécrétion (Sahlender et al., 2005). Des expériences de délétion ont montré qu'Optn interagit avec la queue de la Myosine VI via un domaine C-terminal (entre les acides aminés 412-520) et la mutation de ce motif perturbe le transport entre le réseau trans-golgien (TGN, Trans Golgi Network) et la membrane plasmique. Optn permettrait ainsi le recrutement de la Myosine VI au niveau de l'appareil de Golgi pour réguler le transport de protéines cargo du réseau trans-golgien vers la membrane plasmique.

En conclusion, deux des fonctions essentielles et interdépendantes d'Optn seraient la coordination du trafic vésiculaire associé aux microtubules (via Htt) ou aux filaments d'actine (via Myosine VI) et le maintien de l'intégrité structurale de l'appareil de Golgi (Sahlender et al., 2005).

2. Optineurine, un régulateur des voies de sécrétion

Les protéines sécrétées par les cellules sont synthétisées au sein du réticulum endoplasmique, puis sont transportées par un flux vésiculaire vers l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles qui permettent leur maturation. Une fois dans le *trans* Golgi, elles sont dirigées dans des vésicules de sécrétion qui sont transportées vers la surface. Lorsque ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, le contenu des vésicules est libéré dans le milieu extracellulaire. Ce processus, appelé exocytose, est nécessaire pour assurer certaines fonctions cellulaires comme la migration des cellules, la transmission entre neurones, le transport polarisé des protéines et la sécrétion d'enzymes ou d'hormones.

Plusieurs études ont montré qu'Optn et son partenaire d'interaction Myosine VI sont impliqués dans le mécanisme de sécrétion des protéines (Warner et al., 2003 ; Sahlender et al., 2005; Chibalina et al., 2008 ; Bond et al., 2010 ; Sippl et al., 2011). Ainsi, la déplétion d'Optn par ARN interférent dans des cellules provenant d'une lignée neuronale (RGC-5, Retinal Ganglion Cells) inhibe la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Sippl et al., 2011).

La sécrétion des protéines dans l'environnement extracellulaire requiert la formation d'une structure appelée pore entre la membrane de la vésicule et la membrane plasmique à l'endroit où la fusion membranaire se produit. Le pore de fusion peut être transitoire et se refermer ou s'étendre de sorte que la fusion entre la vésicule ou la membrane plasmique devienne complète permettant la libération des molécules transportées.

De manière intéressante, Optn et Myosine VI colocalisent avec les vésicules de sécrétion au niveau de la membrane plasmique et sont nécessaires pour la fusion de ces vésicules de sécrétion avec la membrane cellulaire (Bond et al., 2010). L'analyse précise des anomalies de fusion des vésicules a permis de montrer que la déplétion d'Optn ou de Myosine VI conduit à une augmentation de la proportion de fusions incomplètes et par conséquent à une élévation du nombre de vésicules présentes à la membrane plasmique. Ces travaux suggèrent qu'Optn pourrait servir de lien entre le pore de fusion et le cytosquelette d'actine associé à la Myosine VI (**Figure 20B**).

3. Optineurine, un effecteur de la voie d'activation NF- κ B

A. La voie classique d'activation de NF- κ B

La voie d'activation NF- κ B joue un rôle très important dans un grand nombre de processus physiologiques parmi lesquels la réponse immunitaire innée et adaptative, l'inflammation, la survie et la prolifération cellulaire.

Les protéines NF- κ B (qui existent sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères) sont des activateurs transcriptionnels dont l'activité est contrôlée par des mécanismes de rétention cytoplasmique (Hayden and Ghosh, 2012). Les membres de la famille NF- κ B sont au nombre de cinq : p50, p52 (issus respectivement des précurseurs p105 et p100), c-rel, p65 (aussi appelé relA) et relB.

En absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF- κ B sont maintenus dans le cytoplasme par leur interaction avec des molécules de la famille I κ B qui comprend cinq protéines inhibitrices (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105 et p100).

De nombreux stimuli sont capables d'activer la voie classique NF- κ B. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) ou l'interleukine-1, les produits bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) ou les virus comme HTLV1 (Human T-cell Leukemia Virus) via sa protéine virale Tax et une stimulation antigénique des récepteurs lymphocytaires T ou B.

Tous ces ligands activent des voies de signalisation qui leurs sont propres mais qui dans tous les cas conduisent à l'activation du complexe IKK (I κ B-kinase complex). Ce complexe est composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques à activité protéine kinase (IKK α et IKK β) et une sous-unité régulatrice, NEMO (Israël, 2010). Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle les I κ Bs ce qui induit leur ubiquitination (par des chaînes d'ubiquitine liées par la lysine K48, chaînes UbK48) qui conduit à leur dégradation par le protéasome. Libérés de leurs inhibiteurs, les complexes NF- κ B sont alors transportés dans le noyau où ils activent la transcription de leurs gènes cibles.

B. Optineurine, un régulateur négatif de la voie NF- κ B stimulée par le TNF- α

En réponse à une stimulation par le TNF- α , la protéine RIP1 (Receptor Interacting Protein 1) est rapidement recrutée au niveau du récepteur du TNF-R (TNF- α Receptor) puis

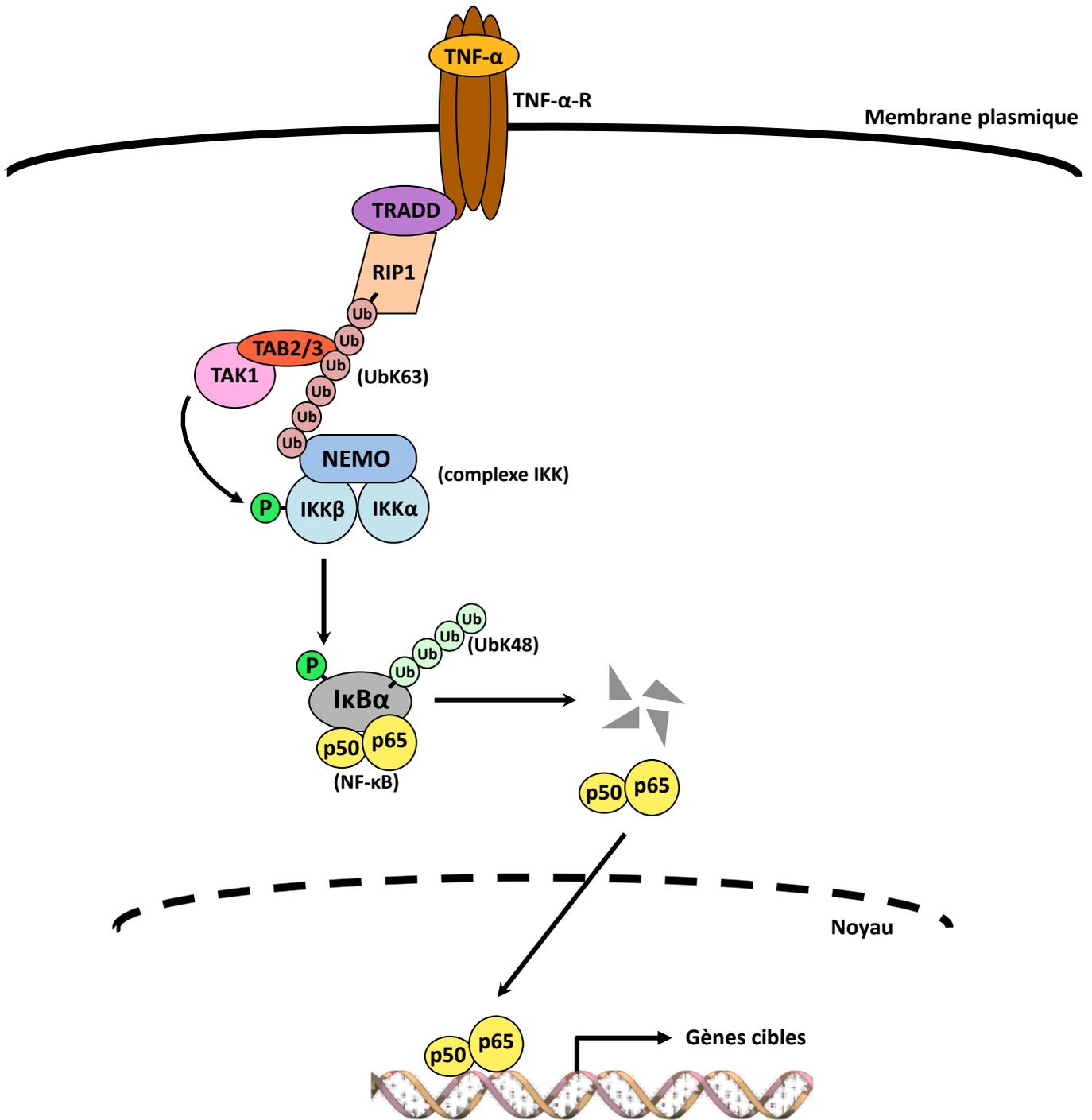


Figure 21 : Modèle d'activation de la voie NF-κB induite par le TNF-α

Le TNF-α induit la trimérisation de son récepteur (TNF-α-R) ainsi que le recrutement de la molécule adaptatrice TRADD qui recrute à son tour la protéine RIP1. Celle-ci est alors ubiquitinée par des chaînes d'ubiquitines K63 ce qui lui permet d'interagir avec le domaine de liaison aux ubiquitines de NEMO et de permettre le recrutement du complexe IKK au niveau du TNF-α-R. Le complexe IKK est alors activé par la phosphorylation de IKKβ par la kinase TAK1 (qui se lie aux protéines TAB). Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle IκBα qui est ubiquitinée par des chaînes d'ubiquitines K48 puis dégradée, ce qui libère les facteurs de transcription NF-κB (p50 et p65) qui peuvent aller dans le noyau et induire la transcription de leurs gènes cibles.

est polyubiquitinée par des chaînes d'ubiquitines K63 (UbK63) (Verhelst et al., 2011) (**Figure 21**). L'ubiquitination de RIP1 entraîne dans un premier temps le recrutement du complexe IKK au niveau du récepteur via la sous-unité NEMO. Comme je l'ai déjà mentionné, NEMO possède dans sa partie C-terminale deux domaines de liaison à l'ubiquitine qui lui confèrent la capacité de se lier à des chaînes de poly-ubiquitines K63 (chaînes d'ubiquitine utilisant la lysine K63) et d'interagir ainsi avec RIP1 ubiquitinée (Ea et al., 2006 ; Wu et al., 2006 ; Laplantine et al., 2009). Dans un second temps, la protéine kinase TAK1 (également recrutée au niveau du récepteur TNF-R) phosphoryle et active la sous-unité catalytique IKK β du complexe IKK, ce qui conduit à l'activation du complexe IKK et en conséquence à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (Verhelst et al., 2011).

L'activation du complexe IKK est transitoire et des études récentes indiquent que la régulation négative du complexe IKK est essentielle pour le maintien de l'homéostasie au sein d'un organisme. Ainsi, un défaut d'atténuation de l'induction de la voie NF- κ B pourrait conduire à une inflammation chronique et également au cancer (Lee et al., 2000). Un des mécanismes de régulation négative de la voie NF- κ B fait intervenir des déubiquitinases (DUB). Deux de ces DUB, appelées A20 et CYLD ont été impliquées dans la régulation négative du complexe IKK en induisant le clivage des chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1 (Wertz et al., 2004 ; Sun, 2008).

Plusieurs études suggèrent qu'Optn serait un régulateur négatif de la voie NF- κ B stimulée par le TNF- α (Zhu et al., 2007 ; Sudhakar et al., 2009 ; Nagabhushana et al., 2011) (**Figure 22**). En effet, Sudhakar et ses collaborateurs montrent que la déplétion d'Optn par ARN interférent conduit à une augmentation de l'activité de NF- κ B induite par le TNF- α (Sudhakar et al., 2009).

Contrairement à NEMO, Optn n'est pas un composant du complexe IKK (Schwamborn et al., 2000). Toutefois, basé sur l'homologie de séquence de leurs domaines de liaison aux ubiquitines (UBD), il a été proposé qu'Optn pourrait interférer avec l'interaction de NEMO à ses substrats ubiquitinés (Schwamborn et al., 2000 ; Laplantine et al., 2009). Ainsi, Optn pourrait entrer en compétition avec l'interaction de NEMO avec la protéine RIP1 lorsque celle-ci est polyubiquitinée par des chaînes d'ubiquitine K63 (Zhu et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, l'effet inhibiteur d'Optn sur la voie NF- κ B est aboli par sa mutation (Optn D474N) sur son domaine d'interaction avec les ubiquitines.

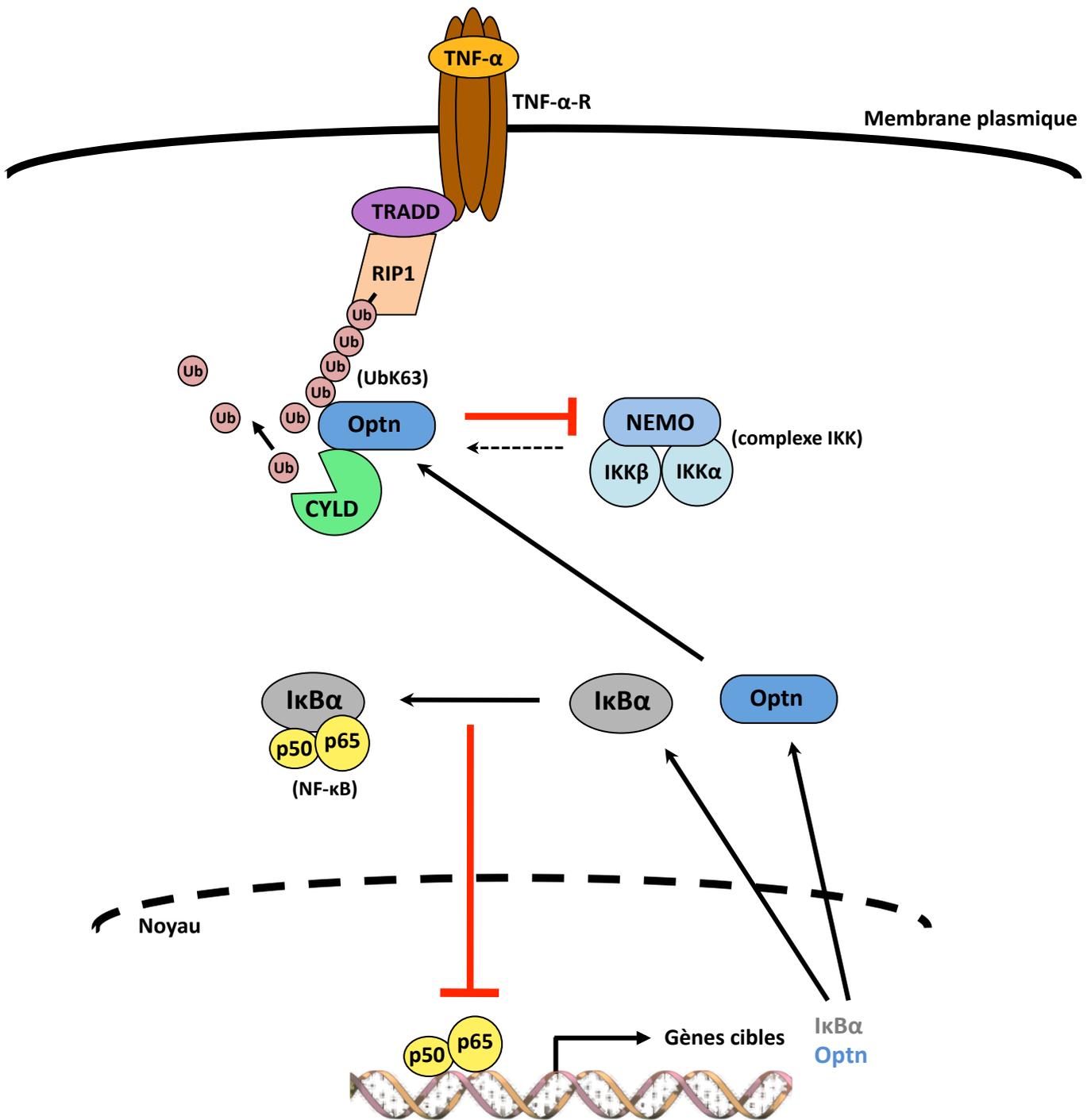


Figure 22 : Modèle de régulation négative de la voie NF-κB induite par le TNF-α

Parmi les gènes cibles du facteur de transcription NF-κB on retrouve les régulateurs négatifs de la voie de signalisation NF-κB tels que IκBα (qui séquestre NF-κB dans le cytoplasme) et Optn. Optn entre en compétition avec NEMO pour l'interaction avec la protéine RIP1 polyubiquitinée et bloque la cascade de signalisation en aval du complexe IKK. Optn recrute également la déubiquitineuse CYLD qui inhibe la voie NF-κB en clivant les chaînes d'ubiquitines K63 de RIP1.

L'effet inhibiteur d'Optn pourrait également s'expliquer par son association avec CYLD, une des déubiquitinasés connue pour réguler négativement la voie NF- κ B (Nagabhushana et al., 2011). En effet, en réponse au TNF- α , Optn permettrait l'interaction entre CYLD et la protéine RIP1 ubiquitinée conduisant à l'inhibition de l'activation de NF- κ B. Optn interagit également avec A20, une autre déubiquitinase, ce qui suggère qu'Optn pourrait servir d'adaptateur entre des déubiquitinasés et leurs substrats polyubiquitinés (Chalasan et al., 2009). L'expression d'Optn étant elle-même induite par NF- κ B, ces données suggèrent qu'Optn pourrait faire partie d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif de cette voie (Zhu et al., 2007 ; Sudhakar et al., 2009).

C. Optineurine, un régulateur positif de la voie NF- κ B stimulée par la protéine Tax

La protéine Tax est une oncoprotéine virale exprimée par le rétrovirus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) (Sun and Yamaoka, 2005). Elle est considérée comme la protéine clef de la pathogénèse liée à l'infection par HTLV-1, telle la leucémie à lymphocytes T de l'adulte, en dérégulant de nombreuses voies de signalisation cellulaires utilisant les facteurs de transcription CREB (cAMP-response element-binding protein), SRF (Serum Response Factor) et NF- κ B.

Dans les cellules transformées par HTLV-1, Tax est capable de stimuler de façon constitutive la voie NF- κ B en activant le complexe IKK (Sun and Yamaoka, 2005). Cette activation dépend d'une part de l'association de Tax avec la sous-unité régulatrice du complexe IKK, NEMO, et d'autre part de l'ubiquitination de Tax par des chaînes d'ubiquitines K63 par l'enzyme de conjugaison Ubc13 (Harhaj et al., 2007). Par ailleurs, Tax interagit directement avec la kinase TAK1 qui phosphoryle et active la sous-unité catalytique IKK β , conduisant à l'activation de NF- κ B (Wu and Sun, 2007).

Une étude récente publiée par notre laboratoire en collaboration avec le groupe de Renaud Mahieux suggère qu'Optn est un régulateur positif de la voie NF- κ B induite par Tax (Journo et al., 2009) (**Figure 23**). Ce travail montre que Tax est capable de recruter Optn via son domaine de liaison aux ubiquitines. Cette interaction augmente l'ubiquitination de Tax et en conséquence l'activation de NF- κ B. Par ailleurs, Tax et Optn interagissent également avec la protéine cellulaire TAX1BP1 (Tax1 Binding Protein 1) qui coopère avec Optn pour augmenter l'ubiquitination de Tax et ainsi potentialiser l'activation de NF- κ B.

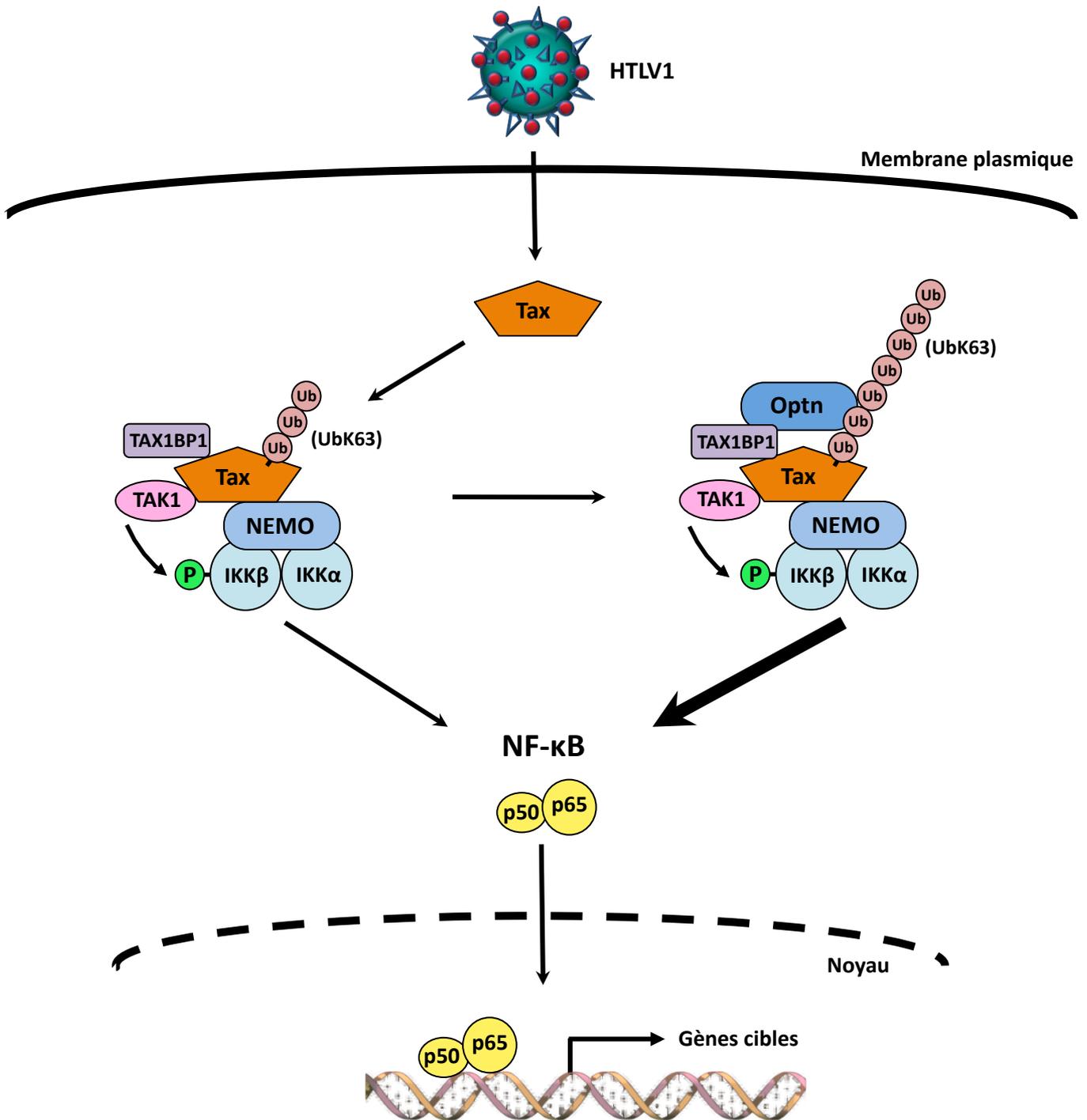


Figure 23 : Modèle d'activation de la voie NF-κB par la protéine virale Tax

Suite à l'infection par HTLV-1, l'oncoprotéine virale Tax active la voie NF-κB en stimulant le complexe IKK. Cette activation dépend de l'interaction de Tax avec NEMO et de l'ubiquitination de Tax par des chaînes d'ubiquitines K63. Optn interagit avec Tax (via son domaine de liaison aux ubiquitines) et avec la protéine cellulaire TAX1BP1. Ces interactions permettent d'augmenter l'ubiquitination de TAX et ainsi l'activation de NF-κB.

4. Optineurine, un effecteur de la réponse interféron

A. Induction des gènes interférons au cours de l'immunité innée antivirale

L'immunité innée antivirale est un événement primordial de la réponse de l'hôte à une infection virale. Elle repose en grande partie sur la synthèse et la sécrétion des interférons de type I (IFN- α/β) par les cellules infectées, qui induisent un état antiviral dans les cellules exposées au virus et provoquent l'activation de certaines cellules du système immunitaire telles que les cellules NK (Natural Killer), les macrophages et les cellules dendritiques.

La production d'interféron est déclenchée par la reconnaissance de motifs structuraux caractéristiques de l'agent viral parmi lesquels leur génome (ADN ou ARN double et simple brin) ou certaines protéines virales. La détection de ces motifs moléculaires appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) s'effectue grâce à des récepteurs membranaires (récepteurs de la famille Toll) ou cytosoliques (RIG-Like Helicases, RLH) qui activent à la fois les voies d'activation des facteurs NF- κ B et IRF3/IRF7 (Interferon Regulatory Factor 3/7) qui coopèrent pour permettre l'induction de la transcription des interférons de type I qui sont la première ligne de défense contre les virus (Hiscott, 2007).

Alors que l'activation de NF- κ B repose sur la dégradation d'un inhibiteur cytosolique, le facteur de transcription IRF3 est activé directement après phosphorylation par la kinase TBK1. Cette phosphorylation induit un changement de conformation d'IRF3 permettant sa dimérisation et son transport dans le noyau pour induire l'expression des gènes cibles (Hiscott, 2007).

B. Optineurine, un régulateur de la voie d'activation du facteur IRF3

La première étude suggérant une fonction d'Optn au cours d'une réponse immunitaire antivirale montre l'association d'Optn avec la kinase TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) (Morton et al., 2008). De façon intéressante, le domaine d'interaction d'Optn avec TBK1 est homologue à celui de TANK, NAP1 (NF- κ B-Activating kinase-associated Protein1) et SINTBAD (similar to NAP1 TBK1 adaptator), trois autres partenaires connus de TBK1 également impliqués dans la régulation des voies de transduction IRF3 et NF- κ B (Chau et al., 2008). Ces données suggèrent l'existence d'un complexe TBK1-Optn distinct de ceux formés avec les autres adaptateurs.

Plusieurs études suggèrent qu'Optn serait un régulateur négatif de la réponse immunitaire antivirale (Mankouri et al., 2010 ; Swarup and Nagabhushana, 2010 ; Sakaguchi et al., 2011). Mankouri et ses collaborateurs montrent que la déplétion d'Optn par ARN interférent conduit à une augmentation de l'expression, de la synthèse et de la sécrétion de l'IFN- β en réponse à l'infection des cellules par le virus Sendai (SeV) ou le traitement des cellules au poly(I:C), un analogue synthétique de l'ARN double brin viral (Mankouri et al., 2010). Ainsi, la réplication du virus de la forêt de Semliki est fortement inhibée dans des cellules invalidées pour l'expression d'Optn. A l'inverse, la surexpression d'Optn inhibe la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 et par conséquent l'expression de l'IFN- β en réponse à une infection virale. L'ensemble de ces données suggère qu'Optn agirait en ciblant la voie d'activation d'IRF3.

L'effet inhibiteur d'Optn nécessite l'interaction d'Optn avec un substrat ubiquitiné puisqu'un mutant d'Optn dans le domaine NOA (Optn D474N) n'affecte pas l'expression induite du gène IFN- β et n'interagit que faiblement avec TBK1 (Mankouri et al., 2010). Par ailleurs, la surexpression de deux mutants d'Optn (Optn Q398X et Optn E478G), identifiés chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, n'a pas d'effet sur l'activation d'IRF3 contrairement à la surexpression de la forme sauvage d'Optn (Sakaguchi et al., 2011). Ces deux mutations modifient probablement la liaison d'Optn aux chaînes d'ubiquitine, la première étant une mutation non-sens et la seconde étant localisée dans le domaine NOA.

De façon contradictoire avec ces études, l'analyse de souris « knock-in », exprimant une forme d'Optn incapable de lier l'ubiquitine (Optn^{D477N/D477N}), suggère qu'Optn pourrait être un activateur de TBK1 en réponse au lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou au poly(I :C) (Gleason et al., 2011).

La protéine ABIN1 (A20 binding inhibitor of NF- κ B 1) est un inhibiteur de la voie NF- κ B et possède dans sa partie C-terminale un domaine de liaison à l'ubiquitine fortement homologue à celui d'Optn. Dans une étude récente, Gao et ses collaborateurs montrent que suite à une infection virale, ABIN1 coopère avec TAX1BP1 et la déubiquitinase A20 pour inhiber la phosphorylation d'IRF3 induite par TBK1 et par conséquent l'expression de l'IFN- β (Gao et al., 2011). Selon leur modèle, le complexe ABIN1/TAX1BP1/A20 perturberait l'interaction entre l'E3 ubiquitine ligase TRAF3 et TBK1 conduisant à une diminution de l'ubiquitination de TBK1 et par conséquent de l'activation d'IRF3.

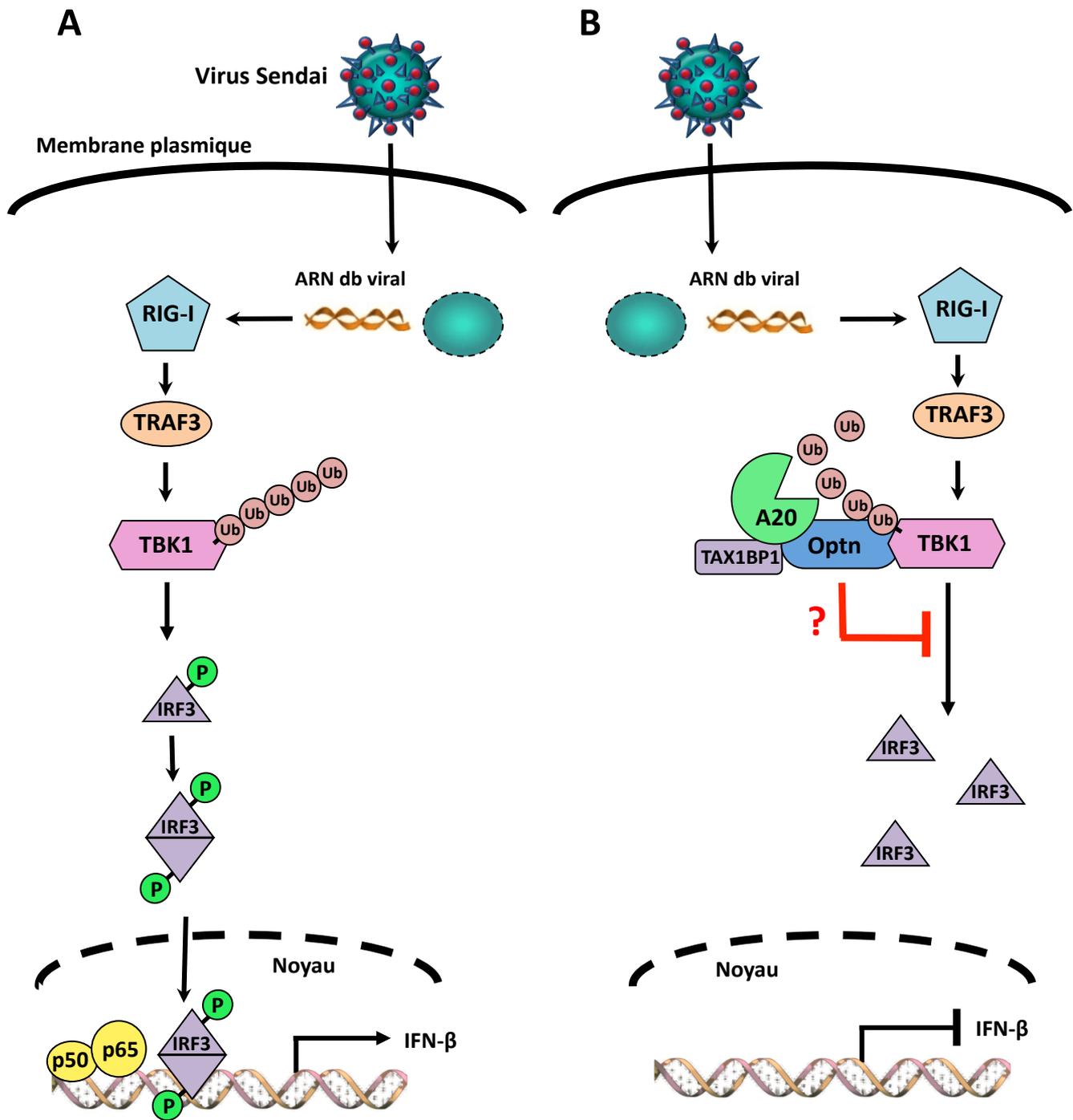


Figure 24 : Modèle de régulation de la voie IRF3

A. Voie d'activation IRF3

Suite à l'infection par le virus Sendai, le récepteur RIG-I active la voie d'activation du facteur de transcription IRF3 qui coopère avec NF-κB pour activer l'expression de l'interféron-β. IRF3 est activé directement après phosphorylation par TBK1. Cette phosphorylation induit un changement de conformation d'IRF3 permettant sa dimérisation et sa translocation nucléaire.

B. Hypothèse de régulation négative de la voie IRF3 par Optn

Optn interagit avec TBK1 et pourrait former un complexe avec TAX1BP1 et la déubiquitineuse A20 pour déubiquitiner TBK1 et inhiber l'activation de la voie IRF3.

(schéma adapté de Gao et al., 2011)

Optn interagissant également avec TAX1BP1 et les déubiquitinasés A20 et CYLD, Optn pourrait participer à la régulation négative de la réponse innée antivirale en servant d'adaptateur entre des déubiquitinasés et leurs substrats polyubiquitinés qui sont impliqués dans la voie d'induction des gènes IFN (**Figure 24**).

5. Optineurine, un récepteur de l'autophagie des bactéries

A. Définition de l'autophagie

L'autophagie, littéralement « se manger soi-même », est un processus du catabolisme cellulaire conservé au cours de l'évolution permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire par la dégradation et le recyclage d'organites superflus ou endommagés ainsi que des protéines agrégées ou mal conformées (Green et al., 2011). Des portions du cytoplasme sont alors séquestrées dans des vésicules appelées autophagosomes qui sont dégradées après fusion avec les lysosomes.

La machinerie autophagique s'articule en trois étapes distinctes : l'initiation, l'élongation et la maturation. Brièvement, lors de l'étape d'initiation, le complexe de formation des autophagosomes Vps34/Beclin-1 assure la formation d'un croissant membranaire isolé dans le cytoplasme appelé le phagophore (Tooze and Yoshimori, 2010). Le phagophore s'étend ensuite lors de l'étape d'élongation, sous le contrôle de deux systèmes de conjugaison impliquant respectivement le complexe ATG12 ainsi que la protéine LC3 (Light Chain 3), qui une fois clivée, se localise dans l'autophagosome. Cette structure résulte ainsi de la fusion des deux extrémités du phagophore en croissance et consiste en une vésicule à double membrane qui séquestre en son sein un morceau du cytosol contenant protéines à longue durée de vie, organites sénescents et produits de dégradation. Enfin, au cours de l'étape de maturation, l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour former des autolysosomes qui digèrent le contenu cytoplasmique séquestré.

Par sa capacité destructrice, l'autophagie est également un mécanisme d'autodéfense cellulaire qui peut piéger puis dégrader des pathogènes intracellulaires. Ce processus est défini sous le terme de xénophagie (Knodler and Celli, 2011). Si les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de cette forme d'autophagie sont encore mal compris, de récents travaux décrivent un adressage sélectif des pathogènes intracellulaires vers les autophagosomes via des récepteurs cytoplasmiques (Jiang and Chen, 2012).

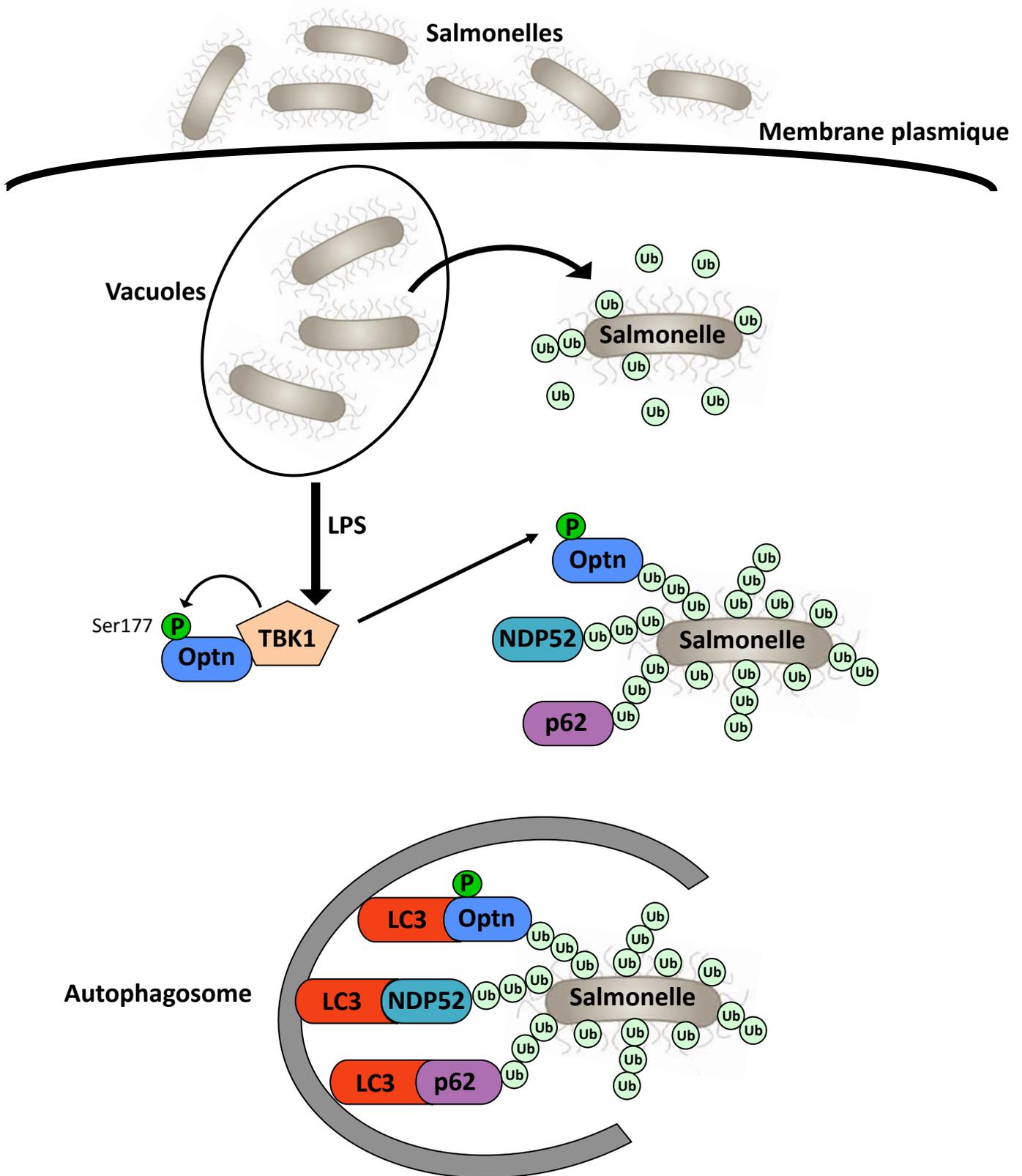


Figure 25 : Elimination des salmonelles invasives par la machinerie autophagique

Au cours de l'infection, les salmonelles sont séquestrées dans des vacuoles mais quelques-unes s'échappent et prolifèrent dans le cytoplasme. Ces pathogènes sont rapidement ubiquitinés et Optn, NDP52 et p62 interagissent avec les salmonelles ubiquitinées cytoplasmiques. La kinase TBK1, préalablement activée par le LPS bactérien, phosphoryle Optn sur la sérine 177 ce qui favorise son interaction avec la protéine LC3, ancrée à la membrane de l'autophagosome en formation, puis l'élimination des salmonelles par xénophagie.

B. Optineurine régule l'adressage sélectif des salmonelles vers les autophagosomes

Les résultats publiés par le laboratoire d'Ivan Dikic ont montré qu'Optn était un de ces récepteurs de l'autophagie à l'intersection entre immunité innée et la xénophagie (Wild et al., 2011). Cette étude montre qu'Optn est un récepteur pour l'autophagie des *Salmonella enterica* recouvertes d'ubiquitine (**Figure 25**).

Pour permettre l'autophagie des bactéries, Optn interagirait avec les pathogènes cytoplasmiques ubiquitinés via son domaine de liaison à l'ubiquitine et recruterait par ailleurs la kinase TBK1, qui une fois activée par les endotoxines bactériennes, phosphorylerait Optn et augmenterait l'interaction de son domaine LIR (LC3-Interacting Region) avec LC3. Ce mécanisme permettrait la reconnaissance des bactéries ubiquitinées par les autophagosomes puis l'élimination des bactéries par xénophagie (Wild et al., 2011).

En accord avec ce modèle, la déplétion d'Optn par ARN interférent altère l'autophagie des salmonelles et conduit à une augmentation de la prolifération bactérienne intracellulaire (Wild et al., 2011).

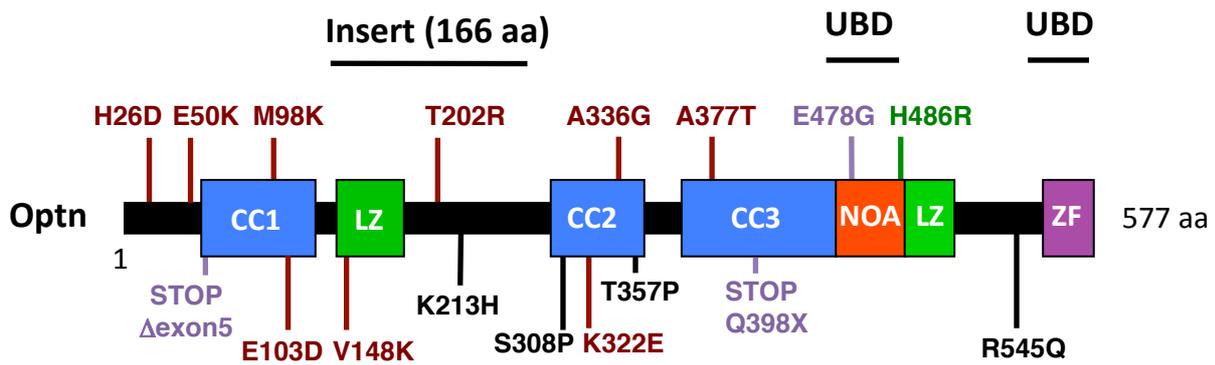
Deux autres récepteurs, p62 et NDP52 ont également été impliqués dans l'autophagie des bactéries (Pankiv et al., 2007 ; Zheng et al., 2009 ; Thurston et al., 2009).

NDP52 s'associe avec les bactéries ubiquitinées via son domaine de liaison aux ubiquitines où il interagit d'une part avec TBK1, via ses protéines adaptatrices NAP1 et SINTBAD, et d'autre part avec LC3 (Thurston et al., 2009). NDP52, tout comme Optn, permettrait de cibler les salmonelles ubiquitinées vers les autophagosomes.

La protéine adaptatrice de liaison à l'ubiquitine, p62 (ou Sequestosome 1, SQSTM1), régule également l'autophagie des bactéries bien que sa localisation soit différente de NDP52 et Optn (Pankiv et al., 2007 ; Zheng et al., 2009 ; Cemma et al., 2011 ; Wild et al., 2011).

L'identité de l'E3 ubiquitine ligase qui ubiquitine les bactéries intracellulaires et le type de chaînes d'ubiquitine conjuguées à la surface des pathogènes n'ont pas encore été identifiés.

On peut cependant supposer que la capacité d'Optn, p62 et NDP52 à interagir avec différents types de chaînes d'ubiquitine (K63, K48, linéaires...) permet à ces trois récepteurs d'être répartis dans des structures distinctes autour du pathogène ubiquitiné (Wild et al., 2011).



■ Coiled Coil
 ■ Leucine Zipper
 ■ NEMO Optineurine ABIN
 ■ Zinc Finger

UBD : Ubiquitin Binding Domain

Pathologies et polymorphismes	
Glaucome primaire à angle ouvert (POAG)	Polymorphismes
Glaucome juvénile à angle ouvert (JOAG)	
Sclérose latérale amyotrophique (SLA)	

Figure 26 : Mutations, polymorphismes et pathologies associés à Optineurine

V. Pathologies associées à Optineurine

1. Optineurine et le glaucome à angle ouvert

Le glaucome est une maladie dégénérative du nerf optique, caractérisée par l'apoptose des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC, Retinal Ganglion Cells), et pouvant entraîner une perte progressive de la vision (Allingham et al., 2009). Il existe plusieurs types de glaucomes, notamment le glaucome à angle ouvert (POAG, Primary Open-Angle Glaucoma) et le glaucome par fermeture d'angle, selon le type d'angle formé entre l'iris et la cornée. Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans la pathogenèse du glaucome à angle ouvert et des mutations des gènes codant pour la Myociline, la protéine WDR36, la Neurotrophine 4 ou Optn ont été identifiées chez des patients atteints de cette maladie (Liu and Allingham, 2011).

La mutation la plus fréquente d'Optn associée au glaucome à angle ouvert est une mutation faux-sens qui résulte en une substitution de l'acide glutamique en position 50 par une lysine (Optn E50K) (**Figure 26**). La surexpression de ce mutant chez des souris entraîne l'apoptose massive des cellules ganglionnaires de la rétine et une réduction de l'épaisseur de la rétine (Chi et al., 2010). Ces résultats confirment qu'une mutation d'Optn peut induire le développement de la dégénérescence rétinienne.

Une autre mutation d'Optn (Optn H486R) a été identifiée chez des patients atteints d'une forme plus rare et agressive de glaucome, le glaucome juvénile à angle ouvert (JOAG, Juvenile Open-Angle Glaucoma) (Willoughby et al., 2004). Précisons que cette seconde mutation est localisée dans le domaine NOA et empêche Optn d'interagir avec l'ubiquitine.

Les mécanismes moléculaires qui relient des mutations d'Optn au développement du glaucome n'ont toujours pas été élucidés. Il a cependant été montré qu'en réponse à un stimulus apoptotique Optn change de localisation de l'appareil de Golgi vers le noyau. De plus, la surexpression d'Optn protège les cellules contre l'apoptose induite par un stress oxydatif et bloque le relargage du Cytochrome C de la mitochondrie (De Marco et al., 2006). A l'inverse, la surexpression du mutant E50K empêche l'accumulation nucléaire d'Optn et perturbe l'intégrité de la membrane mitochondriale lors d'un stress oxydatif, ce qui induit l'apoptose déclenchée par la voie mitochondriale (De Marco et al., 2006 ; Meng et al., 2012).

2. Optineurine et la sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA ou ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une neuropathie caractérisée par la dégénérescence des motoneurons de la moelle, du tronc cérébral et des neurones moteurs centraux. Bien que les causes exactes de la SLA restent inconnues à ce jour, plusieurs études ont montré qu'environ 5 à 10% des cas sont transmis de façon héréditaire (Kiernan et al., 2011 ; Ying and Yue, 2012). Des mutations des gènes codant pour les protéines SOD1 (SuperOxyde Dismutase 1), FUS (FUsed in Sarcoma) et TDP-43 (Tar DNA-binding Protein 43) ont été trouvées chez des patients atteints de cette pathologie.

Récemment, trois mutations du gène *Optn* ont été identifiées dans des cas sporadiques ou des formes familiales de patients japonais (**Figure 26**) :

- une délétion de l'exon 5
- une mutation non-sens Q398X qui génère une protéine tronquée de la partie C-terminale
- une mutation faux-sens E478G localisée à l'intérieur du domaine de liaison à l'ubiquitine (Marumaya et al., 2010).

L'analyse de ces mutants a montré que la surexpression d'*Optn* Q398X ou E478G n'exerce plus d'effet inhibiteur sur l'activité de NF- κ B stimulée par le TNF- α ce qui suggère que des défauts d'activité de cette voie pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la SLA.

Optn est également présente dans des inclusions intracellulaires, où elle colocalise avec TDP-43 et SOD1 et avec FUS et la Myosine VI chez des patients avec des mutations de FUS (Marumaya et al., 2010 ; Ito et al., 2011).

A l'inverse, trois études réalisées chez des patients européens et japonais n'ont pas pu confirmer le rôle d'*Optn* dans la pathogenèse de la SLA (Millecamps et al., 2011 ; Belzil et al., 2011 ; Solski et al., 2012).

Des expériences *in vivo* sur des souris transgéniques, portant des mutations du gène *Optn*, devraient permettre dans le futur de confirmer ou d'invalider le rôle d'*Optn* dans le développement de cette pathologie.

3. Optineurine et la maladie osseuse de Paget

La maladie de Paget est une ostéopathie, caractérisée par un remodelage osseux excessif aboutissant à une hypertrophie progressive des os et à d'importantes anomalies de la microarchitecture osseuse (Michou et al., 2006). Au niveau cellulaire, la maladie de Paget est due à une augmentation de l'activité des ostéoclastes qui sont des cellules multinucléées dont la fonction est de réguler la résorption osseuse.

Bien que la cause exacte de cette pathologie reste inconnue, plusieurs publications ont démontré une contribution génétique dans certaines formes familiales (Ralston and Albagha, 2011). Par exemple, des mutations du gène *Sequestosome 1 (SQSTM1)* ont été identifiées chez 10% des patients atteints de la forme familiale de la maladie. Précisons également que *SQSTM1* code pour la protéine p62. En plus de sa fonction dans l'autophagie (cf. paragraphe précédent), p62 est également impliquée dans la voie d'activation de NF- κ B, où elle régule en outre l'ostéoclastogénèse (Geetha and Wooten, 2002 ; Michou et al., 2006 ; Saio et al., 2009). De plus, toutes les mutations du gène *SQSTM1* décrites dans la maladie de Paget affectent le domaine de liaison à l'ubiquitine.

De manière intéressante, une étude d'association pangénomique a permis de montrer que des variants génétiques d'*Optn* constituent un facteur de risque pour la maladie de Paget (Albagha et al., 2011).

Les fonctions décrites d'*Optn* et p62 (aussi bien dans la voie NF- κ B que dans l'autophagie) impliquent leur capacité à interagir avec l'ubiquitine. On peut supposer que le développement de la maladie de Paget pourrait faire intervenir un défaut d'ubiquitination ou une hyperstimulation de la voie NF- κ B.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

L'équipe de Robert Weil s'intéresse depuis de nombreuses années à la fonction d'Optineurine (Optn), une protéine homologue à NEMO (NF- κ B Essential Modulator), l'élément régulateur central de la voie d'activation des facteurs de transcription NF- κ B, qui a été cloné par le laboratoire.

Malgré cette homologie et son rôle présumé dans la voie de signalisation NF- κ B, Optn est une protéine golgienne, impliquée dans différentes fonctions cellulaires et voies de signalisation qui ne sont pas apparentées à la voie NF- κ B (Schwamborn et al., 2000).

Des données obtenues avant mon arrivée au laboratoire avaient permis d'identifier dans la séquence d'Optn un motif consensus de phosphorylation par Polo-like kinase 1 (Plk1), une kinase jouant un rôle clef à différentes étapes de la mitose.

Des résultats préliminaires indiquaient qu'Optn était phosphorylée par Plk1 sur la sérine en position 177, au sein de cette séquence consensus. Ces données suggéraient qu'Optn pouvait avoir une fonction mitotique régulée par Plk1.

Parallèlement, le laboratoire avait montré par une approche protéomique, en collaboration avec l'équipe de Giulio Superti-Furga (CeMM, Vienne), qu'Optn est un interactant du complexe phosphatase MYPT1-PP1 β .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, Plk1 est activée pendant la mitose par sa phosphorylation sur la thréonine 210 en fin de phase G2 par la kinase Aurora A (Seki et al., 2008). Cela entraîne un changement de conformation de Plk1, permet à son domaine PBD (Polo-Box Domain) d'interagir avec ses substrats et à son domaine kinase (KD) de les phosphoryler. Or, en fin de mitose, Plk1 est justement inactivée par déphosphorylation par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β , puis dégradée par protéolyse (Lindon and Pines, 2004 ; Yamashiro et al. 2008).

Mon projet de thèse consistait:

- à vérifier qu'Optn est un substrat de Plk1 et à comprendre le rôle de cette phosphorylation pendant la mitose,
- à valider l'interaction entre Optn et le complexe MYPT1-PP1 β et déterminer si Optn est impliquée dans la régulation de l'activité de Plk1 via son interaction avec ce complexe phosphatase.

RESULTATS

RESUME DES RESULTATS

Nous avons pu montrer par des approches *in vitro* et *ex vivo* qu'Optn est phosphorylée par Plk1 sur la sérine 177 en fin de phase G2 et pendant la mitose. Nos expériences indiquent que cette phosphorylation abolit l'interaction entre Optn et Rab8 (la protéine d'ancrage d'Optn au niveau de l'appareil de Golgi), provoquant ainsi la translocation d'Optn dans le noyau en fin de phase G2.

Par ailleurs, des expériences biochimiques ont permis de valider *ex vivo* l'interaction entre Optn et le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β . Nos données suggèrent qu'Optn interagit directement avec la sous-unité régulatrice MYPT1 via son domaine Leucine Zipper (LZ) localisé au sein du domaine « Insert ».

Nos résultats indiquent également qu'Optn est impliquée dans la régulation négative de Plk1 par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β . En effet, l'invalidation transitoire de l'expression d'Optn par ARN interférent est responsable d'une augmentation de la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210 et donc de son activité. D'un point de vue mécanistique, nous avons montré qu'Optn permet la phosphorylation de MYPT1 sur la sérine 473 par Cdk1. Dans un premier temps, cette phosphorylation génère un motif d'ancrage pour le domaine Polo-Box (PBD) de Plk1 et permet ainsi l'interaction de Plk1 avec MYPT1. Dans un deuxième temps, la sous-unité catalytique PP1 β déphosphoryle Plk1 sur sa thréonine 210 et par conséquent l'inactive.

Les conséquences fonctionnelles de la déplétion d'Optn et donc de l'hyperactivité de Plk1 sont des défauts de cytokinèse et de ségrégation des chromosomes aboutissant à l'apparition de cellules plurinucléées. Ces défauts de multinucléation sont complétés par la forme sauvage d'Optn, mais pas par un mutant qui ne peut être phosphorylé par Plk1, ce qui suggère que la phosphorylation et la translocation nucléaire conséquente d'Optn sont requises pour la régulation de l'activité de Plk1 et une progression mitotique efficace. Ces résultats, qui mettent en évidence un mécanisme de rétrocontrôle négatif par lequel Plk1 module la localisation d'Optn pendant la mitose pour réguler sa propre activité, ont été publiés dans la revue *Molecular Cell* (Kachaner et al., 2012) (**Figure 27**).

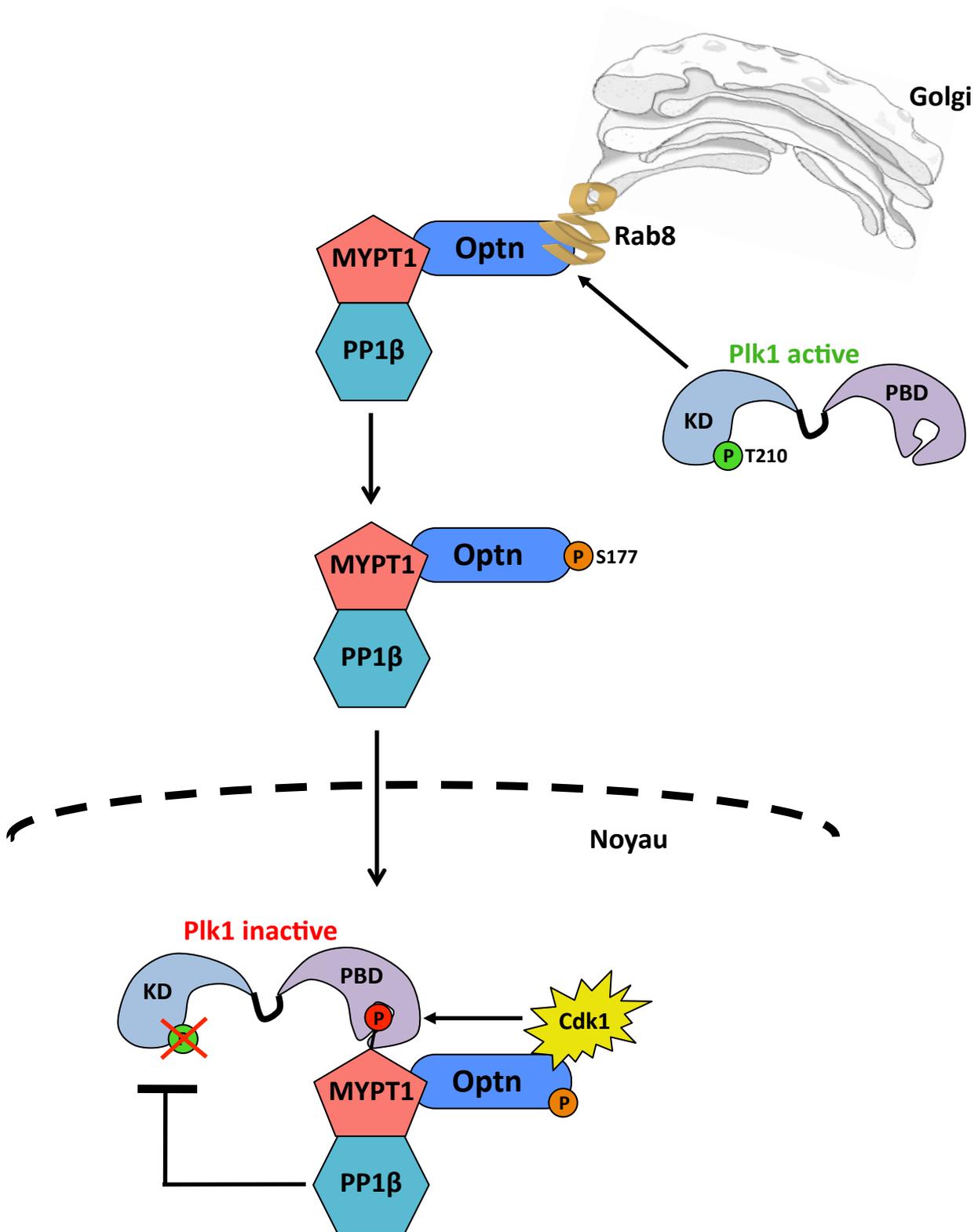


Figure 27 : Modèle de régulation négative de l'activité de Plk1

Lors de la transition G2/M, Plk1 phosphoryle Optn sur la sérine 177. Cette phosphorylation abolit l'interaction entre Optn et Rab8 (la protéine d'ancrage d'Optn à l'appareil de Golgi) et induit la translocation d'Optn dans le noyau. Puis Optn permet la phosphorylation de MYPT1 par Cdk1 sur la sérine 473 ce qui génère un motif d'interaction pour le domaine Polo-Box de Plk1 (PBD). Consécutivement, PP1β déphosphoryle Plk1 sur la thréonine 210.

ARTICLE

**Plk1-dependent phosphorylation of Optineurin provides a
negative feedback mechanism for mitotic progression**

David Kachaner, Josina Filipe, Emmanuel Laplantine, Angela Bauch,

Keiryn L. Bennett, Giulio Superti-Furga, Alain Israël, Robert Weil

Molecular Cell, 24 février 2012

Plk1-Dependent Phosphorylation of Optineurin Provides a Negative Feedback Mechanism for Mitotic Progression

David Kachaner,^{1,2} Josina Filipe,¹ Emmanuel Laplantine,¹ Angela Bauch,³ Keiryn L. Bennett,³ Giulio Superti-Furga,³ Alain Israël,¹ and Robert Weil^{1,*}

¹Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire, Institut Pasteur, CNRS URA 2582, 75724 Paris Cedex 15, France

²Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, 75015 Paris, France

³Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, 1090 Vienna, Austria

*Correspondence: rweil@pasteur.fr

DOI 10.1016/j.molcel.2011.12.030

SUMMARY

Plk1 activation is required for progression through mitotic entry to cytokinesis. Here we show that at mitotic entry, Plk1 phosphorylates Optineurin (Optn) at serine 177 and that this dissociates Optn from the Golgi-localized GTPase Rab8, inducing its translocation into the nucleus. Mass spectrometry analysis revealed that Optn is associated with a myosin phosphatase complex (MP), which antagonizes the mitotic function of Plk1. Our data also indicate that Optn functionally connects this complex to Plk1 by promoting phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1). Accordingly, silencing Optn expression increases Plk1 activity and induces abscission failure and multinucleation, which were rescued upon expression of wild-type (WT) Optn, but not a phospho-deficient mutant (S177A) that cannot translocate into the nucleus during mitosis. Overall, these results highlight an important role of Optn in the spatial and temporal coordination of Plk1 activity.

INTRODUCTION

The ability of cells to divide is essentially attributed to cyclin-dependent kinases (Cdks) and their substrates (Satyanarayana and Kaldis, 2009). In addition to Cdk1, other mitotic kinases such as polo-like kinases, orthologs of fly Aurora, or NIMA-related kinases play essential roles in mitotic checkpoints, mitotic exit, and cytokinesis (Salaun et al., 2008). Polo-like kinases belong to a conserved subfamily of serine/threonine protein kinases that play pivotal roles in the cell-cycle progression (Archambault and Glover, 2009). Plk1 contributes to several critical events of cell division including G2/M transition, centrosome maturation, bipolar spindle formation, chromosome segregation, activation of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), and exit from mitosis with the initiation of cytokinesis (Archambault and Glover, 2009). All these Plk1 activ-

ities are linked to its subcellular localization. In prometaphase and metaphase, Plk1 is targeted to the centromeric and kinetochore regions of chromosomes, where it might be involved for the stable attachment of kinetochores to microtubules (Archambault and Glover, 2009). At the metaphase-anaphase transition, Plk1 relocalized to the spindle midzone, where it acts as a key regulator of cytokinesis. Defects in cytokinesis frequently cause formation of binucleate or polyploid cells (Glotzer, 2005). Consistent with these roles, downregulation of Plk1 activity results in mitotic arrest and cell death in mammalian cells (Liu and Erikson, 2003; Sumara et al., 2004). Plk1 is composed of an amino-terminal catalytic domain and a carboxyl terminus polo box domain (PBD) that acts as a phosphopeptide-binding domain and targets Plk1 to its subcellular locations by binding proteins that have been previously phosphorylated by “priming” kinases such as Cdk1 (Elia et al., 2003). The activity of Plk1 is also temporally regulated: Plk1 expression increases through interphase progression and peaks during the G2 phase in correlation with its kinase activity that reaches its maximum at the G2/M transition. This temporal control is achieved by transcriptional regulation, phosphorylation, and proteolysis. Plk1 is activated at mitotic entry by phosphorylation in the T loop on threonine 210 by the synergistic action of Bora and the kinase Aurora A (Macurek et al., 2008; Seki et al., 2008). In contrast, the myosin phosphatase complex MYPT1/PP1 β counteracts the phosphorylation of Plk1 on Thr210 (Yamashiro et al., 2008).

Optineurin (“optic neuropathy inducing,” Optn) is a multifunctional protein linked to different human pathologies. Mutations within the *Optn* gene have been associated with familial forms of primary open-angle glaucoma and amyotrophic lateral sclerosis, and genetic variants of *Optn* are also a genetic risk factor for Paget’s disease (Albagha et al., 2010; Chung et al., 2010; Maruyama et al., 2010; Rezaie et al., 2002). In this report, we observed that phosphorylation of Optn on Ser177 by Plk1 impairs its association with the small GTPase Rab8 and induces its translocation into the nucleus during mitosis. To identify interacting proteins that could potentially account for the role of Optn during mitosis, a biochemical/proteomic approach was performed. The Plk1 inhibitory phosphatase complex MYPT1-PP1 β was identified. Phosphorylation of MYPT1 by Cdk1 is required for interaction with Plk1 PBD, thereby allowing dephosphorylation of Plk1 by PP1 β (Yamashiro et al., 2008). Importantly,

we observed that Optn functionally connects MYPT1 and PP1 β to Plk1 during mitosis by promoting phosphorylation of MYPT1. Accordingly, Optn depletion increases Plk1 phosphorylation (at Thr210) and kinase activity, resulting in multinucleation and cytokinetic defects. These phenotypes were rescued upon expression of siRNA-insensitive Optn WT, but not when we expressed the phospho-deficient mutant S177A that cannot translocate into the nucleus during mitosis. In addition, we found that silencing Optn could rescue Plk1 mitotic effects, such as recruitment of γ -tubulin to the mitotic centrosomes, that were impaired by the partial knockdown of Plk1.

Overall, these results highlight the role of Optn in the regulation of Plk1 during mitosis, and further reveal a feedback mechanism by which Plk1 modulates Optn localization in order to regulate its own activity.

RESULTS

Optn Is Phosphorylated by Plk1 during Mitosis

We first observed that Optn immunoprecipitated from HeLa cells arrested in prometaphase by Nocodazole treatment underwent a shift to a higher apparent molecular weight, as indicated by SDS-PAGE (Figure 1A). This slow migrating form of Optn disappeared following λ phosphatase treatment, indicating that this shift was phosphorylation dependent (compare lane 8 to lanes 2, 4, and 6). Based on these findings, we sought to identify mitosis-specific phosphorylation sites on Optn. Analysis of the Optn protein sequence revealed a sequence surrounding Ser177 that matches the consensus phosphorylation sequence for Plk1, D/E-X-S/T- ϕ -X-D/E (X, any amino acid; ϕ , a hydrophobic amino acid) (Nakajima et al., 2003) and that is conserved among known Optn homologs (Figure 1B). To determine whether Plk1 could phosphorylate Optn on Ser177, we performed *in vitro* kinase assays using GST-Optn as substrate and constitutively active human full-length Plk1 as source of kinase activity (Figure 1C). We observed that active Plk1 could phosphorylate Optn WT, but not a mutant form of Optn in which the putative acceptor serine residue was replaced by alanine (S177A) or when BI 2536, a selective Plk1 inhibitor, was added to the kinase reaction. Consistently, a shift in Optn migration was observed in HeLa cells expressing Plk1 WT, but not a kinase-dead form of Plk1 (Plk1 K82M) (Figure 1D, compare lane 2 to lane 3) and was prevented when Optn was mutated at Ser177 (S177A; lane 5) or at Phe178 (F178R; see Figure S1A available online). To further investigate the phosphorylation of Optn at Ser177, we generated a phospho-specific antibody (pS177) against the peptide epitope surrounding Ser177. This antibody detected Optn WT, but not S177A, when coexpressed with Plk1 (Figure 1D, compare lane 2 to lane 5). The pS177 antibody also detected endogenously phosphorylated Optn in HeLa cells arrested in mitosis with Nocodazole (Figure 1E, lane 3) or Taxol (data not shown), but not in cells depleted for Plk1 by siRNA or treated with BI 2536 (lanes 4 and 5). Next, we used this phosphospecific antibody to identify the kinetics of Optn phosphorylation on Ser177 in HeLa cells that were synchronized at the G1/S boundary by a double thymidine block and release (Figure 1F). Expression of Plk1 increased 4 hr after the release, while phosphorylation of both Optn on Ser177 (pS177) and Plk1

on Thr210 (pT210) was detected later in the G2 phase (6 hr after release), peaked at the onset of cyclin B degradation (8–10 hr), and decreased dramatically at the end of mitosis (12 hr). The timing of Optn phosphorylation also paralleled that of Plk1 phosphorylation when HeLa cells were released from a Cdk1 inhibitor RO-3306 that synchronizes the cells in late G2 (Vassilev et al., 2006) (Figure S1B). Altogether, these data demonstrate that Plk1 phosphorylates Optn during mitosis.

Optn Phosphorylation Induces Its Translocation into the Nucleus by Preventing Its Interaction with the Golgi-Resident Protein Rab8

We and others have previously observed that Optn predominantly localizes to the Golgi apparatus in unsynchronized cells (De Marco et al., 2006; Rezaie et al., 2002; Schwamborn et al., 2000; and Figure S2A) and that the aa 131–297 region of Optn is necessary (Figure S2B) and sufficient (Figure S2C) to promote Golgi localization. Since this region encompasses the Plk1 phosphorylation site, we hypothesized that this phosphorylation could affect the subcellular localization of Optn. Accordingly, we observed that Optn no longer localized to the Golgi region and was mainly found in the nucleus (68%, $n = 50$) when coexpressed with Plk1 WT, but not with the K82M mutant (8%, $n = 50$) (Figure 2A). Similar experiments performed with the phospho-deficient mutant Optn S177A showed that this mutated form remained perinuclear when Plk1 was coexpressed (4% nuclear localization, $n = 50$). In contrast, 48% ($n = 50$) of the phosphomimetic mutant, Optn S177D, displayed a nuclear localization independently of Plk1 expression, suggesting that Ser177 phosphorylation could be responsible for Optn nuclear relocalization. To further investigate the intracellular distribution of Optn, HeLa cells were synchronized at the G2/M phase (Figure 2B) and then fractionated into a cytoplasmic (C), a membrane (M), and a nuclear (N) fraction. In asynchronous cells, Optn was mainly found in the cytosolic fraction, while it accumulated in the nucleus with its phosphorylated form in G2/M synchronized cells. No crosscontaminations were found in the different cell fractions when analyzed for the presence of the cytosolic NEMO protein and the nuclear RPB1 protein. Consistent with these data, immunofluorescence experiments confirmed that Optn and its phosphorylated product were exclusively found in the nucleus of cells synchronized at the G2/M border (Figure 2C and Figure S2E) and paralleled Aurora B localization, indicating that the nuclear accumulation of Optn occurs at the end of the G2 phase (Delaval et al., 2004). The specificity of the pS177 antibody was confirmed by the absence of staining in Optn stably depleted cells (Figure S2F). As expected, Optn remained mainly cytoplasmic (perinuclear localization in 86% of cells, $n = 50$) when the arrested mitotic cells were further treated with the selective Plk1 inhibitor BI 2536, while this treatment had no effect on Plk1 localization (Figure 2C, right panel). Similar results were obtained when assessing the localization of stably transfected GFP-tagged Optn after synchronization in mitosis (Figure S2G).

The aa 141–209 region of Optn, which encompasses the S177 phosphorylation site, has been previously shown to mediate the association of Optn with the GTP-bound form of Rab8 (Rab8 Q67L) (Hattula and Peranen, 2000), suggesting

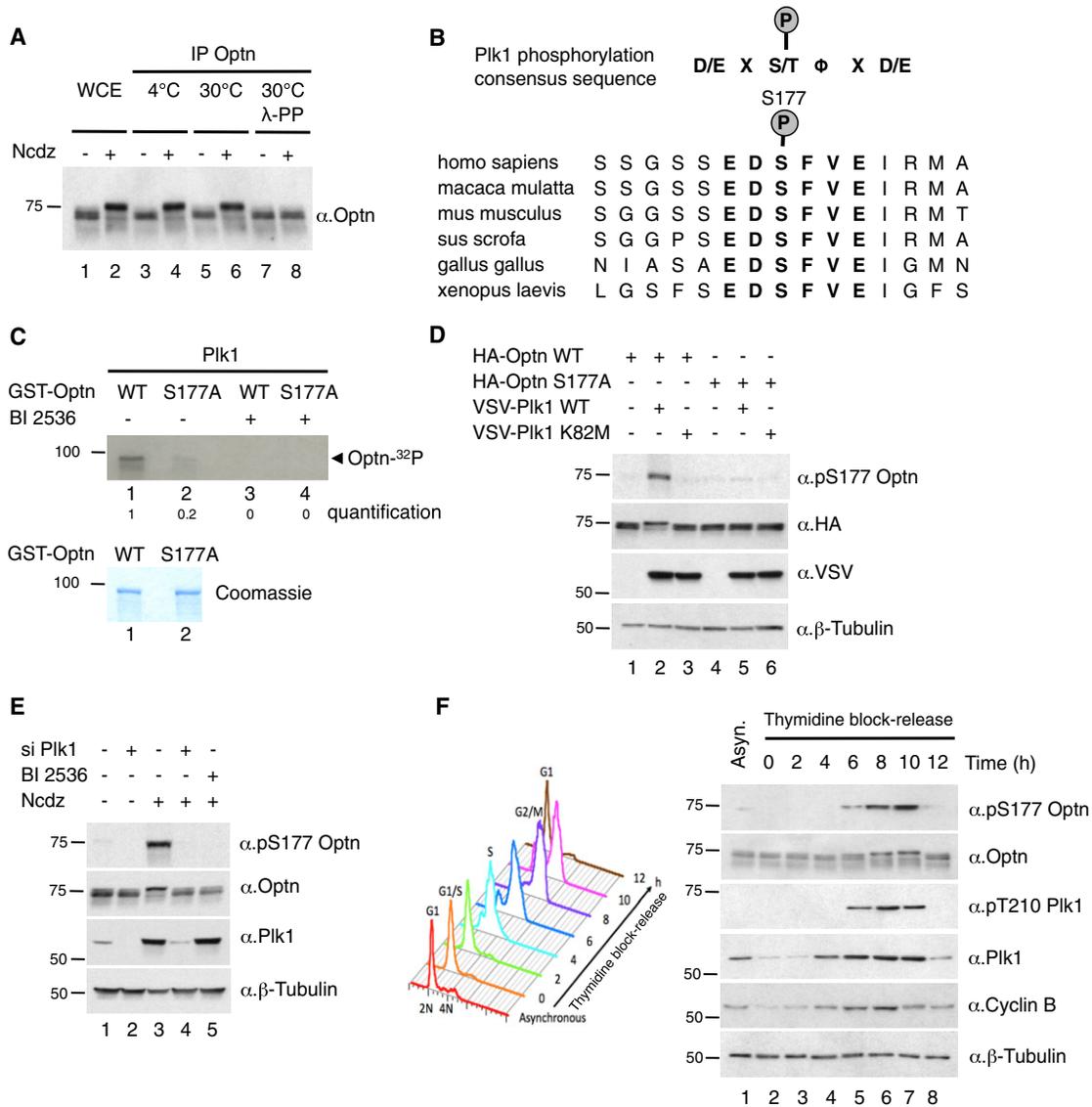


Figure 1. Optn Is Phosphorylated on Serine 177 by Plk1 during Mitosis

(A) Whole-cell extracts (WCE) or Optineurin immunoprecipitates (IP Optn) from asynchronous or mitotic cells (treated with Nocodazole, Ncdz) were incubated at the indicated temperature with or without λ-phosphatase (λ-PP). Optn is detected by western blotting with an anti-Optn antibody.

(B) Alignment of Optn protein sequences from different species reveals a conserved serine residue within a consensus motif for phosphorylation by Plk1.

(C) In vitro kinase assays were performed in the presence of recombinant constitutively active Plk1 and GST-Optn, either wild-type (WT) or mutated on Ser177 (S177A). BI 2536 was added as indicated. Kinase reactions were analyzed by autoradiography, and phosphorylation levels of GST-Optn were quantified relative to lane 1.

(D) HeLa cells were transfected with the indicated plasmids (Plk1 K82M is a kinase-dead form of Plk1), lysed, and protein extracts were analyzed by western blot using the indicated antibodies.

(E) HeLa cells were transiently depleted for Plk1 using siRNA, treated with Nocodazole and BI 2536 as indicated, lysed, and protein extracts were analyzed by western blot using the indicated antibodies.

(F) HeLa cells were arrested at the G1/S boundary with a double thymidine block and then released into fresh medium. Cells were collected every 2 hr and stained with propidium iodide. The cell-cycle profile was determined by flow cytometry (left panel), and the indicated proteins were assayed by western blotting (right panel). "Asyn." indicates asynchronous cells; 2N and 4N represent DNA content.

that the Plk1-dependent phosphorylation of Optn could modulate this interaction. Indeed, coimmunoprecipitation experiments performed in HeLa cells indicated that Optn phosphorylation by Plk1 disrupted its binding with Rab8 Q67L, while the kinase-dead mutant of Plk1 did not affect this interaction

(Figure 3A, lanes 5–7). Consistently, we found that Optn S177A interacted with Rab8 Q67L and that this interaction was not abolished upon Plk1 expression, whereas the interaction of Optn S177D with Rab8 Q67L was strongly decreased independently of Plk1 expression (Figure 3A, lanes 8–11). The

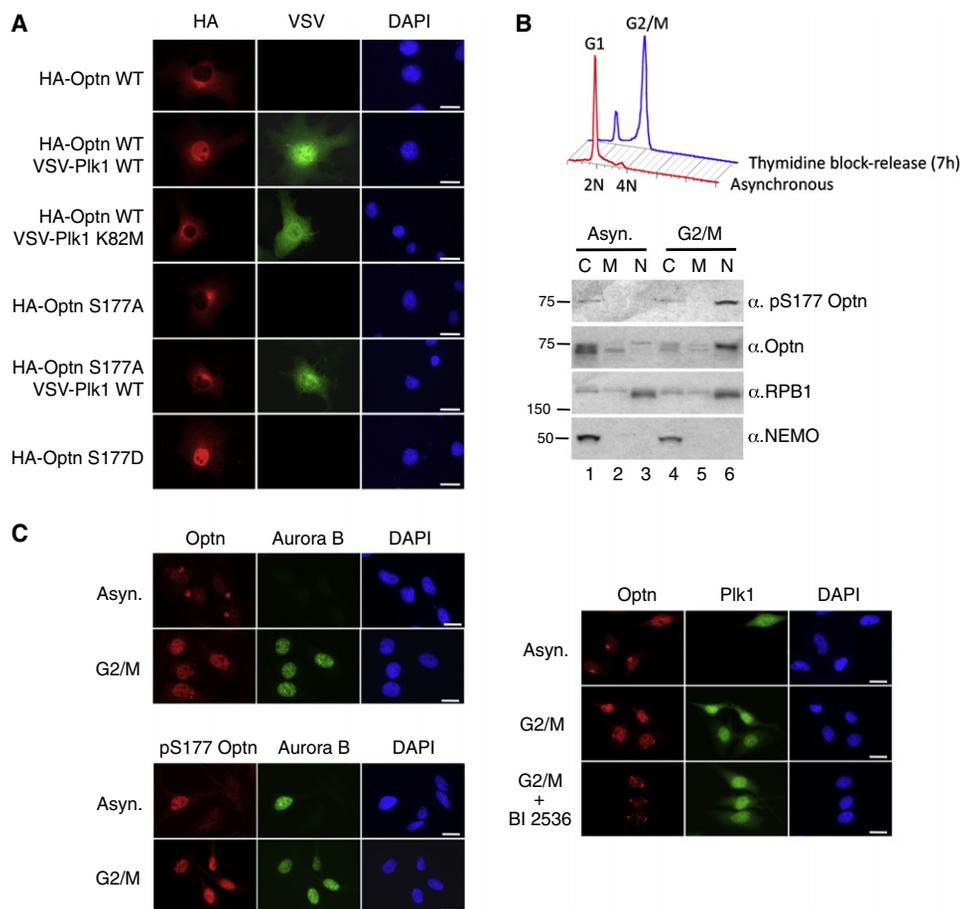


Figure 2. Optn Translocates into the Nucleus during Mitosis upon Phosphorylation by Plk1

(A) COS-7 cells were transfected with the indicated plasmids and stained for HA (red), VSV (green), and DNA (blue). Scale bar, 10 μ M.

(B) HeLa cells were arrested at the G1/S boundary with a double thymidine treatment and then released for 7 hr. The cell-cycle profile was determined by flow cytometry (top panel). HeLa cells were fractionated into cytoplasmic (C), membrane (M), and nuclear (N) fractions (bottom panel). Western blots were performed using the indicated antibodies.

(C) HeLa cells were synchronized in G2/M by a double thymidine block followed by a release for 7 hr; treated with BI 2536 as indicated; and stained for Optn or pS177 Optn (red), Aurora B or Plk1 (green), and DNA (blue). In asynchronous cells, the nuclear localization of Optn and its phosphorylated product is only detected in mitotic cells which are also positive for the presence of Aurora B (left panel) or Plk1 (right panel). Scale bar, 10 μ M.

same results were also obtained in HEK293T cells (Figure S3). Next, the localization of phospho-deficient and phosphomimetic mutants of Optn was compared to the localization of Rab8 Q67L in the presence or absence of Plk1. Optn WT and Optn S177A alone were diffusely perinuclear (see Figure 2A), while both Optn forms colocalized in tight perinuclear spots when coexpressed with Rab8 Q67L (70% of colocalization, $n = 30$), but not with GDP-bound form Rab8 T22N (Figure 3B and Figure S2D). In contrast, Rab8 Q67L expression did not affect the localization of Optn S177D. As expected, Plk1 WT, but not the kinase-dead form, impaired the colocalization of Optn and Rab8 Q67L and induced the nuclear localization of Optn (73%, $n = 30$) (Figure 3B). However, Plk1 was unable to disrupt the colocalization of Optn S177A and Rab8 Q67L. These results suggest that upon phosphorylation by Plk1, Optn dissociates from Rab8 and consequently translocates into the nucleus.

Identification of Putative Optn-Interacting Partners by Mass Spectrometry-Based Proteomics

To identify partners of Optn that could account for a mitotic function of Optn, we generated stable HEK293 cell lines that express a GS-TAP-tagged version of Optn and purified the Optn complex by tandem affinity purification (Burckstummer et al., 2006). Mass spectrometry analysis presented in Figure 4A identified Optn and the already described Optn interactor myosin VI (Sahlender et al., 2005). Interestingly, among the putative interactors of Optn listed in Table S1, the two main subunits of the myosin phosphatase holoenzyme (MP) were identified. MP is composed of the type 1 protein phosphatase catalytic subunit (PP1c β) and the myosin phosphatase targeting subunit (MYPT1). Two known interactors of MYPT1, myosin phosphatase Rho-interacting protein (M-RIP) and prostate apoptosis response 4 protein (PAR4) (Vetterkind et al., 2010), were also identified in our proteomic approach. MP was recently shown to regulate mitotic

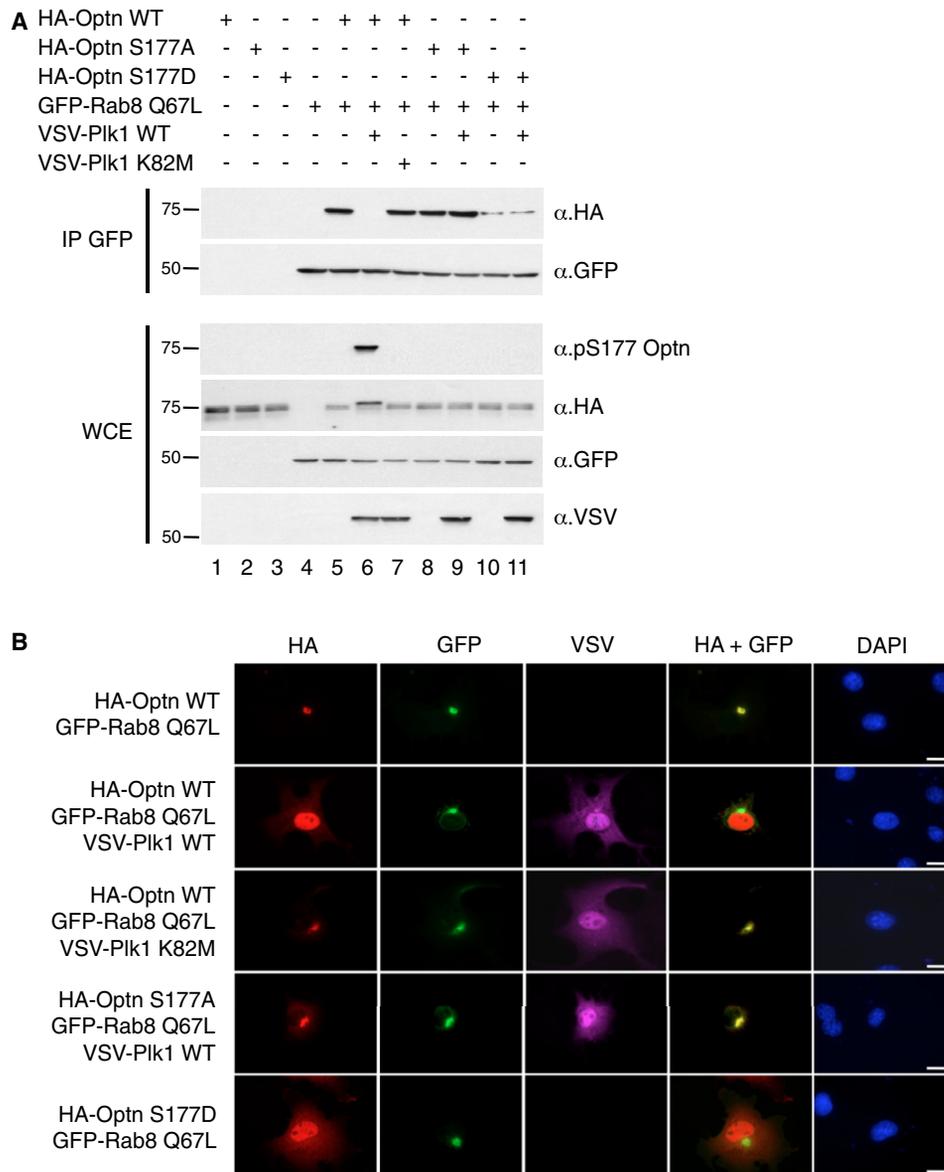


Figure 3. Phosphorylation of Optn by Plk1 Prevents Its Association with Rab8 and Induces Its Nuclear Translocation

(A) HeLa cells were transfected with the indicated plasmids, and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-GFP antibodies and immunoblotted with the indicated antibodies.

(B) HA-Optn WT and mutants (red) were transiently coexpressed in COS-7 cells with GFP-Rab8 Q67L (green), either alone or with Plk1 WT or K82M (magenta), and analyzed by immunofluorescence. DNA is stained with DAPI (blue), and colocalization between HA and GFP is shown in yellow. Scale bar, 10 μ M.

progression by antagonizing Plk1-essential functions during mitosis (Yamashiro et al., 2008). We therefore focused our attention on this phosphatase complex, since this interaction may uncover a mitotic function for Optn.

Validation of the Interaction between Optn and the Myosin Phosphatase Complex

To validate the interaction of Optn with MYPT1 and PP1 β , we performed coimmunoprecipitation experiments in HEK293T cells (Figure 4B). Both MYPT1 and Optn were detected in PP1 β immunoprecipitates when the three proteins were coex-

pressed, but not when MYPT1 was not expressed (Figure 4B, lanes 4 and 5). As shown in Figure 4C, endogenous MYPT1 and PP1 β were detected in the anti-Optn immunoprecipitates (lane 1). As expected, these detections decreased when Optn expression was silenced by siRNA (lane 4), and the interaction between Optn and PP1 β was reduced when MYPT1 was depleted by siRNA (lane 3), indicating that association of Optn with the MP complex was most likely mediated by MYPT1. The reverse experiments (i.e., immunoprecipitation of PP1 β) confirmed that the interaction between PP1 β and Optn was dependent on MYPT1 expression (Figure 4C, compare lanes 5,

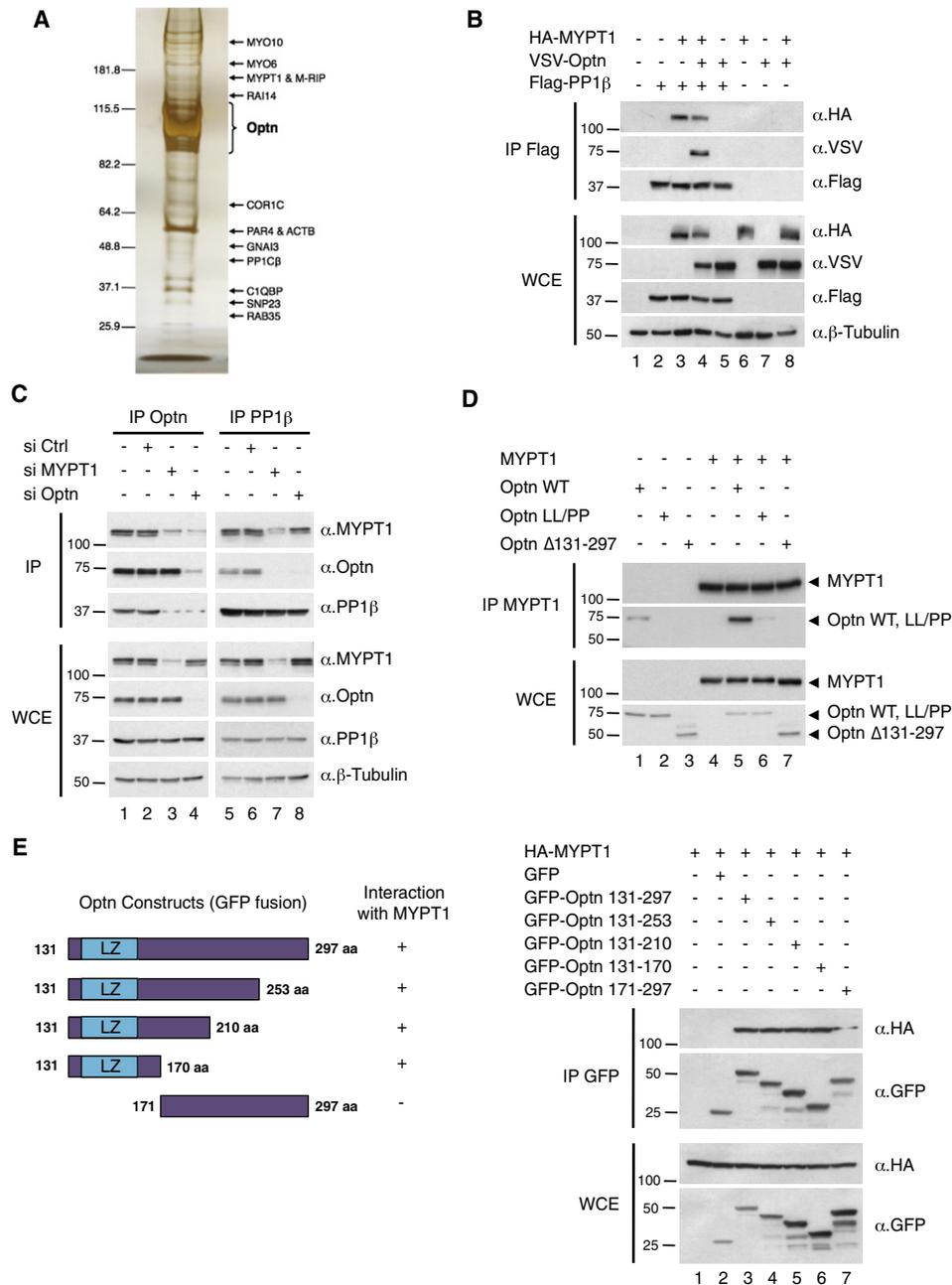


Figure 4. Optineurin Interacts with MYPT1 and PP1β

(A) Protein complexes associated with GS-TAP-tagged Optn were isolated by tandem affinity purification, separated by SDS-PAGE, and visualized by silver staining. Protein complex composition was analyzed by LC-MS/MS. The position of several complex components is depicted next to the region where it was identified.

(B) HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids. Total lysates were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody and immunoblotted with the indicated antibodies.

(C) HeLa cells were transfected with either an irrelevant siRNA (Ctrl) or Optn- or MYPT1-directed siRNA. Total lysates were immunoprecipitated with anti-Optn or anti-PP1β antibodies. Western blot analyses were performed using the indicated antibodies.

(D) HeLa cells were transfected with HA-MYPT1 and either HA-Optn WT, HA-Optn Δ131–297 (deletion aa 131–297), or HA-Optn LL/PP (substitution of leucine 150 and 157 by proline residues). Lysates were immunoprecipitated with an anti-MYPT1 antibody, and western blot analyses were performed using anti-HA antibody.

(E) The putative leucine zipper of Optn is sufficient for the interaction with MYPT1. (Left panel) Schematic representation of Optn constructs and their ability to interact with MYPT1. (Right panel) Optn fragments fused to GFP and HA-MYPT1 were transiently coexpressed in HeLa cells. Lysates were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody, and western blot analyses were performed with anti-HA and anti-GFP antibodies.

6, and 7). The same results were obtained in HEK293T cells (Figure S4). Further experiments indicated that immunoprecipitation of endogenous and exogenous MYPT1 led to the recovery of Optn, but not of Optn Δ 131–297, suggesting that MYPT1 binds the 131–297 region of Optn (Figure 4D, lanes 1, 5, and 7). MYPT1 contains a C-terminal leucine zipper motif (LZ), which is responsible for LZ-LZ-mediated interaction with other partners such as PAR4 (Vetterkind et al., 2010). As the MYPT1-interacting region of Optn encompasses a putative LZ motif, we speculated that binding of these two proteins could be mediated by a LZ-LZ interaction. Indeed, replacement of two leucine residues (L150P, L157P) was sufficient to severely reduce the interaction between Optn and MYPT1 (Figure 4D, lane 6). Coimmunoprecipitation experiments performed with GFP-tagged constructs containing N- and C-terminal deletions of the 131–297 region of Optn indicated that the 131–170 region of Optn containing the putative LZ was sufficient for the interaction with MYPT1 (Figure 4E).

Optn Is Involved in the Negative Regulation of Plk1

The ability of MYPT1 to antagonize Plk1 function (Yamashiro et al., 2008) raised the possibility that Optn could participate in the regulation of Plk1 activity through its association with MYPT1. To test this hypothesis, we performed RNA interference experiments in HeLa cells that were arrested in mitosis upon treatment with Nocodazole (Figure 5A). As expected, both Plk1 expression and phosphorylation on Thr210 were increased in Nocodazole-arrested cells compared to unsynchronized cells (Figure 5A, lanes 1 and 2), and knockdown of MYPT1 expression resulted in a 2.8-fold enhancement of this phosphorylation (lane 4). Interestingly, a similar increase of Plk1 phosphorylation was observed in Optn-depleted cells (lane 5), which was reversed following expression of increasing amounts of an RNAi-insensitive Optn construct, but not of the empty vector alone (Figure 5A, compare lanes 6–8 to 9–11), suggesting that Optn is involved in the regulation of Plk1 phosphorylation. Consistently, Plk1 immunoprecipitated from MYPT1- and Optn-depleted mitotic cells showed a similar increase in kinase activity (>2-fold) (Figure 5B, compare lanes 4 and 5 to 2 and 3; and Figure S5A), as evidenced by Plk1 autophosphorylation or phosphorylation of Cdc25C phosphatase, a known substrate of Plk1 (Archambault and Glover, 2009). As expected, Plk1 kinase activity was abrogated when Plk1 was immunoprecipitated from cells treated with BI 2536 (Figure 5B, lane 6). These results demonstrate that, like MYPT1, Optn is involved in the negative regulation of Plk1 during mitosis.

To determine the kinetics of Plk1 Thr210 phosphorylation during the G2/M phase in the absence of Optn, HeLa cells stably depleted for Optn were synchronized with a double thymidine block protocol and released during 12 hr (Figure 5C). In these cells, Plk1 phosphorylation levels were increased ~2.4-fold from 6 to 10 hr postrelease compared to control cells. We next performed immunofluorescence microscopy using double labeling with anti-Plk1 and anti-pT210 antibodies to determine the stage of mitosis at which Plk1 phosphorylation was increased in Optn-depleted cells. We observed that Optn depletion enhanced Plk1 Thr210 phosphorylation at all the mitotic phases from prophase to cytokinesis, in coherence with the kinetic of Plk1 phosphorylation (Figure 5D). Quantitative analysis revealed that the mean ratio of pT210/Plk1 fluorescent intensity

in Optn-depleted cells was increased from 1.5 to 1.8 compared to control cells (Figure S5B).

Optn Is Essential for MYPT1 Phosphorylation during Mitosis

To establish the function of Optn in MYPT1-mediated regulation of Plk1 activity, we evaluated whether Optn was connected to the previously described mitotic complex between MYPT1 and Plk1 (Yamashiro et al., 2008). We observed that Optn was recruited to this complex through its interaction with MYPT1 (Figure S6A). More interestingly, we observed that silencing Optn in HeLa or HEK293T cells impaired the interaction between endogenous Plk1 and MYPT1 during mitosis (Figure 6A and Figure S6B). Since it has been previously shown that Cdk1 creates the docking site on MYPT1 for Plk1 (Yamashiro et al., 2008), this observation suggested that Optn could be involved in Cdk1-mediated MYPT1 phosphorylation. In order to assess this hypothesis, we generated stably transfected HeLa cell lines under limiting dilution conditions in which endogenous Optn was depleted by short hairpin RNA. The two clones isolated exhibited almost undetectable levels of Optn expression (Figure S6C). We also stably restored Optn expression in the clones by transducing Optn-depleted cells with a retroviral vector encoding shRNA-insensitive Optn or the empty retroviral plasmid as negative control. In agreement with our hypothesis, MYPT1 phosphorylation at Ser473, the Cdk1 preferential site (Yamashiro et al., 2008), was almost abolished in mitotic HeLa cells depleted for Optn compared to parental HeLa cells (Figure 6B, compare lane 8 to lanes 9 and 10). Phosphorylation was restored in depleted cells stably reexpressing Optn, but not in those transduced with the empty vector (Figure 6B, lanes 11–14). As expected, levels of Plk1 phosphorylation at Thr210 and activity (measured by *in vitro* kinase assay) were inversely correlated to MYPT1 phosphorylation levels at Ser473 (Figure 6B). In addition, Optn was constitutively associated with Cdk1, and this interaction was not modified upon Nocodazole treatment (Figure S6D). However, Optn does not seem to act as a general activator of Cdk1, but rather acts by bringing MYPT1 and Cdk1 in close proximity, since *in vitro* kinase assays revealed that Cdk1 could phosphorylate MYPT1 independently of Optn expression (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that Optn stimulates Cdk1-induced MYPT1 phosphorylation, leading to Plk1 inactivation during mitosis.

Role of Serine 177 Phosphorylation in the Regulation of Plk1 Activity during Mitosis and in Mitotic Progression

We monitored Plk1 and MYPT1 phosphorylation in HeLa cells depleted for Optn and reconstituted with shRNA-insensitive mutants (Figure 6C). We found that ectopic expression of Optn WT and S177D mutant could rescue the mitotic phosphorylation of MYPT1 and the regulation of Plk1 phosphorylation, in contrast to Optn S177A (Figure 6C, lanes 10–12). In agreement with these results, the interaction between MYPT1 and Plk1 (which is dependent on MYPT1 phosphorylation) was also reduced in HeLa cells expressing Optn S177A (Figure S6E). As predicted by results obtained by Plk1 overexpression (Figure 2A), this mutant was unable to translocate into the nucleus of G2/M synchronized cells, while Optn S177D was constitutively

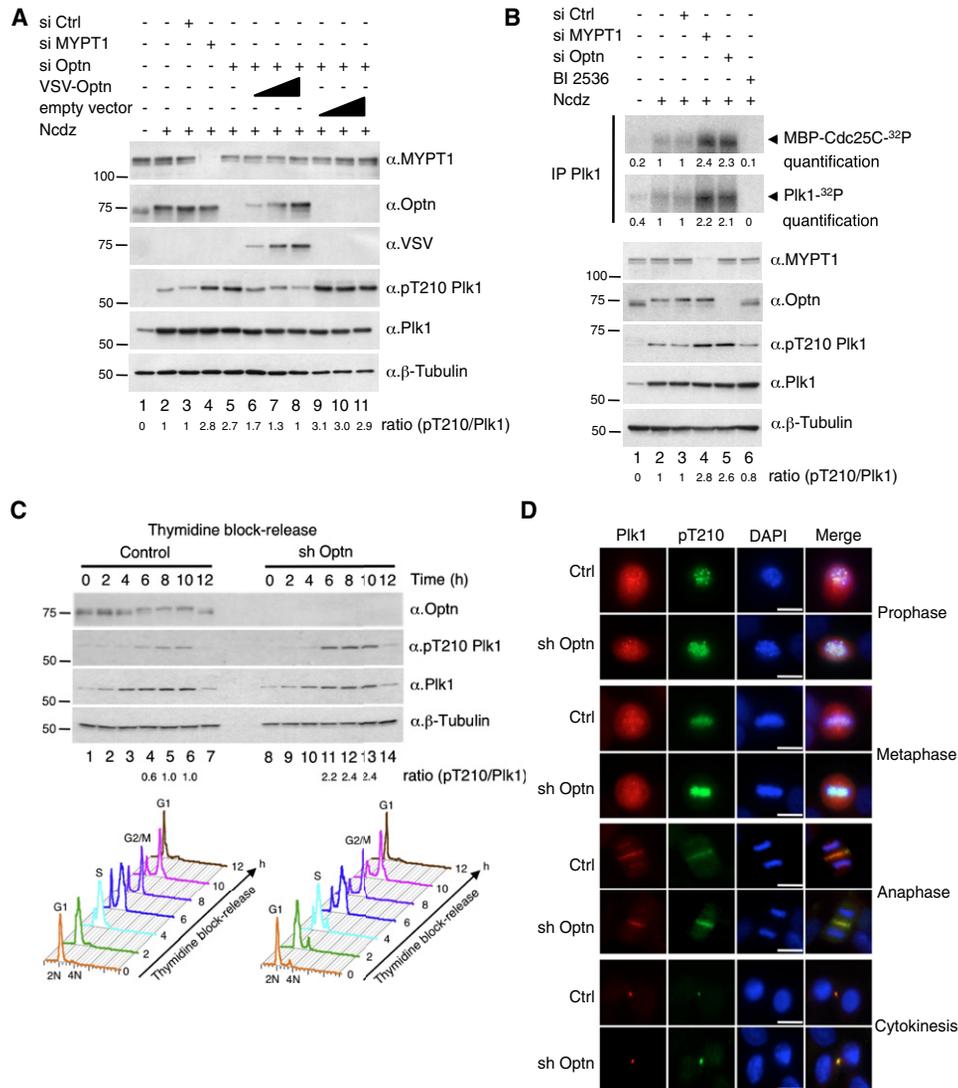


Figure 5. Optn Regulates Plk1 Phosphorylation and Activity during Mitosis

(A) HeLa cells transfected with the indicated plasmids and siRNAs were treated with Nocodazole as indicated. The fold induction of Plk1 phosphorylation is calculated as a ratio between pT210 and Plk1 signals measured with the Quantity One software.

(B) HeLa cells were transiently transfected with the indicated siRNA and treated with Nocodazole and BI 2536 as indicated. Plk1 was immunoprecipitated and incubated in kinase reaction buffer in the presence of ³²P-γ-ATP and recombinant MBP-Cdc25C. Phosphorylation of Plk1 and MBP-Cdc25C was analyzed and quantified by autoradiography relative to signal obtained in Ncdz-treated cells (lane 3). Western blots of whole-cell lysates were performed using the indicated antibodies, and Plk1 phosphorylation was quantified as in (A).

(C) HeLa cell clones stably depleted for Optn (sh Optn) or stably transfected with the empty vector (Control) were synchronized at the G1/S boundary by a double thymidine block and released into fresh medium, and the experiment was performed as in Figure 1F.

(D) Immunofluorescence experiments show the locations of Plk1 (red) during mitosis and the intensity of Plk1 phosphorylation (pT210, green). DNA is stained with DAPI (blue), and colocalization of Plk1 with pT210 is shown in yellow. Scale bar, 10 μM.

localized in the nucleus in 65% of the cells (n = 50) (Figure 6D). In contrast to Optn S177A, the mutation of the ubiquitin-binding domain of Optn (D474N) and the main mutation associated with primary open-angle glaucoma (E50K) did not interfere with the ability to rescue the defect of Plk1 regulation caused by depletion of Optn (Figure 6C, lanes 13 and 14). Altogether, these results demonstrate that the translocation of Optn into the nucleus promotes the phosphorylation of MYPT1 and its interac-

tion with Plk1, which then enables the inactivation of Plk1. Interestingly, two or more nuclei were observed by immunofluorescence microscopy in more than 10% of Optn-depleted HeLa cells, in contrast to control HeLa cells that only show 2% of multinucleated cells (Figure 7A). We further monitored the number of multinucleated cells in Optn-depleted cells stably reconstituted with Optn mutants. We observed that expression of Optn WT and S177D mutant rescued the multinucleation defect, while

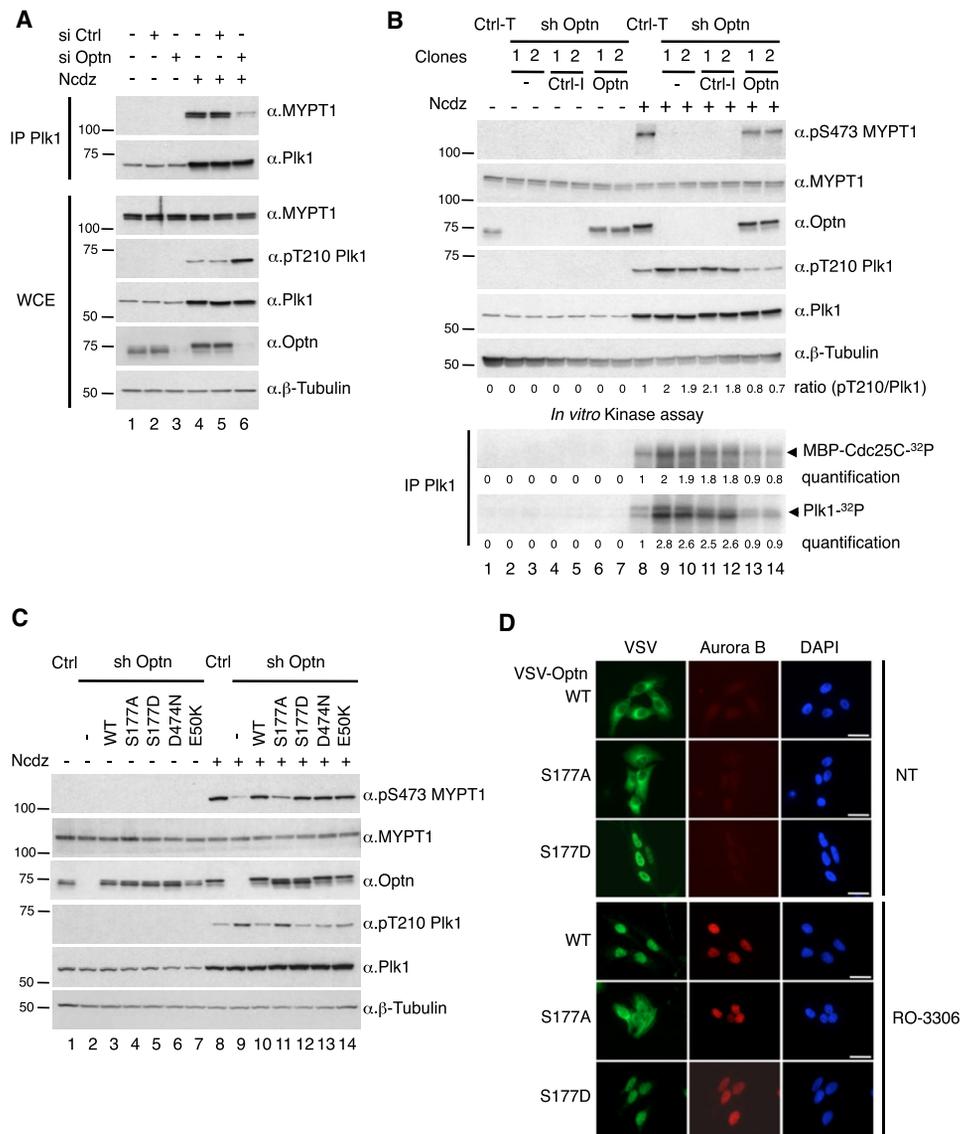


Figure 6. The Translocation of Optn into the Nucleus Promotes the Phosphorylation of MYPT1 in Order to Antagonize Plk1 Activity

(A) HeLa cells were transiently transfected with the indicated siRNAs and treated with Nocodazole as indicated. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Plk1 antibody. Western blots were performed using the indicated antibodies.

(B) HeLa cells were stably transfected with the empty vector (Ctrl-T) or with a plasmid expressing Optn-directed shRNA. Optn-depleted cells (clones 1 and 2) were infected with empty retroviruses (Ctrl-I) or retroviruses expressing shRNA-insensitive Optn and treated with Nocodazole as indicated. Levels of pT210 and Plk1 were analyzed by western blot and quantified as in Figure 5 (top panel). *In vitro* kinase assays were performed and quantified as in Figure 5B (bottom panel).

(C) Optn-depleted HeLa cells reconstituted with shRNA-insensitive Optn mutants were analyzed by western blot using specific antibodies against phosphorylated forms of MYPT1 or Plk1.

(D) Subcellular localization of Ser177 phospho-mutants of Optn (green) was determined in asynchronous (NT) or RO-3306-treated HeLa cells. Aurora B staining (red) in the nucleus indicates cells in late G2 phase. Scale bar, 10 μ M.

S177A did not. These results suggest that the translocation of Optn into the nucleus is required for the regulation of Plk1 activity and consequently for mitotic progression.

Characterization of the Mitotic Defects Induced by Optn Depletion and Overexpression

To characterize these mitotic defects, we performed live-cell imaging of Cherry-histone 2B in HeLa cells stably depleted for

Optn or overexpressing Optn. Control cells underwent the metaphase-anaphase transition between 40 and 60 min after chromosome condensation (Figure 7B and Movie S1). Compared to these cells, 25% of Optn-depleted cells showed a delay (between 60 and 180 min) in the metaphase-anaphase transition and failed to achieve their division, leading eventually to multinucleations (Figure 7B and Movie S2). We also frequently observed that chromosomes did not congress to the metaphase plate and that

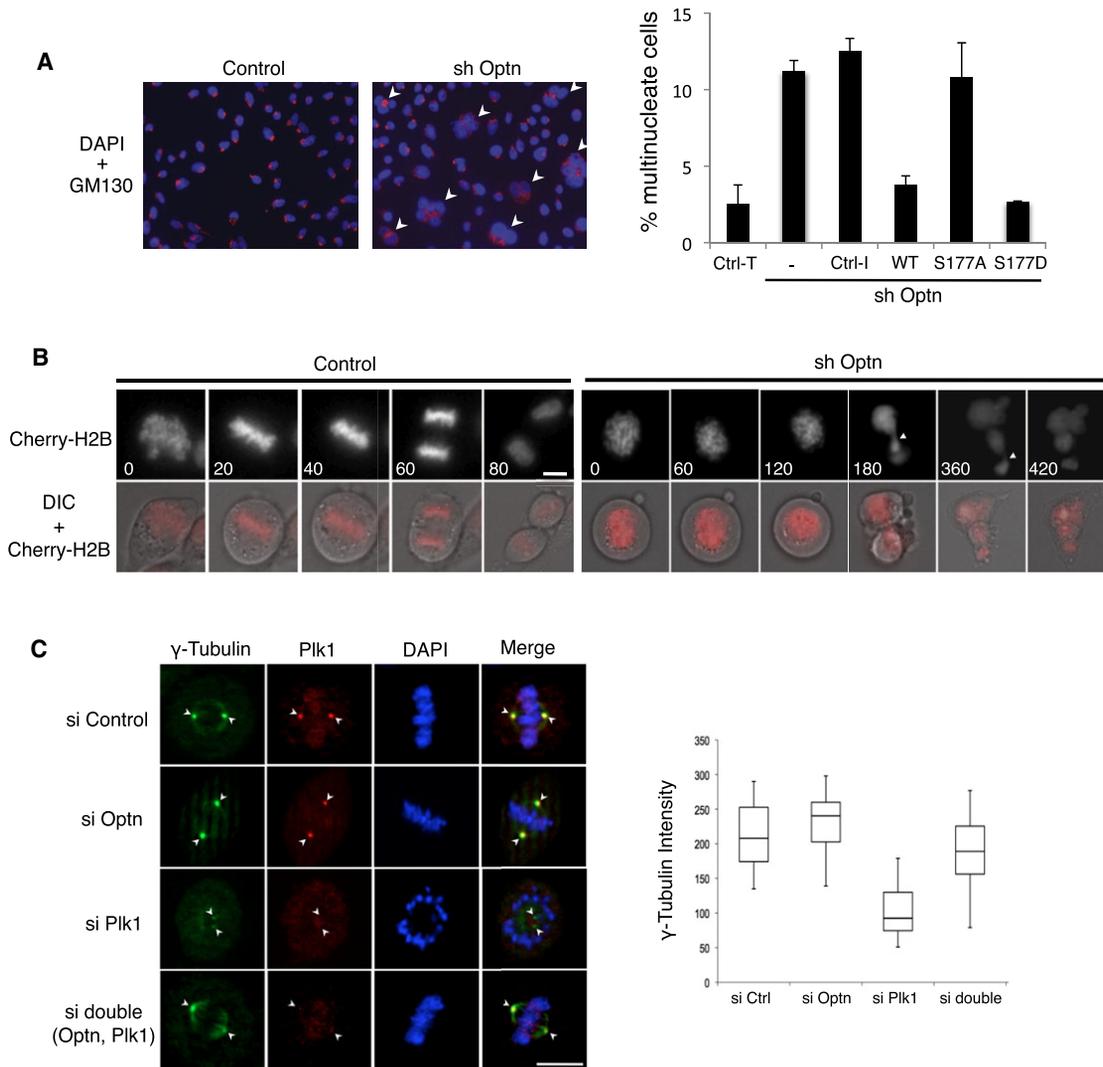


Figure 7. Optn Depletion Induces Mitotic Defects and Antagonizes Plk1 Function

(A) HeLa clones were fixed, DNA was stained with DAPI (blue), the Golgi apparatus was stained with the Golgi marker GM130 (red), and cells were visualized by fluorescence microscopy. Multinucleated cells are indicated by arrowheads (left panel). Percentage of multinucleate cells was counted for each condition ($n = 500$, repeated two times). Ctrl-T, HeLa cells transfected with an empty vector; Ctrl-I, Optn-depleted cells transduced with an empty retroviral vector; WT, S177A, and S177D, Optn-depleted cells reconstituted with shRNA-insensitive WT or mutant Optn (right panel).

(B) Live-cell imaging of control and Optn-depleted HeLa cells. Control and Optn-depleted cells were transiently transfected with a plasmid encoding Cherry-histone 2B and imaged using a Axio Observer Z1 microscope system. Images were taken at 2 min intervals. The Cherry fluorescence and the corresponding differential interference contrast images are shown. DNA bridges are indicated by arrowheads. Scale bar, 10 μm .

(C) Localization of γ -tubulin (green), Plk1 (red), and DNA (blue) in control, Optn-depleted, Plk1-depleted, and double (Optn, Plk1)-depleted HeLa cells (left panel). Arrowheads indicate centrosomes. Scale bar, 5 μm . Box plot of γ -tubulin intensities of centrosomes (right panel). The upper and lower edge of each box represents upper and lower quartiles, respectively. The median is indicated by a horizontal line.

during mitotic exit DNA bridges were visualized, suggesting the presence of chromosomal segregation defects. Interestingly, HeLa cells overexpressing Optn failed to enter into metaphase even after 2 hr observation, resulting in mitotic arrest and cell death for 15% of mitotic cells in correlation with a 2-fold decrease in Plk1 phosphorylation during mitosis (Figures S7A and S7B). Moreover, time-lapse microscopy analysis indicated that, while control HeLa cells progressed through mitosis from prophase to telophase with normal kinetics (Movie S3), 10% of Optn-depleted

cells displayed defects during late cytokinesis, including failure to complete abscission, increased duration of mitosis, and frequent multinucleation due to intercellular bridge instability (Movie S4 and Movie S5). The multinucleated Optn-depleted cells either divided or failed to enter the next cell division and eventually died.

Optn Antagonizes Plk1 Functions

To determine the biological significance of the regulation of Plk1 activity by Optn, we assessed the consequences of Optn

depletion on different mitotic effects of Plk1 such as Cdc25C phosphorylation (which promotes entry in mitosis) and γ -tubulin recruitment to mitotic centrosomes (which contributes to centrosome maturation). Using an anti-Cdc25C antibody, we observed that double depletion of Optn and Plk1 restored Cdc25C phosphorylation, which was impaired upon silencing of Plk1 (Figure S7C). Plk1 inactivation in mammalian cells has been shown to block the recruitment of γ -tubulin at the centrosomes (Petronczki et al., 2008). We therefore analyzed whether double depletion of Optn and Plk1 restores the detection of γ -tubulin at the centrosomes, as it has been shown for the double Plk1 and MYPT1 depletion (Yamashiro et al., 2008). In cells transfected with a control siRNA, γ -tubulin was present at the centrosomes where it colocalized with Plk1, while its accumulation at the centrosomes was greatly reduced in Plk1-depleted cells, confirming previous studies (Petronczki et al., 2008) (Figure 7C and Figure S7D). In contrast, double depletions of Optn and Plk1 as well as MYPT1 and Plk1 restored γ -tubulin accumulation at the centrosomes to a similar level than the control. We did not observe any effect of Optn or MYPT1 single depletion on γ -tubulin staining at the centrosomes. These results further support the conclusion that Optn antagonizes Plk1 functions in mitotic progression.

DISCUSSION

In this study, we provide evidence that Optn plays an important role in the regulation of Plk1 activity during mitosis, a function that has escaped attention so far. The first step of this regulation depends on the phosphorylation of a conserved residue (Ser177) of Optn by Plk1 that promotes detachment of Optn from the Golgi-localized Rab8 small GTPase and its translocation into the nucleus (schematized in Figure S7E). In the second step, nuclear Optn promotes phosphorylation of its interacting partner MYPT1 on the preferential site for Cdk1 (Ser473). This phosphorylation creates a specific binding motif for the PBD of Plk1, thereby allowing PP1 β , the catalytic subunit of the myosin phosphatase complex, to dephosphorylate Plk1 at Thr210 (Yamashiro et al., 2008). Our work highlights the role of Optn in the functional interplay between Cdk1 and MYPT1 to regulate Plk1 activity. The absence of Optn homologs in invertebrates such as *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and the lack of conservation of the MYPT1 phosphorylation site responsible for Plk1 binding in these species (Yamashiro et al., 2008) suggest that this Optn-mediated regulatory mechanism is not conserved in flies and worms.

First, this study details the molecular mechanism of the temporal regulation of Plk1 activity. Similar kinetic patterns of Optn, MYPT1, and Plk1 phosphorylation suggest that all these phosphorylation events transiently occur during a short period of time at the G2/M transition (Figure S1C). Using Optn phospho-deficient mutants, we demonstrated that Optn phosphorylation on Ser177 is required for the induction of MYPT1 phosphorylation and consequently for the regulation of Plk1 phosphorylation.

Second, our work further demonstrates that Optn also orchestrates spatial regulation of Plk1. Indeed, translocation of Optn from the Golgi apparatus into the nucleus triggered by Plk1-mediated

phosphorylation constitutes a prerequisite for the downregulation of Plk1 activity by Optn. Plk1 has already been demonstrated to control the localization of some of its substrates: Plk1 phosphorylates the centrosome-associated protein Cep55 and prevents its recruitment to the central spindle during anaphase, therefore ensuring efficient abscission (Bastos and Barr, 2010). In addition to Optn, other proteins have been shown to dissociate from the Golgi apparatus upon phosphorylation. For example, phosphorylation of the peripheral Golgi protein Nir2 by Cdk1 induces localization of Nir2 to the cleavage furrow and midbody and hence ensures the completion of cytokinesis (Litvak et al., 2004). Strikingly, Optn depletion induces cytokinesis defects, in agreement with other studies suggesting that Plk1 specifically controls the onset of cytokinesis during late mitosis. Plk1 plays a key role in triggering the initiation of cytokinesis in human cells by promoting interaction between the Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ect2 and the RhoGAP HsCyk-4. Formation of this complex is required for the activation of RhoA (the upstream regulator of the contractile ring) at the equatorial cortex during anaphase and for ingression of the cleavage furrow (Brennan et al., 2007; Petronczki et al., 2007; Santamaria et al., 2007). Plk1 is also required for stable localization of a number of other spindle components and cytokinetic regulators. In contrast, Optn does not localize to the midbody during cytokinesis (data not shown), suggesting that it may not have a direct role in cytokinesis. On the other hand, our proteomic analysis identified Optn-interacting proteins, such as dynein, Rab35, and myosin VI, involved in cytokinesis (Arden et al., 2007; Campbell et al., 1998; Karki et al., 1998; Kouranti et al., 2006). Further work is needed to determine whether these proteins are downstream or upstream targets of the Optn/MYPT1/Plk1 pathway.

In the last few years, Optn has been suggested to be involved in a variety of functions (Chalasanani et al., 2009). Interestingly, following identification of three Optn partners by two-hybrid screens (Rab8, myosin VI, and Hungtingtin), a series of publications (Chalasanani et al., 2009) have focused on the role of Optn in Golgi organization, exocytosis, and more general membrane-trafficking events. These studies suggest that Optn recruits Hungtingtin to Rab8, and therefore to the Golgi apparatus, hypothesizing a possible role for Optn in connecting the Golgi apparatus to the microtubule network (Hattula and Peranen, 2000). Optn has also been involved in other pathways including protection against oxidative stress-induced apoptosis, regulation of agonist-stimulated group I metabotropic glutamate receptor (mGluR1) signaling, cyst formation, regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor, antiviral innate immune response, and more recently selective autophagy of *Salmonella enterica* (Chalasanani et al., 2009; Gleason et al., 2011; Mankouri et al., 2010; Nagabhushana et al., 2010; Wild et al., 2011). Despite structural homology with NEMO, the core element of the NF- κ B pathway, and although Optn can modulate NF- κ B activation in some circumstances, we previously demonstrated that Optn is not part of the IKK complex (Journé et al., 2009; Zhu et al., 2007; Schwamborn et al., 2000). The function of NEMO is dependent of a ubiquitin-binding domain (UBD) (Israel, 2006) also present in Optn. Results presented in this study demonstrate that the function of Optn in the regulation of Plk1 activity is independent of its UBD. In contrast, we showed that

the phosphorylation of Optn at Ser177 plays a pivotal role in mitotic progression related to Plk1 activity. Interestingly, it has been shown recently that phosphorylation of the same site by TBK1 is also critical for the clearance of *Salmonella* by autophagy (Wild et al., 2011). Experiments are currently undertaken to determine whether phosphorylation of Ser177 by Plk1 might interfere with the selective autophagy of *Salmonella* during mitosis. It has been reported that Optn translocates from the Golgi to the nucleus in response to H₂O₂ (De Marco et al., 2006). While this latter situation parallels what occurs during mitosis, the mechanism leading to Optn nuclear transport stimulated by H₂O₂ is unlikely to be related to Plk1 activation or to Ser177 phosphorylation (data not shown). The mechanism underlying the nuclear transport of Optn is still unclear, since it lacks obvious nuclear localization sequences.

Optn has been linked to different pathologies, since mutations in the *Optn* gene (the most frequent being E50K) have been associated with primary open-angle glaucoma (Chalasanani et al., 2009) and amyotrophic lateral sclerosis (Maruyama et al., 2010). The molecular mechanism by which Optn mutations lead to these pathologies has not been established so far. Our results indicate that neither the E50K mutation nor D474N (mutation of the UBD) impairs the ability of Optn to regulate Plk1. This suggests that pathogenic mutations of Optn are not directly related to the mitotic function of Optn we describe in our study, and are either associated with other yet-to-be-characterized functions or are gain-of-function mutations. In contrast, the negative feedback mechanism of Plk1 activation by Optn is potentially relevant for models of tumorigenesis. Plk1 is a key regulator of mitosis, and, not unexpectedly, its upregulation has been linked to many cancers. Our study indicates that Optn is a negative regulator of Plk1, suggesting that its downregulation might be linked to carcinogenesis. In support of this hypothesis, downregulation of Optn in invasive urothelial carcinoma has been reported (Li et al., 2008). Further work is required to determine whether altered expression of Optn might account for uncontrolled Plk1 activity and tumorigenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells, Antibodies, DNA Constructs, and Chemicals

A detailed list of antibodies, DNA constructs, and chemicals is described in the Supplemental Experimental Procedures.

HeLa, COS-7, and HEK293T cell lines were grown in DMEM supplemented with FBS (10%). HeLa clones stably depleted for Optn expression were selected with 200 μg/ml Geneticin (G418). HeLa cell lines expressing Optn WT and mutants were selected with 1 μg/ml puromycin.

Transient transfections of HeLa cells and COS-7 with siRNA and/or plasmids were performed using ICAfectin442 (Eurogentec), JetPrime (Polyplus), or FuGENE 6 (Roche) following the manufacturer's instructions. HEK293T cells were transfected with the calcium phosphate transfection method.

Stable transfection of HeLa cells with shRNA or plasmids was performed using FuGENE 6. HeLa clones were obtained by limiting dilutions. For generation of retroviral supernatants, pMSCV-puro vector (encoding different Optn constructs or control vector) was transfected into Plat-A packaging cell line using FuGENE 6. High titers of recombinant viruses were obtained 48 hr after transfection and used to infect Optn-depleted HeLa cells.

Cell Extracts, Immunoprecipitations, and Immunoblots

Lysis, immunoprecipitations, and immunoblotting were performed as previously described (Lobry et al., 2007).

Subcellular Fractionations

Cytoplasmic, membrane, and nuclear extracts were obtained by using the Subcellular Protein Fractionation Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific).

Expression and Purification of Recombinant Proteins

pMal-c2-Cdc25C (a gift from M. Morris), pGST-Optn WT, and pGST-Optn S177A were transformed into *E. coli* cells (BL21). Expression was induced by addition of 1 mM IPTG for 4 hr. The MBP-fusion proteins were adsorbed to amylose resin columns (New England BioLabs) and eluted following the manufacturer's instructions. The GST-fusion proteins were purified on glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare).

Kinase Assay

Constitutive active GST-Plk1 (20 mUnits, ref Cy-E1163, Cyclex), GST-Optn, and GST-Optn S177A proteins were incubated in kinase buffer (KB) 1× (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, phosSTOP [Roche]) with 0.5 mM ATP and [γ -³²P]ATP for 30 min at 30°C. The reactions were stopped by the addition of 2× SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. For the IP-kinase assay, Plk1 was immunoprecipitated with anti-Plk1 mAb (ref sc-17783, Santa Cruz Biotechnology) as described above and incubated in the KB 1× buffer with 1 μg MBP-Cdc25C, 0.5 mM ATP, and [γ -³²P]ATP.

Indirect Immunofluorescence

Fixation, permeabilization, and images acquisition were performed as previously described (Lobry et al., 2007).

Cell-Cycle Analyses

Cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and resuspended in PBS containing 50 μg/mL propidium iodide (Sigma) and 200 μg/mL RNase A (Sigma). Analyses were performed with a FACScalibur flow cytometer (BD bioscience) and FlowJo v7.5.5 software.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures, one table, five movies, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article online at doi:10.1016/j.molcel.2011.12.030.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Yamashiro, M. Morris, A. Zahraoui, S. Tajbakhsh, and R. Goldstein for the generous gift of reagents. We thank P. Génin, A. Echard, and M. Morris for critical reading of the manuscript and E. Nigg, M. Bornens, and E. Meurs for helpful discussion. We also thank the Imagopole (PFID, PFCF), the flow cytometry, and the "recombinant proteins and antibodies production" platforms of the Institut Pasteur; we especially thank Emmanuelle Perret and Pierre-Henri Commere. R.W., E.L., and A.I. were supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). D.K. was supported by the Ministère de la Recherche. J.F. was a recipient of the Fundação para a Ciência e Tecnologia fellowship. Work in the laboratories of CeMM is supported by the Austrian Academy of Sciences, the Austrian Federal Ministry for Science and Research (Gen-Au Project APP), and by the Austrian Science Fund FWF. Work in the team of R.W. is supported by Institut National du Cancer (INCa).

Received: June 24, 2011

Revised: October 28, 2011

Accepted: December 13, 2011

Published online: February 23, 2012

REFERENCES

Albagha, O.M., Visconti, M.R., Alonso, N., Langston, A.L., Cundy, T., Dargie, R., Dunlop, M.G., Fraser, W.D., Hooper, M.J., Isaia, G., et al. (2010). Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and

- TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* **42**, 520–524.
- Archambault, V., and Glover, D.M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 265–275.
- Arden, S.D., Puri, C., Au, J.S., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4750–4761.
- Bastos, R.N., and Barr, F.A. (2010). Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J. Cell Biol.* **191**, 751–760.
- Brennan, I.M., Peters, U., Kapoor, T.M., and Straight, A.F. (2007). Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS ONE* **2**, e409. 10.1371/journal.pone.0000409.
- Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat. Methods* **3**, 1013–1019.
- Campbell, K.S., Cooper, S., Dessing, M., Yates, S., and Buder, A. (1998). Interaction of p59fyn kinase with the dynein light chain, Tctex-1, and colocalization during cytokinesis. *J. Immunol.* **161**, 1728–1737.
- Chalasan, M.L., Swarup, G., and Balasubramanian, D. (2009). Optineurin and its mutants: molecules associated with some forms of glaucoma. *Ophthalmic Res.* **42**, 176–184.
- Chung, P.Y., Beyens, G., Boonen, S., Papapoulos, S., Geusens, P., Karperien, M., Vanhoenacker, F., Verbruggen, L., Franssen, E., Van Offel, J., et al. (2010). The majority of the genetic risk for Paget's disease of bone is explained by genetic variants close to the CSF1, OPTN, TM7SF4, and TNFRSF11A genes. *Hum. Genet.* **128**, 615–626.
- 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**, 4516–4522.
- De Marco, N., Buono, M., Troise, F., and Diez-Roux, G. (2006). Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J. Biol. Chem.* **281**, 16147–16156.
- Elia, A.E., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2003). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**, 83–95.
- Gleason, C.E., Ordureau, A., Gourlay, R., Arthur, J.S., and Cohen, P. (2011). Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon beta. *J. Biol. Chem.* **286**, 35663–35674.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735–1739.
- Hattula, K., and Peranen, J. (2000). FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr. Biol.* **10**, 1603–1606.
- Israel, A. (2006). NF- κ B activation: nondegradative ubiquitination implicates NEMO. *Trends Immunol.* **27**, 395–397.
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israel, A., Vidalain, P.O., et al. (2009). NRP/Optineurin cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- κ B by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* **5**, e1000521. 10.1371/journal.ppat.1000521.
- Karki, S., LaMonte, B., and Holzbaur, E.L. (1998). Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J. Cell Biol.* **142**, 1023–1034.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol.* **16**, 1719–1725.
- Li, J., Abraham, S., Cheng, L., Witzmann, F.A., Koch, M., Xie, J., Rahman, M., and Mohammed, S.I. (2008). Proteomic-based approach for biomarkers discovery in early detection of invasive urothelial carcinoma. *Proteomics Clin. Appl.* **2**, 78–89.
- Litvak, V., Argov, R., Dahan, N., Ramachandran, S., Amarilio, R., Shainskaya, A., and Lev, S. (2004). Mitotic phosphorylation of the peripheral Golgi protein Nir2 by Cdk1 provides a docking mechanism for Plk1 and affects cytokinesis completion. *Mol. Cell* **14**, 319–330.
- Liu, X., and Erikson, R.L. (2003). Polo-like kinase (Plk1) depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5789–5794.
- Lobry, C., Lopez, T., Israel, A., and Weil, R. (2007). Negative feedback loop in T cell activation through I κ B kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 908–913.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119–123.
- Mankouri, J., Fragkoudis, R., Richards, K.H., Wetherill, L.F., Harris, M., Kohl, A., Elliott, R.M., and Macdonald, A. (2010). Optineurin negatively regulates the induction of IFN β in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000778. 10.1371/journal.ppat.1000778.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., et al. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223–226.
- Nagabhushana, A., Chalasan, M.L., Jain, N., Radha, V., Rangaraj, N., Balasubramanian, D., and Swarup, G. (2010). Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant. *BMC Cell Biol.* **11**, 4.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* **278**, 25277–25280.
- Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J.M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev. Cell* **12**, 713–725.
- Petronczki, M., Lenart, P., and Peters, J.M. (2008). Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell* **14**, 646–659.
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Heon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D., et al. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* **295**, 1077–1079.
- Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2005). Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* **169**, 285–295.
- Salaun, P., Rannou, Y., and Prigent, C. (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 41–56.
- Santamaria, A., Neef, R., Eberspacher, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D., Precht, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wortmann, L., et al. (2007). Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4024–4036.
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* **28**, 2925–2939.
- Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S.T., and Israel, A. (2000). Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF- κ B-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 22780–22789.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**, 1655–1658.
- Sumara, I., Gimenez-Abian, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol.* **14**, 1712–1722.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10660–10665.

- Vetterkind, S., Lee, E., Sundberg, E., Poythress, R.H., Tao, T.C., Preuss, U., and Morgan, K.G. (2010). Par-4: a new activator of myosin phosphatase. *Mol. Biol. Cell* 21, 1214–1224.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor Optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228–233.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D.J., and Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev. Cell* 14, 787–797.
- Zhu, G., Wu, C.J., Zhao, Y., and Ashwell, J.D. (2007). Optineurin negatively regulates TNFalpha- induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr. Biol.* 17, 1438–1443.

Supplemental Information

Plk1-Dependent Phosphorylation of Optineurin Provides a Negative Feedback Mechanism for Mitotic Progression

**David Kachaner, Josina Filipe, Emmanuel Laplantine, Angela Bauch,
Keiryn L. Bennett, Giulio Superti-Furga, Alain Israël, and Robert Weil**

Inventory of Supplemental Information

SUPPLEMENTAL DATA

1. Figure S1 is related to Figure 1.
2. Figure S2 is related to Figure 2.
3. Figure S3 is related to Figure 3.
4. Figure S4 is related to Figure 4.
5. Figure S5 is related to Figure 5.
6. Figure S6 is related to Figure 6.
7. Figure S7 is related to Figure 7.
8. Table S1 is related to Figure 4.
9. Movies S1, S2, S3, S4, S5 are related to Figure 7.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

1. Constructs and siRNA
2. Tandem affinity purification and mass spectrometry
3. Antibodies
4. Treatment with chemicals
5. Live-cell microscopy

SUPPLEMENTAL REFERENCES

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Figures

Figure S1

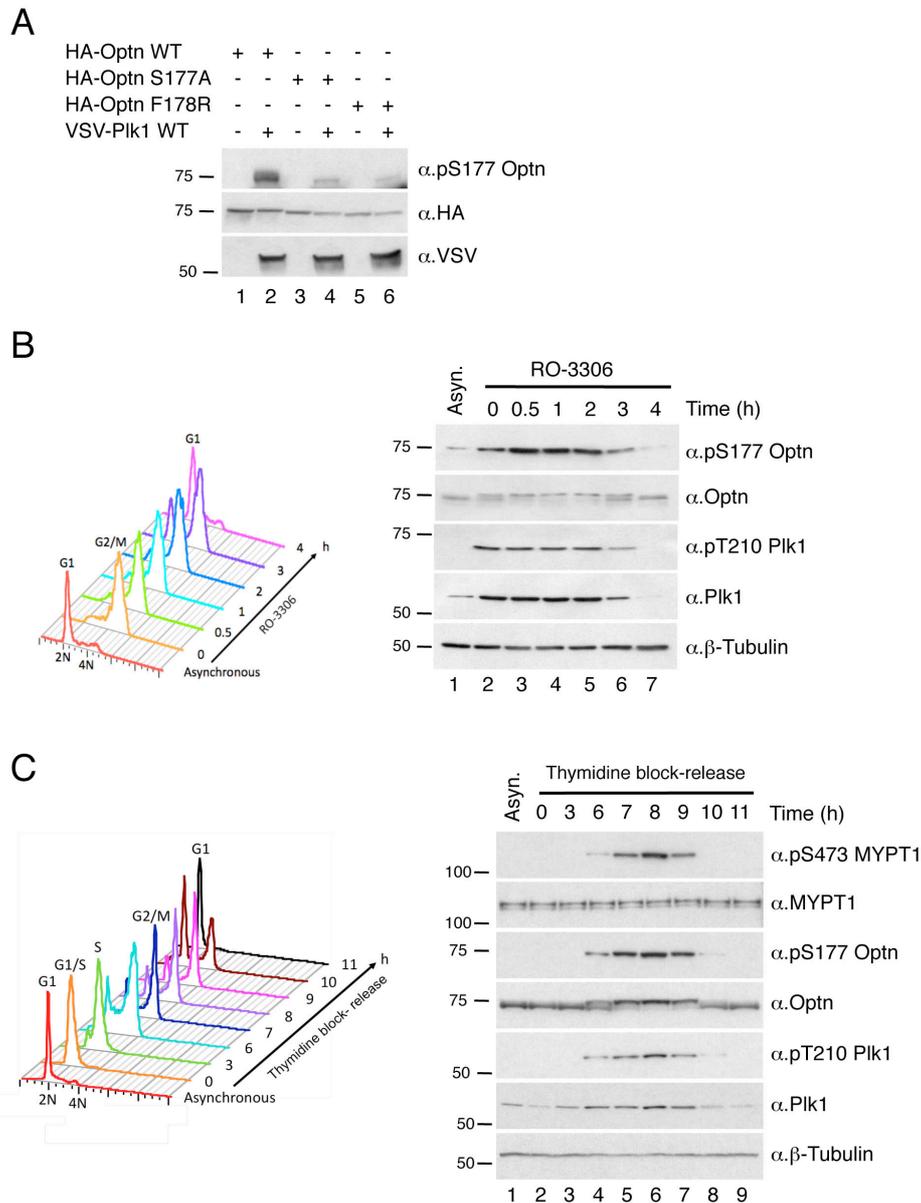


Figure S1: Optn is phosphorylated on Serine 177 during mitosis

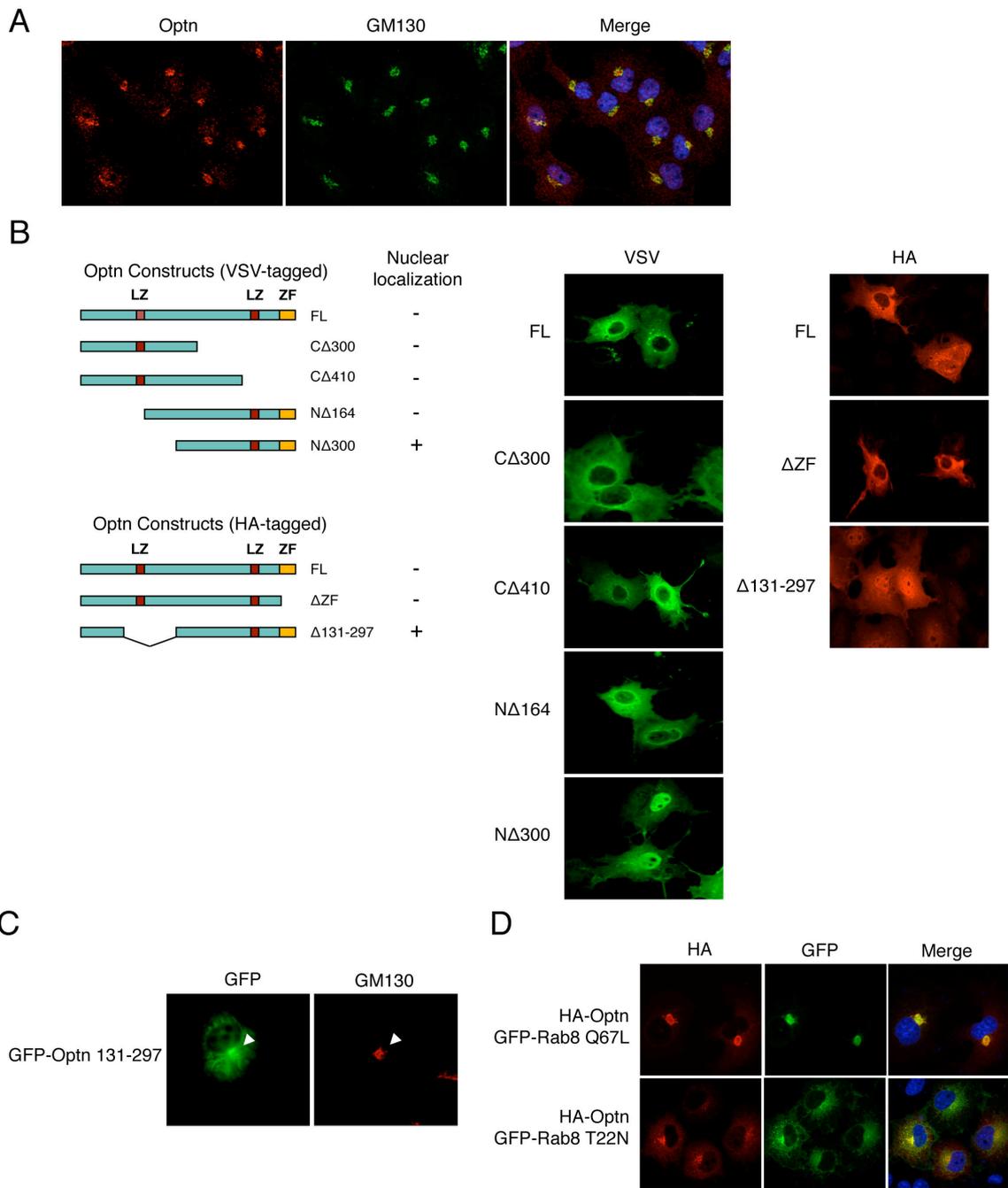
(A) HeLa cells were transfected with the indicated plasmids, lysed and protein extracts were analyzed by Western blot using the indicated antibodies.

(B) Endogenous Optn is phosphorylated on Ser177 during G2/M phase and coincided with

Plk1 expression and activation. HeLa cells were synchronously released from a Cdk1-inhibitor treatment (RO-3306) for the indicated periods of time. At each time point, half of the cells were harvested, lysed and analyzed for Optn and Plk1 phosphorylation and expression by Western blot using the indicated antibodies (**right panel**), whereas the second half was fixed in ethanol and used for cytometric analysis of the cell cycle progression. 2N and 4N represent DNA content (**left panel**).

(C) HeLa cells were arrested at the G1/S boundary with a double thymidine treatment and then released into fresh medium. Cells were collected at the indicated period of time and stained with propidium iodide. The cell-cycle profile was determined by flow cytometry (**left panel**) and the indicated proteins were assayed by Western blotting (**right panel**). “Asyn.” indicates asynchronous cells; 2N and 4N represent DNA content.

Figure S2



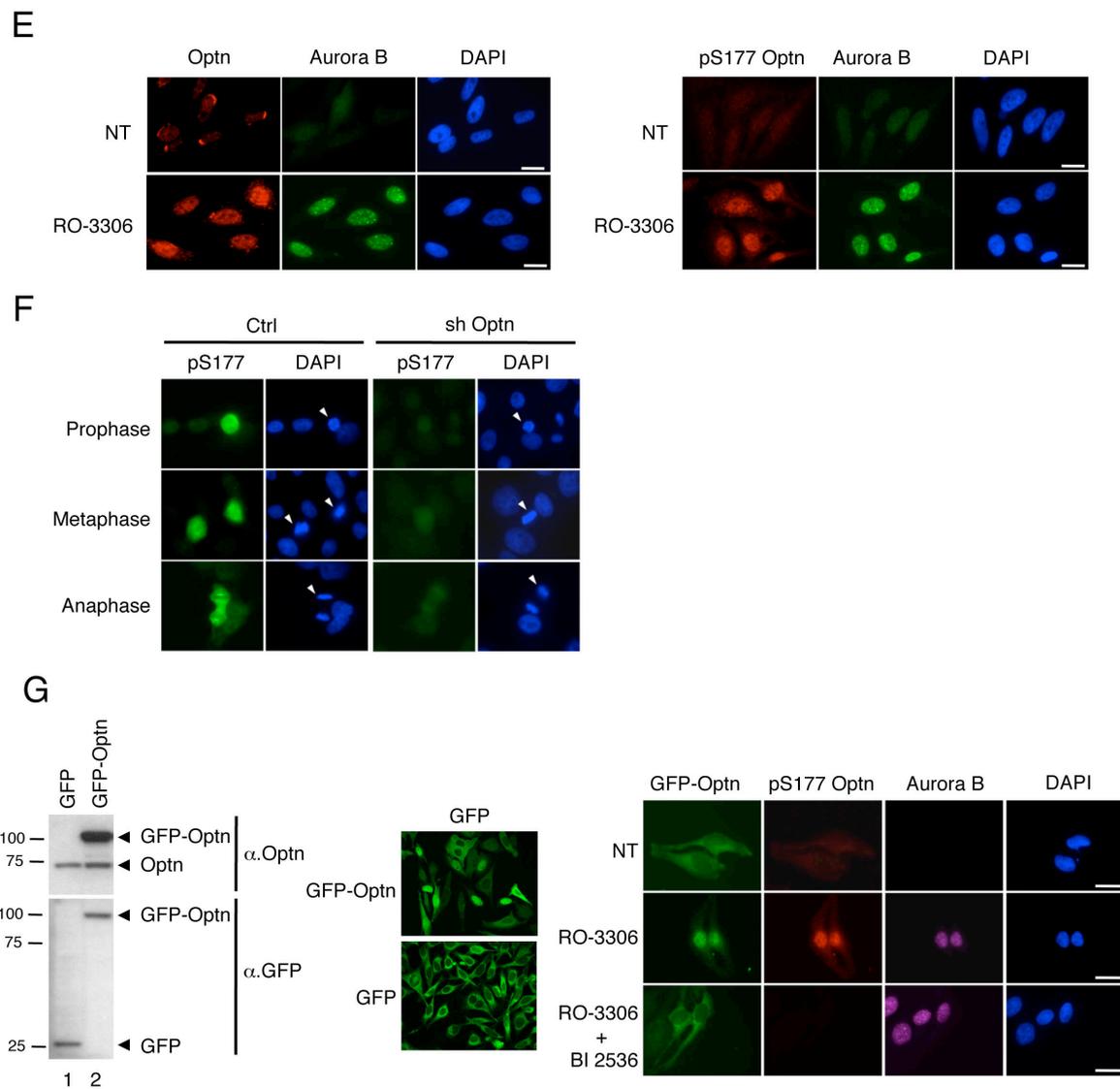


Figure S2: Optn translocates into the nucleus during mitosis

(A) Localization of Optn at the Golgi apparatus. Cos-7 cells were fixed and processed for immunostaining using anti-Optn or anti-GM130 antibodies. Stained cells were examined by immunofluorescence microscopy. Yellow colour in the merged images indicated co-localization.

(B) Schematic representation of Optn constructs and their ability to localize into the nucleus (**left panel**). Representative microscopy images of the localization of VSV- and HA-tagged Optn mutants in HeLa cells respectively shown in green and red (**middle and right panels**).

(C) The [131-297] region is sufficient to target GFP at the Golgi apparatus. HeLa cells were transfected with Optn 131-297 fused to GFP and stained for the Golgi marker GM130 (red).

(D) Rab8 Q67L expression induced the localization of Optn in tight perinuclear spots. HeLa cells were cotransfected with HA-tagged Optn and either GFP-Rab8 Q67L (dominant active form of Rab8) or GFP-Rab8 T22N (dominant inactive form of Rab8) and stained for HA (red) and DNA (blue). Colocalization appears in yellow.

(E) Optn (**left panel**) and its phosphorylated form (**right panel**) translocate into the nucleus during the G2 phase. HeLa cells were treated with RO-3306 as indicated and stained for Optn or pS177 Optn (Red), Aurora B (green) and DNA (blue). Scale Bar 10 μ m.

(F) Specificity of the pS177 Optn antibody. Asynchronous HeLa cells stably transfected either with the empty vector or with Optn shRNA were stained for pS177 Optn (green) and DAPI (blue). Representative cells from different stages of mitosis are shown.

(G) GFP-Optn was stably expressed in HeLa cells and sub-cloned under limiting dilutions. The level of expression of GFP and GFP-Optn were monitored using anti-GFP antibody and were compared to the expression of endogenous Optn by immunoblotting with anti-Optn antibody (**left panel**). GFP and GFP-Optn subcellular localizations in asynchronous cells were visualized by immunofluorescence (**middle panel**). The redistribution of GFP-Optn in G2/M synchronized cells was monitored after treatment of the cells with RO-3306 and BI 2536 as indicated (**right panel**). The anti-pS177 (red) was used to detect phosphorylated Optn. Aurora B staining (magenta) was used to detect cells in late G2 phase. "NT" indicates non-treated cells. Scale bar 10 μ M.

Figure S3

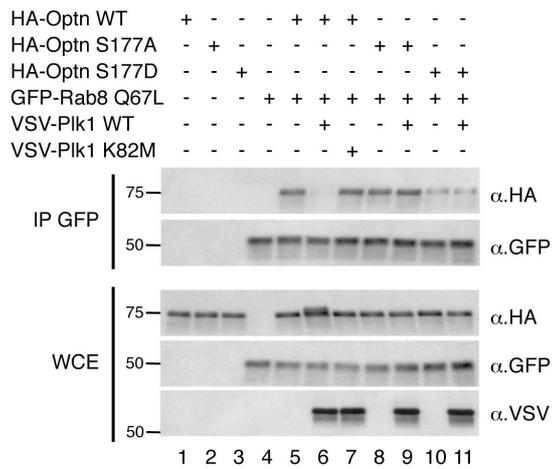


Figure S3 : Optn dissociates from Rab8 upon phosphorylation by Plk1 on Serine 177.

HEK-293T cells were transfected with the indicated plasmids and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-GFP antibodies and immunoblotted with the indicated antibodies.

Figure S4

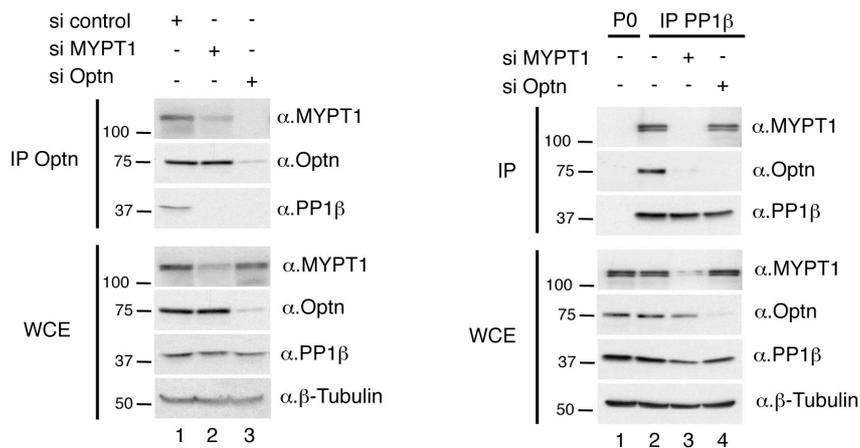


Figure S4: The interaction between endogenous Optn and PP1 β is dependent on its association with MYPT1.

HEK-293T cells were transfected with either an irrelevant siRNA (control) or Optn- or MYPT1-directed siRNA. Total lysates were immunoprecipitated with an anti-Optn antibody or with an anti-PP1 β antibody (or a preimmune antibody, Po). Western blot analysis of immunoprecipitates and whole cell extracts (WCE) were performed using anti-MYPT1, anti-Optn and anti-PP1 β antibodies. Anti- β -Tubulin was used as a loading control.

Figure S5

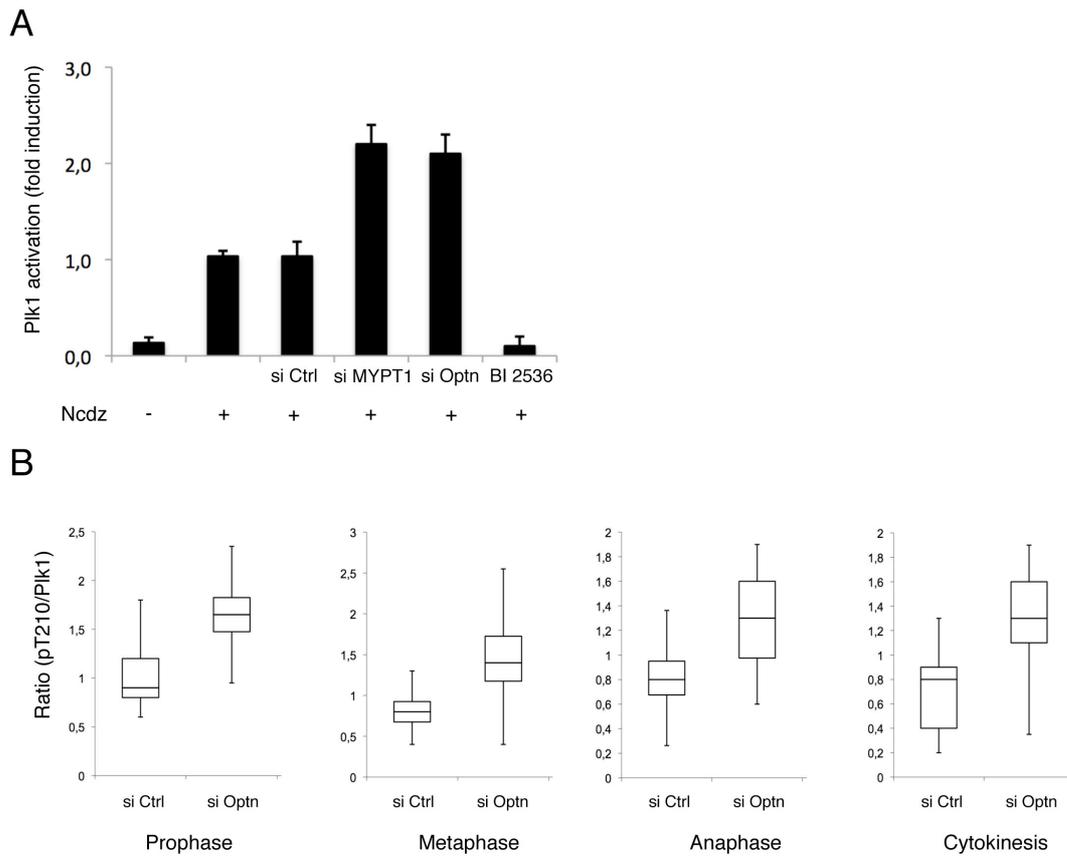


Figure S5: Quantification of the levels of Plk1 activity and Thr210 phosphorylation following Optn depletion.

(A) Quantification of Plk1 activities in response to siRNA transfection and Nocodazole treatment. Error bars represent standard deviation of a triplicate *in vitro* kinase assay using Cdc25C as substrate.

(B) Ratios (pT210/Plk1) of staining intensities in control (n=80) and Optn depleted cells (n=80) were analyzed from prophase to cytokinesis. The upper and lower edge of each box represents upper and lower quartiles. The median is indicated by a horizontal line.

Figure S6

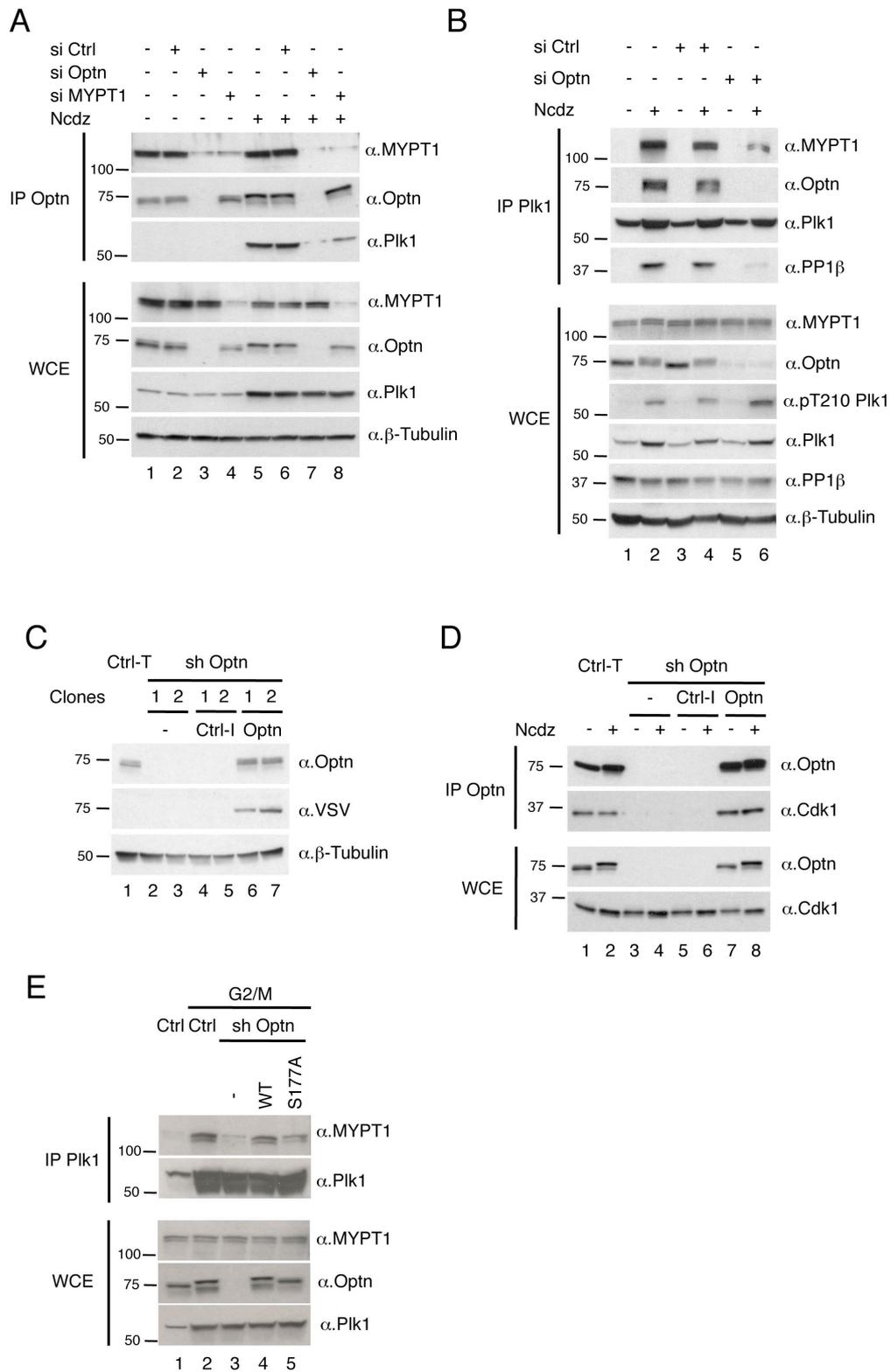


Figure S6: Biochemical analysis of the interactions between Optn, Plk1, MYPT1 and Cdk1

(A) HeLa cells were transiently transfected with the indicated siRNAs and treated with Nocodazole as indicated. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Optn antibody. Western blots were performed using the indicated antibodies.

(B) HEK-293T cells were transiently transfected with the indicated siRNAs and treated with Nocodazole as indicated. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Plk1 antibody. Western blots were performed using the indicated antibodies.

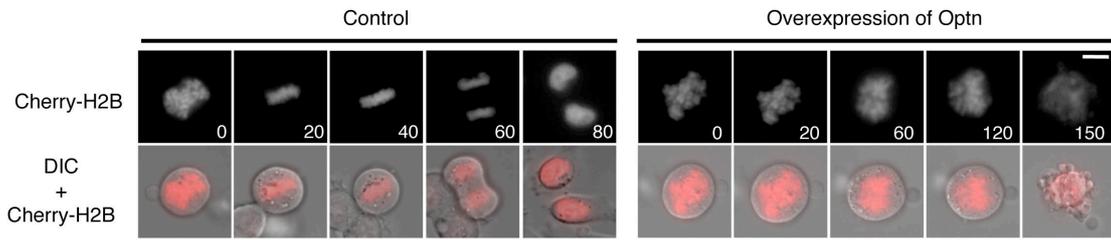
(C) HeLa cells were stably transfected with a plasmid expressing Optn-directed shRNA or with the empty vector (Ctrl-T) and drug-resistant cells were cloned by limiting dilutions. In order to restore Optn expression, two independent Optn-depleted clones (clone 1 and 2) were infected with retroviruses expressing shRNA-insensitive VSV-Optn or empty retroviruses (Ctrl-I) and selected using puromycine. Lysates were analyzed by Western blotting as indicated.

(D) Clones of HeLa cells, generated as described in panel C, were treated with Nocodazole as indicated, lysed and immunoprecipitation of Optn was done using an anti-Optn antibody. Western blot analysis of immunoprecipitates and whole cell extracts (WCE) were performed using anti-Optn and anti-Cdk1 antisera.

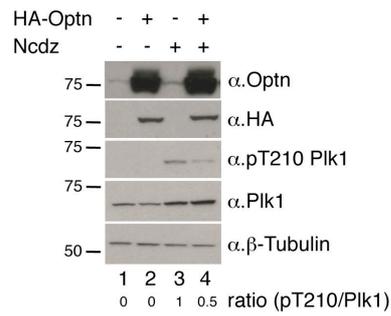
(E) Optn depleted HeLa cells and cells reconstituted with Optn WT and S177A were synchronized in G2/M by a double thymidine block followed by a release of 7 hours. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Plk1 antibody. Western blots were performed using the indicated antibodies.

Figure S7

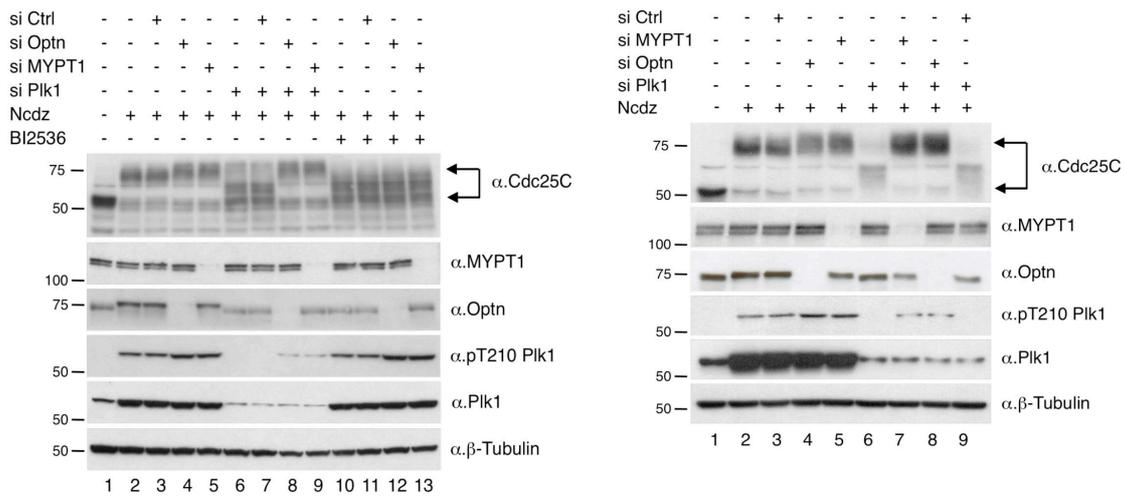
A



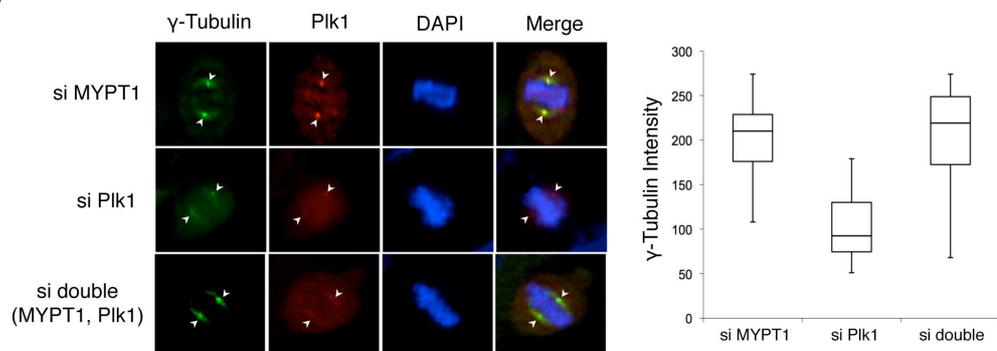
B



C



D



E

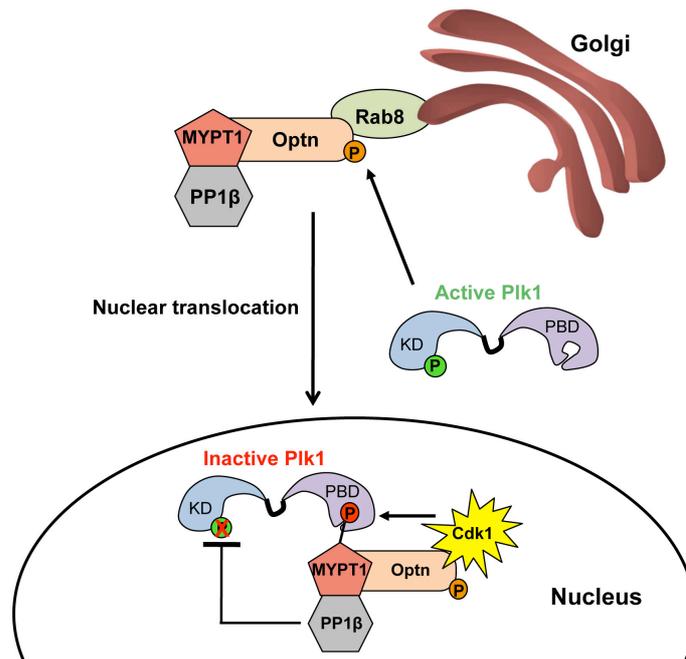


Figure S7 : Overexpression of Optn induces mitotic arrest and its depletion antagonizes Plk1 functions

(A) Live-Cell Imaging of Control and Optn-overexpressing HeLa cells. Control cells and Optn overexpressing cells were transiently transfected with a plasmid encoding Cherry-histone 2B and imaged using a Axio Observer Z1 microscope system. Images were taken at 2 min intervals. The Cherry fluorescence and the corresponding differential interference contrast images are shown. Scale bar 10 μ M.

(B) HeLa cells transfected with HA-Optn were treated with Nocodazole as indicated. The fold induction of Plk1 phosphorylation is calculated as a ratio between pT210 and Plk1 signals using Quantity one software.

(C) **Left panel:** HeLa cells transiently transfected with the indicated siRNAs were treated with Nocodazole and BI 2536 as indicated. Depletion efficiency was determined by Western blotting with anti-MYPT1 and anti-Optn antibodies. The change in electrophoretic mobility of Cdc25C corresponding to its phosphorylation by Plk1 is detected by Western blotting with an

anti-Cdc25C antibody. The position of Cdc25C and its phosphorylated isoforms are indicated by arrows. The level of expression and phosphorylation of Plk1 were monitored using respectively anti-Plk1 and anti-pT210 antibodies. Anti- β -Tubulin was used as a loading control. **Right panel:** A similar experiment was performed in U2OS cells.

These panels require a bit of explanations:

Consistent with previous reports (Izumi and Maller, 1993; Kumagai and Dunphy, 1992), we observed a shift in the apparent molecular mass of Cdc25C from 70kDa to 100 kDa on immunoblots performed in HeLa and U2OS cells corresponding to N-terminal phosphorylation during mitosis (lanes 2). This shifted form of Cdc25C decreased when Plk1 expression was silenced (lanes 6). The effect was counteracted by the simultaneous depletion of Optn, as previously shown for MYPT1 (Yamashiro et al., 2008) (compare lanes 8, 9 to 7). In addition, we observed that these double depletions restored partially the phosphorylation of remaining Plk1 as monitored by immunoblotting with the anti-pT210 (lanes 8, 9). Despite the ability to increase Plk1 phosphorylation, Optn and MYPT1 depletions could not restore Cdc25C phosphorylation when the cells were treated with BI 2536 (lanes 10-13). This result suggests that a minimum activity of Plk1 is needed to observe the antagonistic effect of Optn or MYPT1 depletion.

(D) Double depletion of MYPT1 and Plk1 rescues the accumulation of γ -Tubulin at the centrosomes. Localization of γ -Tubulin (green), Plk1 (red) and DNA (blue) in control, MYPT1-depleted, Plk1-depleted and double depleted HeLa cells (**left panel**). Arrowheads indicate centrosomes. The scale bar represents 5 μ m. Box plot of γ -Tubulin intensities of centrosomes (**right panel**). The upper and lower edge of each box represents upper and lower quartiles, respectively. The median is indicated by a horizontal line.

(E) Plk1 phosphorylates Optn at Ser177 during G2/M phase. This mitosis-specific phosphorylation of Optn induces its dissociation from Rab8 and its translocation from the Golgi apparatus to the nucleus. Once in the nucleus Optn allows the phosphorylation of MYPT1 by Cdk1, which generates the binding site for Plk1. Then PP1 β dephosphorylates Plk1 at Thr210, its main activating site, in order to antagonize Plk1 activity.

Supplemental Table S1

ACCESSION CODE	GENE IDENTIFIER	PROTEIN DESCRIPTION	UNIQUE PEPTIDE COUNTS	SPECTRAL COUNTS	SEQUENCE COVERAGE
IPI00304189	OPTN	ISOFORM 1 OF OPTINEURIN.	45	345	0,68
136429	NA	trypsin [<i>Sus scrofa</i>]	4	106	0,25
IPI00383111	NA	57 KDA PROTEIN.	12	59	0,21
IPI00021439	ACTB	ACTIN, CYTOPLASMIC 1.	13	33	0,38
IPI00021428	ACTA1	ACTIN, ALPHA SKELETAL MUSCLE.	10	27	0,27
IPI00304925	HSPA1B	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 1.	17	26	0,25
IPI00019502	MYH9	MYOSIN-9.	10	21	0,06
IPI00305344	MPRIP	ISOFORM 1 OF MYOSIN PHOSPHATASE RHO-INTERACTING PROTEIN.	17	17	0,21
IPI00003865	HSPA8	ISOFORM 1 OF HEAT SHOCK COGNATE 71 KDA PROTEIN.	14	16	0,24
IPI00008453	CORO1C	CORONIN-1C.	13	14	0,25
IPI00019329	DYNLL1	DYNEIN LIGHT CHAIN 1, CYTOPLASMIC.	5	14	0,64
IPI00062037	DYNLL2	DYNEIN LIGHT CHAIN 2, CYTOPLASMIC.	5	14	0,64
IPI00183002	PPP1R12A	ISOFORM 1 OF PROTEIN PHOSPHATASE 1 REGULATORY SUBUNIT 12A.	11	13	0,12
IPI00397526	MYH10	ISOFORM 1 OF MYOSIN-10.	7	13	0,04
IPI00178083	NA	29 KDA PROTEIN.	12	12	0,39
IPI00292953	RAI14	ISOFORM 2 OF ANKYCORBIN.	11	11	0,12
IPI00339269	HSPA6	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 6.	8	11	0,12
IPI00302592	FLNA	FILAMIN 1.	10	10	0,05
IPI00301277	HSPA1L	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 1L.	7	10	0,12
IPI00218236	PPP1CB	SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE PP1-BETA CATALYTIC SUBUNIT.	6	8	0,2
IPI00796330	NA	18 KDA PROTEIN.	5	8	0,2
IPI00478292	SPTAN1	285 KDA PROTEIN.	7	7	0,03
IPI00014230	C1QBP	COMPLEMENT COMPONENT 1 Q SUBCOMPONENT-BINDING PROTEIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR.	5	7	0,22
IPI00220578	GNAI3	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G.	6	6	0,19
IPI00010779	TPM4	TROPOMYOSIN 4.	6	6	0,18
IPI00335168	MYL6B	MYOSIN, LIGHT CHAIN 6, ALKALI, SMOOTH MUSCLE AND NON-MUSCLE ISOFORM 1.	5	6	0,28
IPI00216134	TPM1	TROPOMYOSIN 1 ALPHA CHAIN ISOFORM 7.	5	6	0,19
IPI00007765	HSPA9	STRESS-70 PROTEIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR.	5	5	0,09
IPI00465121	GNAI2	GALPHA I2 PROTEIN.	5	5	0,15
IPI00075248	CALM3	CALMODULIN.	3	5	0,19
IPI00179330	UBC	UBIQUITIN AND RIBOSOMAL PROTEIN S27A PRECURSOR.	4	4	0,3
IPI00796776	NA	60 KDA PROTEIN.	4	4	0,07
IPI00300096	RAB35	RAS-RELATED PROTEIN RAB-35.	3	3	0,16
IPI00014424	EEF1A2	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA 2.	3	3	0,06

IPI00033494	NA	MYOSIN REGULATORY LIGHT CHAIN.	3	3	0,19
IPI00376344	MYO1B	ISOFORM 1 OF MYOSIN IB.	3	3	0,03
IPI00000874	PRDX1	PEROXIREDOXIN-1.	2	2	0,11
IPI00003348	GNB2	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(I)/G(S)/G(T) SUBUNIT BETA 2.	2	2	0,06
IPI00010438	SNAP23	ISOFORM SNAP-23A OF SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATED PROTEIN 23.	2	2	0,11
IPI00001871	PAWR	PRKC APOPTOSIS WT1 REGULATOR PROTEIN.	2	2	0,09
IPI00005614	SPTBN1	ISOFORM LONG OF SPECTRIN BETA CHAIN, BRAIN 1.	2	2	0,01
56160532	NA	E1B 55K [Human adenovirus type 5]	2	2	0,01
IPI00795269	NA	11 KDA PROTEIN.	2	2	0,22
IPI00008455	MYO6	ISOFORM 2 OF MYOSIN-6.	2	2	0,02
IPI00028931	DSG2	DESMOGLEIN 2 PREPROPROTEIN.	2	2	0,02
IPI00013808	ACTN4	ALPHA-ACTININ-4.	2	2	0,02

Table S1: List of the interacting proteins identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MSMS) from a tandem affinity purification (TAP) of GS-tagged Optn.

The number of uniquely-identified peptides, tandem mass spectra and sequence coverage are given for each protein.

SUPPLEMENTAL MOVIES

Movie S1:

Time-lapse recording of control HeLa cells transfected with the Cherry-Histone 2B. Pictures were taken every 2 minutes during 24h.

Movie S2:

Time-lapse recording of Optn-depleted HeLa cells transfected with the Cherry-Histone 2B. Pictures were taken every 2 minutes during 24h.

Movie S3:

Time-lapse recording of control HeLa cells (transfected with the empty vector). Pictures were taken every 10 minutes during 48h.

Movies S4 and S5:

Time-lapse recording of HeLa cells stably transfected with Optn shRNA. Pictures were taken every 10 minutes.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs and siRNA

PcDNA-3-HA-tagged-Optn, VSV-tagged-Optn and -Optn D474N plasmids were previously described (Journo et al., 2009). Modified forms of Optn: HA-Optn Δ 131-297, HA-Optn L150P L157P (LL/PP), HA-Optn S177A, HA-Optn S177D, HA-Optn F178R and VSV-tagged-Optn E50K were generated by site-directed mutagenesis with a PCR-based strategy. For Optn WT, Optn S177A, Optn S177D, Optn E50K and Optn D474N, RNAi insensitive constructs were created by introduction of silent mutations in the RNAi targeting sequence. The Optn constructs were subsequently transferred into the pMSCV-puro vector (Clontech) by PCR amplification at HpaI site. Optn cDNA fragments amplified using a pair of primers were cloned at EcoRI and BamHI sites of pEGFP.C2 plasmid (Clontech) in order to obtain GFP-Optn 131-297, GFP-Optn 131-253, GFP-Optn 131-210, GFP-Optn 131-170 and GFP-Optn 171-297. To construct plasmids pGST-Optn and pGST-Optn S177A, the fragments containing Optn and Optn 177A coding regions were PCR amplified and cloned into the pGEX-3X plasmid (Pharmacia). Myc-tagged-Plk1 was a kind gift of R. Goldstein. VSV-tagged-Plk1 was obtained by cloning Plk1 into pcDNA3/pT7-link-GVSV vectors at XhoI and XbaI sites. VSV-Plk1 K82M was obtained by site-directed mutagenesis. HA-tagged-MYPT1 and Flag-tagged-PP1 β were purchased from ImaGenes. GFP-Rab8 T22N and GFP-Rab8 Q67L were kindly provided by A. Zahraoui. Cherry-Histone 2B was a kind gift of S. Tajbakhsh.

Optn double-stranded siRNAs (5'GGAGACUGUUGGAAGCGAAGUdTdT), MYPT1 double-stranded siRNAs (5'GAGACAAGAAAGAUUUGCUDdTdT) and β -globin double-stranded siRNAs (control, 5'GGUGAAUGUGGAAGAAGUUDdTdT) were purchased from Proligo (Sigma). Plk1 double-stranded siRNAs (smart pool) was purchased from Dharmacon. The mammalian expression vector, pSuper (OligoEngine, Seattle, WA), was used for stable

expression of shRNA for Optn in HeLa cells. The pSuper vector served as a non-silencing control.

Tandem affinity purification and mass spectrometry

Tandem affinity purification using the GS-TAP cassette and analysis by mass spectrometry was performed essentially as described previously (Burckstummer et al., 2006). GS-TAP-tagged Optn expressed in HEK-293 cells was purified using rabbit immunoglobulin G (IgG) agarose and eluted by tobacco etch virus (TEV) protease cleavage. The Optn-containing complex was further purified using streptavidin agarose and eluted by boiling in SDS sample buffer. The final TAP eluate was separated on an SDS-PAGE and stained by silver staining. Protein complex composition was analyzed by LC-MSMS.

Antibodies

The following antibodies were used: anti-VSV mAb (P5D4), anti-Myc mAb (9E10), anti-Flag M2 mAb (ref F-1804, Sigma-Aldrich), anti-HA.11 mAb (16B12, ref MMS-101P, Covance), anti-MYPT1 rabbit polyclonal antibody (ref 07-672, Millipore), anti-PP1 β rabbit polyclonal antibody (ref 07-1217, Millipore), anti-Plk1 mAb (ref sc-17783, Santa Cruz Biotechnology), anti-pT210-Plk1 mAb (ref 628902, BioLegend), anti-Cdc25C rabbit polyclonal antibody (ref sc-327, Santa Cruz Biotechnology), anti- β -Tubulin mAb (ref T4026, Sigma), anti-GFP rabbit polyclonal antibody (ref A6455, Invitrogen), anti-GFP mAb (ref 11814460001, Roche), anti-Cdk1/Cdc2 mAb (ref sc-54, Santa Cruz Biotechnology), anti-GM130 mAb (ref 610822, BD Biosciences), anti-RNA Polymerase B Subunit hRPB1 (ref PB-7C2, Euromedex), anti-NEMO rabbit polyclonal antibody (ref sc-8330, Santa Cruz Biotechnology), anti-Aurora B (ref 611082, BD Biosciences), anti-Cyclin B1 (ref sc-245; Santa Cruz Biotechnology), anti-Optn mAb D1.1 was raised in the laboratory against a Glutathione-S-transferase (GST)-Optn (aa 1-300) fusion protein. Anti-Optn rabbit polyclonal antibody was generated against a TrpE fusion protein encompassing amino acids 84-164 of human Optn. An antibody against

Ser177-phosphorylated Optn (pS177) was raised in rabbit using the sequence of a KLH-conjugated phosphopeptide SGSSpSSFVEIR where pS indicates phosphoSerine (Eurogentec). The antibody was purified with non phosphopeptide- and phosphopeptide-conjugated agarose gel. Anti-pS473 MYPT1 mAb is a gift from S. Yamashiro (Yamashiro et al., 2008). Secondary antibodies for immunofluorescence were supplied by Molecular Probes (Alexa Fluor conjugates).

Treatment with chemicals

Cells were incubated for 20h with 100 ng/ml Nocodazole (Sigma). For double Thymidine block and release, cells were first incubated with 2.5 mM Thymidine (Sigma) for 16h and then released for 8h. The Thymidine block was then repeated, and the second release was performed for the indicated period of time. For the G2/M border arrest, cells were treated with 9 μ M RO-3306 (Calbiochem) during 20h and then released for the indicated period of time. For Plk1 kinase inhibition, cells were treated with 50nM BI 2536 (Axon MedChem) 12h before harvesting.

Live-cell microscopy

Control cells and Optn-depleted cells transfected with Cherry-Histone 2B were imaged with the Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) in an incubation chamber at 37°C and 5% CO₂. Images were acquired every 2 min. for 24h and analyzed with the AxioVision software 4.8.

For live-cell analyses, HeLa cells stably transfected with Optn shRNA and cells transfected with the empty vector (control), were followed by time-lapse microscopy using the Nikon Biostation IM (Nikon) at 37°C and 5% CO₂. Images were acquired every 10 minutes for 48h.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3, 1013-1019.

Izumi, T., and Maller, J.L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell* 4, 1337-1350.

Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israel, A., Vidalain, P.O., *et al.* (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog* 5, e1000521.

Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 70, 139-151.

Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D.J., and Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell* 14, 787-797.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Phosphorylation d'Optineurine par Plk1 en mitose

- 1. Mis en évidence de la phosphorylation d'Optineurine au cours de la mitose**
- 2. Optineurine est-elle un substrat des autres Polo-like kinases ?**

II. Effets de la phosphorylation d'Optineurine par Plk1 sur sa localisation subcellulaire

- 1. Dissociation d'Optineurine de l'appareil de Golgi**
- 2. Import d'Optineurine dans le noyau**
- 3. Export nucléaire d'Optineurine**

III. Optineurine interagit avec le complexe myosine phosphatase MYPT1-PP1 β

- 1. Le complexe myosine phosphatase**
- 2. Cartographie du domaine d'interaction d'Optineurine avec MYPT1**
- 3. MYPT1 régule-t-elle la localisation nucléaire d'Optineurine en début de mitose ?**

IV. Optineurine est un régulateur négatif de l'activité de Plk1 pendant la mitose

- 1. Optineurine et le complexe myosine phosphatase font partie d'une même voie d'inactivation de Plk1**
- 2. A quel moment de la mitose a lieu la régulation négative de Plk1 ?**
- 3. Optineurine, un régulateur négatif d'Aurora A ?**

V. Conséquences fonctionnelles de la déplétion d'Optineurine au cours de la mitose

- 1. La déplétion d'Optineurine génère la formation de cellules multinucléées**
- 2. Quels sont les mécanismes moléculaires responsables des défauts mitotiques observés dans les cellules déplétées pour Optineurine ?**

VI. Perspectives

- 1. Régulation du trafic vésiculaire en mitose par Optn ?**
- 2. Régulation de l'autophagie en mitose par Optn ?**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le rôle essentiel de Plk1 dans la régulation de la division cellulaire n'est plus à démontrer. Depuis sa découverte en 1988 chez la drosophile, plusieurs centaines d'articles décrivent les fonctions de cette protéine au cours du cycle cellulaire et précisent chaque fois un peu plus les mécanismes d'action de cette protéine. Plk1 participe à chacune des différentes étapes de la mitose, de la prophase à la cytokinèse où elle se révèle généralement indispensable ; la plupart de ses substrats connus ayant une fonction mitotique précise. Elle est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers bien que l'on ne sache toujours pas précisément si cette surexpression est une cause ou bien une conséquence de la prolifération accrue des cellules cancéreuses. L'étude de la fonction et de la régulation de cette protéine reste donc toujours d'actualité et présente un intérêt majeur aussi bien pour la recherche fondamentale que pour l'industrie pharmaceutique.

Au cours de ma thèse, nous avons pu montrer qu'Optn est à la fois un substrat de Plk1 lors de la mitose mais également un régulateur négatif de l'activité de cette kinase. A partir de nos résultats, nous avons tenté de proposer un modèle dynamique dans lequel Optn fait partie d'un mécanisme de rétrocontrôle de l'activité de Plk1. Dans un premier temps, Plk1 régule la translocation nucléaire d'Optn en début de mitose puis, dans un second temps, Optn, associée au complexe phosphatase (MYPT1-PP1 β), déphosphoryle et inactive Plk1. Dans cette discussion, je reviendrai point par point sur l'ensemble de nos résultats et sur le modèle de régulation de Plk1 que nous proposons.

I. Phosphorylation d'Optineurine par Plk1 en mitose

Une analyse bioinformatique de la séquence protéique d'Optn avait permis d'identifier un site consensus de phosphorylation par Plk1 incluant le résidu sérine 177 (résultats préliminaires obtenus avant mon arrivée dans le laboratoire par Josina Filipe, étudiante en thèse sous la direction de Robert Weil). Un anticorps anti-phospho spécifique dirigé contre la sérine 177 phosphorylée avait alors été généré afin de valider l'existence de cette phosphorylation. Les résultats préliminaires de Josina Filipe ont montré qu'Optn était un substrat de Plk1 aussi bien par des expériences *in vitro* qu'*ex vivo*. Par ailleurs, les données obtenues par Josina Filipe montraient également que la surexpression de Plk1 et Optn dans des cellules HeLa entraînait un changement de mobilité électrophorétique d'Optn, correspondant à l'apparition de sa forme phosphorylée sur la sérine 177. J'ai pu reproduire et confirmer ces résultats.

1. Mis en évidence de la phosphorylation d'Optineurine au cours de la mitose

Afin d'évaluer la phosphorylation d'Optn endogène, nous avons synchronisé les cellules en mitose (l'expression et l'activité de Plk1 sont maximales en mitose). Nous avons alors utilisé deux approches différentes : le traitement par le nocodazole ou le double blocage par la thymidine, qui présentent chacun des avantages et des inconvénients.

Le nocodazole est une drogue qui inhibe la polymérisation des microtubules et par conséquent empêche la formation du fuseau mitotique et bloque les cellules en prométaphase. Cette méthode est simple et rapide – après 20 heures de traitement, absolument toutes les cellules sont bloquées en mitose – mais présente pour principal inconvénient d'être peu spécifique puisqu'il affecte l'ensemble des microtubules et par conséquent la morphologie même de la cellule ainsi que toutes les fonctions cellulaires associées aux microtubules. De plus, rappelons qu'Optn pourrait servir d'adaptateur entre l'appareil de Golgi et le réseau de microtubules ; le traitement au nocodazole pourrait donc affecter directement une autre fonction d'Optn importante pour le trafic vésiculaire (Hattula and Peränen, 2000 ; Sahlender et al., 2005). Par ailleurs, après 20 heures de traitement, cette méthode est irréversible et ne permet donc plus l'étude de la cinétique de phosphorylation et éventuellement de déphosphorylation d'Optn au cours des différentes phases du cycle cellulaire.

La technique du double bloc thymidine consiste à ajouter dans le milieu de culture cellulaire un excès de thymidine qui a pour effet d'inhiber la ribonucléotide réductase, l'enzyme qui convertit les ribonucléotides en désoxyribonucléotides. En conséquence, la synthèse de l'ADN est bloquée et les cellules sont synchronisées en début de phase S. Précisons également que la double synchronisation s'effectue par deux traitements successifs avec de la thymidine en excès, ce qui permet d'augmenter le nombre de cellules synchrones, en agissant sur celles qui avaient échappé au premier blocage. Contrairement au traitement des cellules par le nocodazole, cette méthode de synchronisation a l'avantage d'être réversible. Le blocage est ainsi levé en éliminant l'excès de thymidine par plusieurs lavages des cellules en culture. Les cellules reprennent alors leur cycle de division, ce qui permet d'obtenir, au cours du temps, des cellules synchronisées dans chacune des phases du cycle. L'analyse de la quantité d'ADN cellulaire par cytométrie de flux (marquage de l'ADN à l'iodure de propidium), réalisée en parallèle du double bloc thymidine permet de mesurer le pourcentage de cellules en phase G1 (quantité 2N), en G2/M (quantité 4N) ou S (entre 2N et 4N). Bien que cette méthode soit plus physiologique que le traitement des cellules par le nocodazole, elle présente néanmoins quelques inconvénients. Si la quasi-totalité des cellules sont effectivement synchronisées en début de phase S avec le double bloc thymidine, près de 10% des cellules le resteront définitivement, tandis que les autres cellules ne redémarrent pas leur cycle cellulaire toutes exactement en même temps (il peut y avoir un décalage de plusieurs minutes). De plus cette méthode ne permet pas de différencier les cellules qui sont en phase G2 ou en phase M. Il nous sera donc impossible lors de l'analyse du cycle de savoir précisément dans quelque phase de la mitose exactement se trouvent les cellules. Par exemple, 8 heures après la reprise du cycle, certaines d'entre elles seront encore en phase G2 tandis que les autres seront en prophase ou même déjà en métaphase.

Aussi bien le traitement par le nocodazole que la synchronisation par double blocage à la thymidine entraînent la phosphorylation d'Optn par Plk1 pendant la mitose et peut-être même déjà au cours de la phase G2. Nous avons également observé que 12 heures après sevrage en thymidine, lorsque les cellules ont terminé leur cycle de division, la phosphorylation d'Optn n'est plus détectée. Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons différentes :

Premièrement, on peut supposer qu'Optn est déphosphorylée au cours des phases tardives de la mitose (anaphase, télophase, cytokinèse). Optn étant elle-même associée au complexe

phosphatase MYPT1-PP1 β , il serait intéressant de regarder si Optn est un des substrats de cette phosphatase. Pour tester cette hypothèse, on pourrait entreprendre par exemple une expérience de déphosphorylation *in vitro* d'Optn (immunoprécipitée à partir de lysats de cellules mitotiques traitées par le nocodazole) par MYPT1-PP1 β . Il serait également intéressant d'invalider l'expression de MYPT1 par ARN interférent, de synchroniser les cellules en phase G1/S par un double blocage à la thymidine et d'analyser le niveau de phosphorylation d'Optn 12 heures après l'élimination de la thymidine en excès.

Deuxièmement, on peut supposer que la forme phosphorylée d'Optn est dégradée en fin de mitose par le protéasome et que la forme d'Optn non phosphorylée, observée 12 heures après l'élimination de la thymidine, correspond à la protéine néo-synthétisée. Cette hypothèse pourrait être évaluée en utilisant un inhibiteur du protéasome (par exemple la lactacystine) et en mesurant le niveau de phosphorylation d'Optn 12 heures après sevrage en thymidine.

2. Optineurine est-elle un substrat des autres Polo-like kinases ?

Nous avons montré par plusieurs approches différentes qu'Optn était un substrat direct de Plk1.

En effet, la déplétion de Plk1 par ARN interférent, ou l'inhibition de son activité par le BI 2536, abolit la phosphorylation d'Optn dans des cellules bloquées en mitose par le nocodazole. Précisons cependant que le BI 2536 affecte également l'activité de Plk2 et plus faiblement celle de Plk3 (Steegmaier et al., 2007).

Nous avons également vérifié que cette phosphorylation était spécifique de Plk1. Comme je l'ai indiqué dans l'introduction, cinq membres appartenant à la famille des Polo-like kinases (Plk1-5) ont été décrits chez les mammifères (de Carcer et al., 2011). Nous avons donc surexprimé en parallèle Plk1, Plk2, Plk3 et Plk4 (Plk5 n'avait pas encore été identifié) dans des cellules 293T. Cette expérience a montré que Plk2 et Plk3 (mais pas Plk4) étaient également capables de phosphoryler Optn. La phosphorylation d'Optn sur la sérine 177 semble cependant plus intense lorsque Optn est surexprimée avec Plk1. Toutefois, une meilleure façon de quantifier d'éventuelles différences de phosphorylation d'Optn serait d'effectuer des expériences de phosphorylation *in vitro* d'Optn par les différentes Polo-like kinases recombinantes.

En conclusion, on ne peut pas exclure totalement qu'en plus d'être phosphorylée par Plk1, Optn soit également un substrat de Plk2 et Plk3.

De façon intéressante, Josina Filipe avait remarqué que la sérine 177 d'Optn – qui appartient donc à la séquence consensus de phosphorylation par Plk1 – fait également partie d'une autre séquence consensus de phosphorylation, celle reconnue par TBK1 (TANK-Binding Kinase 1), une kinase impliquée dans la réponse immunitaire. Cette observation suggérait que le résidu sérine 177 pouvait être phosphorylé par une autre kinase que Plk1. Des expériences de phosphorylations *in vitro* d'Optn par TBK1 nous avaient permis de confirmer cette hypothèse. La phosphorylation d'Optn par TBK1 a par la suite été publiée par deux autres équipes (Wild et al., 2011 ; Gleason et al., 2011).

Je reviendrai plus tardivement au cours de cette discussion sur les différentes conséquences de la phosphorylation de la sérine 177 par TBK1 pour la fonction et la localisation d'Optn.

II. Effets de la phosphorylation d'Optineurine par Plk1 sur sa localisation subcellulaire

1. Dissociation d'Optineurine de l'appareil de Golgi

Dans le modèle que nous proposons, la phosphorylation d'Optn par Plk1 pendant la mitose abolit son interaction avec Rab8, sa protéine d'ancrage au niveau de l'appareil de Golgi, permettant sa dissociation de l'appareil de Golgi puis sa translocation nucléaire. Ce modèle est basé sur nos propres observations, mais également sur des résultats publiés auparavant.

Dans des cellules interphasiques, plusieurs études ont montré qu'Optn était localisée essentiellement au niveau de l'appareil de Golgi (Schwamborn et al., 2000 ; Hattula and Peränen, 2000).

Un modèle développé par le laboratoire de Folma Buss suggère que Rab8 est la protéine qui permet l'ancrage d'Optn à l'appareil de Golgi (Sahlender et al., 2005). Plusieurs données soutiennent cette hypothèse.

Premièrement, il a été montré qu'Optn interagissait avec la forme sauvage et la forme constitutivement active de Rab8 (Q67L) mais pas avec une forme dominante négative (T22N) (Hattula and Peränen, 2000). Le domaine d'interaction d'Optn avec Rab8 a été cartographié et comprend la région entre les acides aminés 141 et 209 d'Optn.

Deuxièmement, d'autres études ont montré qu'Optn colocalisait avec Rab8 au niveau de l'appareil de Golgi (Sahlender et al., 2005 ; Kachaner et al., 2012). En effet, alors qu'Optn exogène a une localisation diffuse autour du noyau, sa co-expression avec Rab8 induit une colocalisation des deux protéines au niveau d'une structure périnucléaire s'apparentant à l'appareil de Golgi.

Des expériences supplémentaires sont toutefois requises pour confirmer que Rab8 est la protéine d'ancrage d'Optn à l'appareil de Golgi, comme par exemple l'effet de la déplétion de Rab8 par ARN interférent sur la localisation cellulaire d'Optn.

Nous avons également observé que le domaine d'interaction entre Rab8 et Optn (141-209) incluait la sérine 177, le site de phosphorylation par Plk1. Nous avons voulu déterminer si la phosphorylation d'Optn par Plk1 pouvait moduler son interaction avec Rab8. Une expérience de co-immunoprécipitation nous a permis de montrer que la forme d'Optn

phosphorylée par Plk1 ne pouvait plus interagir avec Rab8. De plus, la surexpression de Plk1 induit une relocalisation d'Optn dans le noyau sans affecter la localisation golgienne de Rab8. L'ensemble de ces résultats montre que la phosphorylation d'Optn par Plk1 abolit son interaction avec Rab8.

Dans notre modèle, nous proposons qu'Optn est phosphorylée par Plk1 en mitose, ce qui a pour conséquence sa dissociation de Rab8 et son détachement de l'appareil de Golgi.

Une hypothèse alternative est cependant possible. On peut effectivement supposer que dans les cellules en interphase, il existe deux fractions d'Optn : une fraction cytosolique et une fraction localisée à l'appareil de Golgi par son interaction avec Rab8. Au cours de la mitose, l'équilibre dynamique entre ces deux fractions pourrait être perturbé par la capacité de Plk1 de phosphoryler la fraction cytosolique d'Optn, empêchant l'interaction de cette fraction avec Rab8. En conséquence, la phosphorylation d'Optn par Plk1 pourrait favoriser l'accumulation de la fraction cytoplasmique, qui serait alors transportée dans le noyau pendant la mitose.

2. Import d'Optineurine dans le noyau

Comment Optn est-elle transportée dans le noyau en début de mitose une fois dissociée de l'appareil de Golgi ?

Une des possibilités pourrait être qu'Optn présente une ou des séquences de localisation nucléaire (NLS). Une analyse bioinformatique ne nous a cependant pas permis d'identifier la présence de ces séquences.

Alternativement, Optn pourrait être transportée dans le noyau par l'un de ces partenaires d'interactions. Un des candidats potentiels pourrait être Myosine VI, dont la localisation nucléaire a déjà été mise en évidence dans les cellules de mammifères où elle colocalise avec les transcrits nouvellement synthétisés et l'ARN polymérase II (Vreugde et al., 2006). Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer par immunofluorescence si l'inactivation de l'expression de Myosine VI affecte la localisation nucléaire d'Optn dans des cellules mitotiques.

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse des interactants d'Optn nous a permis d'identifier NORPEG (RAI14) comme un partenaire potentiel d'Optn. Bien que la fonction de cette protéine soit toujours inconnue, l'analyse de sa séquence en acides aminés a permis l'identification de plusieurs séquences potentielles d'import nucléaire (NLS) et d'une

séquence d'export nucléaire (NES) (Kutty et al., 2006). Il a notamment été montré qu'au moins une de ces séquences d'import était fonctionnelle : une protéine de fusion GFP-NORPEG (2-287 aa) est majoritairement nucléaire alors que la mutation de ce NLS inhibe son accumulation dans le noyau. Des expériences d'immunofluorescence indiquent également que la localisation subcellulaire de NORPEG dépend de la densité cellulaire. NORPEG est majoritairement nucléaire dans des cellules non confluentes et cytoplasmique dans des cultures cellulaires confluentes. Cette étude n'a pas exploré si la localisation différentielle de NORPEG pouvait varier au cours du cycle cellulaire. Si cela était le cas, NORPEG pourrait être un bon candidat pour réguler l'import nucléaire d'Optn en début de mitose. Pour tester cette hypothèse, nous devrions valider premièrement l'interaction entre Optn et NORPEG par des expériences de co-immunoprécipitation. Nous pourrions également évaluer par immunofluorescence si ces deux protéines colocalisent au cours du cycle cellulaire et tester l'effet de l'inactivation de l'expression de NORPEG par ARN interférent sur la localisation d'Optn pendant la mitose.

Au cours d'un stress génotoxique, la protéine NEMO, qui possède une forte homologie de séquence avec Optn, est sumoylée au niveau de deux résidus lysines en position 277 et 309. Cette modification permet l'accumulation de NEMO dans le noyau où elle subit des modifications post-traductionnelles aboutissant *in fine* à l'activation de NF- κ B lors d'un stress génotoxique (Huang et al., 2003). Un de ces résidus lysine est conservé dans la séquence d'Optn et correspond également à un site consensus de sumoylation. Il serait par conséquent intéressant d'examiner si Optn est sumoylée pendant la mitose et si cette sumoylation entraîne une localisation nucléaire d'Optn comme dans le cas de NEMO.

3. Export nucléaire d'Optineurine

Une séquence consensus d'export nucléaire (NES) riche en résidus leucine (L-X-X-V-X-X-L-X-L) a été identifiée dans la séquence d'Optn. Ce NES putatif est localisé dans le domaine « Insert », entre les acides aminés 158-166 d'Optn, en amont du résidu sérine 177 phosphorylée par Plk1 en mitose.

Les protéines cytoplasmiques qui contiennent un NES transitent continuellement entre le cytoplasme et le noyau. Dans les cellules en interphase, l'export d'Optn hors du noyau serait favorisé, lui permettant d'interagir avec Rab8 au niveau de l'appareil de Golgi. Pendant la mitose, la phosphorylation d'Optn par Plk1 pourrait masquer cette séquence NES favorisant

son accumulation dans le noyau. La phosphorylation pourrait aussi permettre l'interaction d'Optn avec une protéine nucléaire qui la retiendrait dans le noyau.

Pour valider la fonctionnalité de ce NES, il serait pertinent de muter par mutagenèse dirigée les différentes leucines composant ce NES potentiel et d'examiner ensuite, dans des cellules interphasiques, si l'on augmente la proportion d'Optn nucléaire. Une autre approche possible consisterait à examiner la localisation subcellulaire d'Optn à la suite d'un traitement des cellules avec de la leptomycine B, une drogue capable d'inhiber l'export des protéines portant ces motifs de transport NES (Wolff et al., 1997).

III. Optineurine interagit avec le complexe myosine phosphatase MYPT1-PP1 β

Afin d'appréhender un rôle d'Optn au cours de la mitose, nous avons entrepris d'identifier d'éventuels partenaires impliqués dans le cycle cellulaire par une approche protéomique par TAP-Tag (Tandem Affinity Purification method) (Burckstummer et al. 2006).

Cette analyse, réalisée en collaboration avec le laboratoire de Giulio Superti-Furga (CeMM, Vienne), nous a permis d'identifier MYPT1 et PP1 β , deux des trois sous-unités du complexe myosine phosphatase (MP), comme partenaires d'Optn.

1. Le complexe myosine phosphatase

Le complexe myosine phosphatase est en effet composé de la sous-unité catalytique PP1 β (Protein Phosphatase 1 β), de la sous-unité régulatrice MYPT1 (Myosin phosphatase-targeting subunit 1), et d'une dernière petite sous-unité M20, dont la fonction est inconnue (Matsumura and Hartshorne, 2008).

La sous-unité MYPT1 fonctionne comme une véritable plate-forme d'interaction qui permet le recrutement de nombreux ligands, qu'il s'agisse de substrats de PP1 β (comme par exemple Myosine II) ou bien de simples interactants (comme RhoA, M-RIP, ou PAR-4) (Ito et al., 2004 ; Vetterkind et al., 2010). D'ailleurs, précisons que M-RIP et PAR-4 avaient été identifiés dans notre crible par protéomique comme partenaires d'Optn.

Le premier substrat du complexe phosphatase à avoir été identifié est Myosine II, une protéine qui joue un rôle fondamental dans les mécanismes de contraction musculaire. Puis d'autres substrats ont été trouvés, parmi lesquels MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) ou encore le répresseur transcriptionnel HDAC7 (Histone deacetylase 7), indiquant que cette holoenzyme est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires que la régulation de l'appareil contractile.

Différents travaux ont montré que le complexe phosphatase est un régulateur de la division cellulaire.

Au cours de la cytokinèse, Myosine II constitue le moteur de l'anneau contractile. Son activité motrice nécessite sa phosphorylation par les kinases Citron, ROCK1 et ROCK2. Or MYPT1-

PP1 β déphosphoryle et inactive Myosine II. Les kinases ROCK1 et ROCK2 sont d'ailleurs capables de phosphoryler et d'inhiber MYPT1, ce qui empêche PP1 β de déphosphoryler Myosine II et permet une cytokinèse efficace (Lowery et al., 2007 ; Matsumura and Hartshorne, 2008). Ces observations suggèrent que le complexe myosine phosphatase MYPT1-PP1 β doit être inactivé au cours de la cytokinèse, entraînant une augmentation de la phosphorylation de Myosine II et la contraction de l'anneau d'actomyosine.

Par ailleurs, plus récemment, Yamashiro et ses collaborateurs ont identifié Plk1, le régulateur clé de la mitose, comme étant un nouveau substrat de MYPT1-PP1 β et montré que, pendant la mitose, MYPT1-PP1 β déphosphoryle et inactive Plk1, étape nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire.

Optn étant elle-même un substrat de Plk1, il nous a paru intéressant d'évaluer si Optn pouvait être impliquée dans l'inactivation de Plk1 par le complexe phosphatase.

2. Cartographie du domaine d'interaction d'Optineurine avec MYPT1

Nous avons pu valider par des approches biochimiques l'interaction d'Optn avec MYPT1 et PP1 β . Comme je l'ai déjà mentionné, la plupart des interactants connus de ce complexe sont associés directement à MYPT1. Nous avons pu montrer par des expériences de co-immunoprécipitation que l'interaction entre Optn et PP1 β dépendait de MYPT1. Cependant nous n'avons pas démontré formellement une interaction directe entre MYPT1 et Optn. Une expérience supplémentaire d'interaction *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes permettrait de valider ce modèle d'interaction directe.

Partant de cette hypothèse, nous avons voulu cartographier le domaine d'interaction d'Optn avec MYPT1. MYPT1 possède dans sa partie C-terminale un domaine Leucine Zipper qui lui permet de s'associer avec PAR-4 via une interaction homotypique LZ-LZ (Vetterkind et al., 2010). Optn possédant également un Leucine Zipper au sein de son domaine « Insert », nous avons muté deux de ces résidus leucines en proline pour déstabiliser ce motif. Nos expériences indiquent que l'interaction entre ce mutant (Optn LL/PP) et MYPT1 est fortement diminuée suggérant que ce motif est requis pour l'association des deux protéines. On ne peut toutefois pas exclure que ces mutations de deux leucines en proline, un acide aminé qui a une conformation particulière, induisent un changement conformationnel global

de la protéine affectant sa capacité à interagir avec MYPT1. Cette interaction LZ-LZ ne pourrait véritablement être vérifiée que par cristallographie.

3. MYPT1 régule-t-elle la localisation nucléaire d'Optineurine en début de mitose ?

Différentes études ont montré que MYPT1 a une localisation aussi bien cytoplasmique que nucléaire (Matsumura and Hartshorne, 2008). Dans des cellules mitotiques, MYPT1 est principalement localisée aux centrosomes et aux kinétochores pendant la prophase et la métaphase puis au niveau du fuseau central en anaphase et en télophase (Yamashiro et al., 2008 ; Archambault et al., 2008).

Par ailleurs, l'analyse de la séquence en acides aminés de MYPT1 a permis d'identifier plusieurs NLS fonctionnels, présents dans la région N- et C-terminale de la protéine (Wu et al., 2005).

Dans les cellules interphasiques, le complexe Optn/MYPT1 pourrait ainsi être retenu au niveau de l'appareil de Golgi par son interaction avec Rab8. Puis, la phosphorylation d'Optn par Plk1 en début de mitose permettrait le détachement d'Optn/MYPT1 de l'appareil de Golgi et, grâce aux NLS de MYPT1, la localisation nucléaire d'Optn. Pour tester ce modèle, il serait intéressant d'évaluer par des expériences d'immunofluorescence si l'inactivation de l'expression de MYPT1, dans des cellules synchronisées en phase G2/M, bloque l'import nucléaire d'Optn.

IV. Optineurine est un régulateur négatif de l'activité de Plk1 pendant la mitose

La phosphorylation de Plk1 sur sa thréonine 210 reflète son activité catalytique (Qian et al., 1999 ; Lindon and Pines, 2004 ; Macurek et al., 2008). En conséquence il est possible de quantifier simplement l'activité de Plk1 par Western Blot avec un anticorps anti-phosphospécifique (α -pT210 Plk1).

Nous avons pu montrer que l'inactivation de l'expression d'Optn dans des cellules mitotiques entraînait une augmentation de la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210. Par ailleurs, des réactions kinases *in vitro* ont permis de confirmer que l'activité de Plk1 était augmentée dans des cellules mitotiques déplétées pour Optn. L'ensemble de ces données nous a permis de conclure que, tout comme MYPT1, Optn est un régulateur négatif de Plk1.

1. Optineurine et le complexe myosine phosphatase font partie d'une même voie d'inactivation de Plk1

Les travaux de Yamashiro et ses collaborateurs ont montré que la phosphorylation de MYPT1 par Cdk1 pendant la mitose permettait son interaction avec Plk1 et la déphosphorylation inhibitrice de Plk1 par PP1 β .

Plusieurs de nos résultats montrent qu'Optn intervient dans ce mécanisme de régulation de Plk1 par MYPT1- PP1 β :

- la déplétion d'Optn abolit l'interaction entre MYPT1 et Plk1 dans les cellules mitotiques
- la déplétion d'Optn inhibe la phosphorylation de MYPT1 sur son site de phosphorylation par Cdk1
- Optn interagit avec Cdk1

Par ailleurs, la reconstitution de cellules déplétées pour Optn avec un mutant d'Optn incapable d'être transporté dans le noyau ne restaure pas la phosphorylation de MYPT1 et la régulation négative de Plk1.

Basé sur ces résultats, nous proposons le modèle suivant : au cours de la transition G2/M, Plk1 phosphoryle Optn et induit sa translocation nucléaire. Dans le noyau, Optn complexé avec MYPT1-PP1 β permet la phosphorylation de MYPT1 par Cdk1. Cette

phosphorylation induit l'interaction de MYPT1 avec Plk1 et la déphosphorylation de cette dernière par PP1 β .

Plusieurs expériences sont néanmoins nécessaires pour confirmer notre modèle.

Nous avons observé par une expérience de co-immunoprécipitation qu'Optn interagit avec Cdk1 aussi bien dans des cellules asynchrones que dans des cellules bloquées en prométaphase par le nocodazole. Cependant nous n'avons pas déterminé s'il s'agit d'une interaction directe. Une expérience supplémentaire d'interaction *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes permettrait de valider ce modèle d'interaction directe.

Dans notre modèle, MYPT1, PP1 β , Optn, Cdk1 et Plk1 font partie d'un même complexe. L'existence de ce complexe est difficile à valider *in vitro*. Toutefois, des expériences de fractionnement cellulaire dans des cellules mitotiques nous permettraient de savoir si toutes ces protéines sont présentes dans au moins une fraction commune.

2. A quel moment de la mitose a lieu la régulation négative de Plk1 ?

Pour déterminer à quelle phase de la mitose a lieu la régulation négative de Plk1 par Optn, nous avons comparé par immunofluorescence l'intensité de la phosphorylation de la thréonine 210 de Plk1 de cellules contrôles par rapport à des cellules stablement déplétées pour Optn. Nous avons ainsi observé que la déplétion d'Optn résultait en une augmentation de la phosphorylation de Plk1 dans chacune des phases du cycle, de la prophase à la cytokinèse. Ces résultats ne nous ont pas clairement permis d'identifier à quelle phase de la mitose a lieu cette régulation. Deux possibilités sont envisageables :

- la régulation négative de Plk1 par Optn pourrait intervenir uniquement lors de l'initiation de la mitose (par exemple en prophase) limitant ainsi une activation trop importante de Plk1 tout au long de la mitose (métaphase, anaphase, télophase, cytokinèse).
- Optn pourrait agir tout au long de la mitose, inhibant Plk1 au cours de chacune des phases.

Si l'on considère que Cdk1 est inactivée en anaphase suite à la dégradation de la cycline B, la régulation de Plk1 par Optn via Cdk1 et MYPT1-PP1 β ne peut en conséquence plus avoir lieu après l'anaphase. On peut toutefois imaginer qu'Optn interagit avec une ou plusieurs autre(s) kinase(s) capables de phosphoryler MYPT1, et maintient par conséquent une inhibition de Plk1 même en absence de Cdk1.

Comme modèle alternatif, Plk1 pourrait, par un mécanisme d'auto-initiation, phosphoryler MYPT1 et générer son motif d'ancrage, maintenant ainsi son inhibition dans les étapes tardives de la mitose.

3. Optineurine, un régulateur négatif d'Aurora A ?

Nous avons montré que la déplétion d'Optn entraînait une augmentation de phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210, concluant qu'Optn est un régulateur négatif de Plk1.

Nos résultats montrent qu'Optn agit en aval de l'activation de Plk1 en favorisant sa déphosphorylation par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β .

Nous n'avons toutefois pas testé si Optn agissait également en amont de l'activation de Plk1, en inhibant la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210 par la kinase activatrice Aurora A (Macurek et al., 2008 ; Seki et al., 2008).

Optn pourrait agir sur l'expression ou sur l'activité d'Aurora A. Pour tester ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier l'effet de la déplétion d'Optn sur l'expression d'Aurora A dans des cellules mitotiques, ou sur l'activité d'Aurora A par des réactions kinases *in vitro*.

V. Conséquences fonctionnelles de la déplétion d'Optineurine au cours de la mitose

1. La déplétion d'Optineurine génère la formation de cellules multinucléées

Nos résultats montrent clairement que la déplétion d'Optn entraîne des anomalies de ségrégation des chromosomes et des défauts de cytokinèse aboutissant à la formation de cellules plurinucléées.

Par des expériences d'immunofluorescence, j'ai pu montrer qu'environ 10% des cellules invalidées de façon stable pour l'expression d'Optn sont multinucléées alors qu'un faible taux de cellules plurinucléées est observé après inhibition transitoire d'Optn par ARN interférent, suggérant que plusieurs mitoses successives sont nécessaires pour la formation de cellules plurinucléées.

De plus nous avons observés par microscopie en temps réel que les cellules stablement déplétées pour Optn présentaient un pourcentage élevé de cellules mortes au cours de la division. Ces résultats pourraient également suggérer que lorsque la déplétion d'Optn génère des anomalies mitotiques trop importantes, un programme de mort cellulaire de type apoptose est déclenché. Il pourrait donc être intéressant de quantifier le pourcentage d'apoptose des cellules stablement invalidées pour Optn par la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling). Si notre hypothèse s'avère exacte, nous pourrions également évaluer l'effet d'un inhibiteur de l'apoptose, comme le Z-VAD, sur le pourcentage de multinucléation des cellules stablement déplétées pour Optn.

2. Quels sont les mécanismes moléculaires responsables des défauts mitotiques observés dans les cellules déplétées pour Optineurine ?

Nous avons montré que la déplétion d'Optn entraînait une augmentation de la phosphorylation de Plk1 sur la thréonine 210 et une hyperactivité de Plk1. Par ailleurs, une étude a montré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Plk1 (mutant phosphomimétique Plk1 T210D) inhibait la dégradation protéolytique de la kinase et retardait la sortie des cellules de mitose. Ces données suggèrent ainsi que la déphosphorylation du résidu thréonine 210 est requise pour la dégradation de Plk1 en fin de division (Lindon and Pines, 2004).

Il serait ainsi intéressant d'examiner si l'augmentation de la phosphorylation de Plk1, résultant de la déplétion d'Optn, inhibe la dégradation de Plk1 en fin d'anaphase et prolonge la sortie des cellules de mitose.

Par ailleurs, nous avons déjà mentionné que lors de la transition métaphase/anaphase, Plk1 phosphoryle Cep55, une protéine requise pour l'abscission. Cette phosphorylation inhibe le recrutement inapproprié (ou prématuré) de cette protéine au fuseau au cours de l'anaphase. Une fois Plk1 dégradée en fin de mitose, Cep55 n'est plus phosphorylée et interagit ainsi avec la protéine Mklp1, localisée au midbody, ce qui permet l'abscission (Bastos and Barr, 2010). Il pourrait être intéressant de déterminer si le niveau de phosphorylation de Cep55 est augmenté dans les cellules mitotiques invalidées stablement pour l'expression d'Optn et d'examiner si la déplétion d'Optn affecte la localisation de Cep55 au midbody par des expériences d'immunofluorescence. Si cela était le cas, ces résultats pourraient expliquer, du moins en partie, l'effet de la déplétion d'Optn sur la cytokinèse.

VI. Perspectives

Nous avons vu dans l'introduction qu'Optn est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du trafic vésiculaire associée à l'appareil de Golgi, les voies de sécrétion, la protection des cellules contre l'apoptose, la réponse immunitaire innée ou l'autophagie des bactéries intracellulaires. A ces fonctions s'ajoute un rôle régulateur de la mitose.

La participation d'Optn dans ces différents processus biologiques est dépendante de ses modifications post-traductionnelles (phosphorylation sur des résidus distincts), de sa localisation subcellulaire (Golgi versus noyau) et de ses partenaires d'interaction (Rab8, MYPT1/PP1 β , TBK1, ou encore LC3). Ces différents paramètres varient d'ailleurs sous l'influence de stimuli extracellulaires et intracellulaires (virus, bactéries, stress oxydatif) ou selon le contexte cellulaire (progression au cours du cycle).

La connexion entre ces différentes fonctions reste difficile à comprendre. Toutefois, Optn pourrait constituer un lien entre certaines de ces fonctions : par exemple, l'interaction entre Optn et TBK1 qui est impliquée à la fois dans le déclenchement de l'immunité antivirale innée et dans l'élimination des bactéries cytosoliques par l'autophagie (Wild et al., 2011).

Un autre aspect encore inexploré consiste à déterminer si les fonctions d'Optn pourraient être dépendantes l'une de l'autre. En particulier, la phosphorylation et la localisation nucléaire d'Optn au cours de la mitose pourraient interférer avec les autres processus biologiques régulés par Optn. Cette hypothèse sera développée ci-dessous.

1. Régulation du trafic vésiculaire en mitose par Optn ?

Nous avons vu au cours de l'introduction que la fragmentation de l'appareil de Golgi, sous la forme de petites vésicules, était nécessaire pour l'entrée des cellules en mitose (Sütterlin et al., 2002 ; Preisinger et al., 2005). Plk1 participe directement dans ce processus en phosphorylant la protéine golgienne GRASP65 (Golgi Reassembly Stacking Protein 65kDa), entraînant ainsi la dissociation des citernes golgiennes pendant la mitose (Sengupta and Linstedt, 2010).

Plusieurs études suggèrent qu'Optn est un élément structural important de l'appareil de Golgi puisque sa déplétion entraîne la fragmentation vésiculaire de cette organelle (Sahlender et al., 2005 ; Sippl et al., 2011).

Ces données suggèrent que la phosphorylation d'Optn par Plk1 en G2/M suivie de son accumulation nucléaire pourrait participer au processus de fragmentation de l'appareil de Golgi pendant la mitose. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'examiner par immunofluorescence en utilisant un marqueur *in vivo* de l'appareil de Golgi si l'expression de mutants de phosphorylation d'Optn (mutants phosphodéficient Optn S117A ou phosphomimétique Optn S177D) affecte la fragmentation de l'appareil de Golgi dans des cellules asynchrones ou synchronisées en phase G2/M.

Optn est une protéine multifonctionnelle impliquée aussi bien dans la régulation du trafic vésiculaire que dans l'exocytose (Sahlender et al., 2005 ; Bond et al., 2011). Ces deux fonctions dépendent respectivement de la localisation d'Optn à l'appareil de Golgi ou au niveau des vésicules de sécrétion. Ainsi il est très probable que la phosphorylation et la délocalisation d'Optn de ces structures pendant la mitose affectent chacune de ces fonctions.

Plusieurs articles suggèrent que la régulation du trafic vésiculaire est régulée pendant la mitose (Fürthauer and Gonzalez-Gaitan, 2009).

Pour évaluer si le transport de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique est affecté pendant la mitose, nous pourrions examiner le transport de la glycoprotéine VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus-G) dans des cellules synchronisées ou non en phase G2/M. Un mutant thermosensible de cette protéine (ts045) permet de suivre de manière synchronisée toutes les étapes de transport. A température non permissive, un mutant thermosensible de VSV-G (ts045) s'accumule dans le réticulum endoplasmique. A température permissive, la protéine VSV-G transite du réticulum à l'appareil de Golgi pour être ensuite transportée par le flux vésiculaire vers la membrane plasmique.

De manière intéressante, il a été montré que la déplétion d'Optn par ARN interférent inhibe le transport vésiculaire de VSV-G vers la surface cellulaire (Sahlender et al., 2005). Pour évaluer si la phosphorylation d'Optn sur la sérine 177 par Plk1 affecte l'exocytose, nous envisageons d'étudier le transport de la protéine VSV-G dans des cellules qui expriment les mutants de phosphorylation d'Optn (mutants phosphomimétique Optn S177D ou phosphodéficient Optn S177A).

Enfin, nous avons également vu au cours de l'introduction que la déplétion d'Optn par ARN interférent inhibe la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique (Bond et al., 2011). Il serait ainsi intéressant d'évaluer si l'expression des mutants de

phosphorylation d'Optn (Optn S177A ou S177D) module le processus de fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique.

2. Régulation de l'autophagie en mitose par Optn ?

L'autophagie est une voie majeure du catabolisme lysosomal conservée au cours de l'évolution des eucaryotes. A l'échelle cellulaire, l'autophagie permet la dégradation de matériels cytoplasmiques (mitochondrie ou pathogènes intracellulaires par exemple) séquestrés au sein de vésicules à double membrane, les autophagosomes, qui fusionnent avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes.

La régulation de l'autophagie au cours des différentes phases du cycle cellulaire n'a pas été très étudiée. Il a cependant été montré dans les cellules animales que l'autophagie est inhibée au cours de la mitose sans que les mécanismes moléculaires permettant cette inhibition aient été identifiés (Eskelinen et al., 2002).

Nous avons vu dans l'introduction qu'Optn était impliquée dans l'élimination des bactéries intracellulaires par autophagie (Wild et al., 2011). Brièvement, au cours d'une infection par les salmonelles, Optn interagit avec les pathogènes ubiquitinés et est phosphorylée par TBK1 sur la sérine 177. Cette phosphorylation induit son interaction avec LC3 à la surface des autophagosomes, permettant ainsi la dégradation des bactéries cytosoliques.

A partir de ces observations et de mes résultats, nous avons alors émis l'hypothèse que la phosphorylation d'Optn par Plk1 pourrait faire partie d'un mécanisme d'inhibition de l'autophagie des bactéries intracellulaires pendant la mitose.

Mon travail ainsi que les observations du laboratoire d'Ivan Dikic montrent que la localisation d'Optn diffère selon qu'elle est phosphorylée sur la sérine 177 par Plk1 ou TBK1 :

- sa phosphorylation par Plk1 en mitose est responsable de sa localisation nucléaire (Kachaner et al, 2012)
- sa phosphorylation par TBK1 lors de l'autophagie des Salmonelles est responsable de sa localisation au niveau des autophagosomes (Wild et al., 2011).

Nous avons montré que la phosphorylation d'Optn par Plk1 en mitose abolit son interaction avec Rab8, ce qui permet son détachement de l'appareil de Golgi et induit son accumulation nucléaire. A l'inverse, des données non publiées du laboratoire montrent que la phosphorylation d'Optn par TBK1 augmente son interaction avec Rab8.

Les membranes golgiennes participant à la formation de l'autophagosome, on peut imaginer que la phosphorylation d'Optn par TBK1 induit un recrutement massif d'Optn au niveau des membranes golgiennes qui pourraient être ensuite utilisées par la cellule pour la formation des membranes des autophagosomes.

Que pourrait-il se passer au cours d'une infection bactérienne en mitose où deux kinases (TBK1 et Plk1) sont susceptibles de phosphoryler Optn sur la sérine 177 ?

L'analyse d'isoformes d'Optn sur gels bidimensionnels nous a permis d'observer l'apparition d'isoformes différentes d'Optn lorsqu'elle est co-exprimée avec TBK1 ou Plk1 (résultats non publiés). Ces isoformes migrent vers la partie acide du gel et correspondent certainement à des isoformes phosphorylées d'Optn. Ces isoformes sont différentes selon que TBK1 ou Plk1 est exprimée et la co-expression simultanée de TBK1 avec Plk1 empêche l'apparition des isoformes spécifiquement induites par la surexpression de TBK1 seule.

L'ensemble de ces résultats suggère que la phosphorylation d'Optn par Plk1 en mitose pourrait empêcher la phosphorylation d'Optn par TBK1.

Ainsi, au cours d'une infection bactérienne en mitose la phosphorylation d'Optn par Plk1 interférerait avec sa phosphorylation par TBK1 et entraînerait en conséquence sa dissociation des membranes golgiennes puis sa translocation nucléaire. Sa fonction dans l'autophagie des bactéries intracellulaires (dépendante de TBK1) serait inhibée, permettant une prolifération accrue des pathogènes.

Plusieurs expériences sont actuellement en cours dans le laboratoire pour valider cette hypothèse:

1- Nous effectuons des tests de proliférations bactériennes dans des cellules interphasiques ou des cellules synchronisées en mitose pour montrer que l'autophagie des bactéries est inhibée pendant la mitose et par conséquent que leur prolifération est augmentée.

2- Pour pouvoir dissocier les deux fonctions d'Optn au cours d'une infection bactérienne en mitose, nous sommes en train de générer des cellules qui expriment stablement le mutant Optn F178R. La phénylalanine en position 178 d'Optn présente la particularité d'appartenir à la séquence consensus de phosphorylation par Plk1 mais ne fait pas partie de la séquence consensus de phosphorylation par TBK1. Un tel mutant présente donc l'avantage de pouvoir être phosphorylé sur la sérine 177 par TBK1 au cours d'une infection bactérienne mais pas par Plk1 lors de la mitose.

Il sera donc particulièrement intéressant d'évaluer la capacité proliférative des bactéries dans des cellules mitotiques exprimant soit la forme sauvage d'Optn ou bien alors la forme mutante Optn F178R.

Si notre hypothèse s'avère exacte, le mutant Optn F178R ne sera plus dissocié des membranes golgiennes et ne pourra plus être transloqué dans le noyau en début de mitose permettant ainsi l'autophagie des bactéries et limitant ainsi leur prolifération.

BIBLIOGRAPHIE

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Abrieu A, Brassac T, Galas S, Fisher D, Labbé JC, Dorée M. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J. Cell. Sci.* 1998 ; 111:1751–7.

Albagha OME, Wani SE, Visconti MR, Alonso N, Goodman K, Brandi ML, et al. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* 2011 ; 43(7):685–9.

Albagha OME, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* 2010 ; 42(6):520–4.

Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupart MA, Nasmyth K. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell.* 2001 ; 105(4):459–72.

Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ. The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp. Eye Res.* 2009 ; 88(4):837–44.

Alvarez B, Martínez-A C, Burgering BM, Carrera AC. Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature.* 2001 ; 413:744–7.

Andrysik Z, Bernstein WZ, Deng L, Myer DL, Li Y-Q, Tischfield JA, et al. The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 2010 ; 38(9):2931–43.

Ang XL, Seeburg DP, Sheng M, Harper JW. Regulation of postsynaptic RapGAP SPAR by Polo-like kinase 2 and the SCFbeta-TRCP ubiquitin ligase in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 2008 ; 283(43):29424–32.

Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009 ; 10(4):265–75.

Archambault V, Chen F, Glover DM. A bitter PP1 fights the sweet polo. *Mol. Cell.* 2008 ; 30(5):541–2.

Arnaud L, Pines J, Nigg EA. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma.* 1998 ; 107(7):424–9.

Asiedu M, Wu D, Matsumura F, Wei Q. Centrosome/spindle pole-associated protein regulates cytokinesis via promoting the recruitment of MyoGEF to the central spindle. *Mol. Biol. Cell.* 2009 ; 20(5):1428–40.

Asiedu M, Wu D, Matsumura F, Wei Q. Phosphorylation of MyoGEF on Thr-574 by Plk1 promotes MyoGEF localization to the central spindle. *J. Biol. Chem.* 2008 ; 283(42):28392–400.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Bachert C, Linstedt AD. Dual anchoring of the GRASP membrane tether promotes trans pairing. *J. Biol. Chem.* 2010 ; 285(21):16294–301.

Bahassi EM, Hennigan RF, Myer DL, Stambrook PJ. Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene.* 2004 ; 23(15):2658–63.

Bahassi EM, Conn CW, Myer DL, Hennigan RF, McGowan CH, Sanchez Y, et al. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene.* 2002 ; 21(43):6633–40.

Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell.* 1997 ; 91(2):253–62.

Barr FA, Gruneberg U. Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell.* 2007 ; 131(5):847–60.

Bastos RN, Barr FA. Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J. Cell Biol.* 2010 ; 191(4):751–60.

Baumann C, Körner R, Hofmann K, Nigg EA. PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell.* 2007 ; 128(1):101–14.

Belzil VV, Daoud H, Desjarlais A, Bouchard J-P, Dupré N, Camu W, et al. Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging.* 2011 ; 32(3):555.e13–4.

Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, Riparbelli M, Lehmann L, Gatt MK, et al. SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr. Biol.* 2005 ; 15(24):2199–207.

Boddy MN, Russell P. DNA replication checkpoint. *Curr. Biol.* 2001 ; 11(23):R953–6.

Bond LM, Peden AA, Kendrick-Jones J, Sellers JR, Buss F. Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 2011 ; 22(1):54–65.

Brennan IM, Peters U, Kapoor TM, Straight AF. Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS ONE.* 2007 ; 2(5):e409.

Bürkstümmer T, Bennett KL, Preradovic A, Schütze G, Hantschel O, Superti-Furga G, et al. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat. Methods.* 2006 ; 3(12):1013–9.

Burkard ME, Maciejowski J, Rodriguez-Bravo V, Repka M, Lowery DM, Clauser KR, et al. Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol.* 2009 ; 7(5):e1000111.

Burkard ME, Randall CL, Larochele S, Zhang C, Shokat KM, Fisher RP, et al. Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007 ; 104(11):4383–8.

Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT, El-Deiry WS. Silencing of the novel p53 target gene *Snk/Plk2* leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol. Cell. Biol.* 2003 ; 23(16):5556–71.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: Functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle.* 2011 ; 10(14):2255–62.

de Cárcer G, Escobar B, Higuero AM, García L, Ansón A, Pérez G, et al. Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol. Cell. Biol.* 2011 ; 31(6):1225–39.

Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science.* 2007 ; 316(5833):1908–12.

Carmena M, Pinson X, Platani M, Salloum Z, Xu Z, Clark A, et al. The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol.* 2012 ; 10(1):e1001250.

do Carmo Avides M, Tavares A, Glover DM. Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat. Cell Biol.* 2001 ; 3(4):421–4.

Casenghi M, Barr FA, Nigg EA. Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. *J. Cell. Sci.* 2005 ; 118:5101–8.

Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Körner R, Nigg EA. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev. Cell.* 2003 ; 5(1):113–25.

Caviston JP, Zajac AL, Tokito M, Holzbaaur ELF. Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Mol. Biol. Cell.* 2011 ; 22(4):478–92.

Caviston JP, Holzbaaur ELF. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol.* 2009 ; 19(4):147–55.

Caviston JP, Ross JL, Antony SM, Tokito M, Holzbaaur ELF. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 ; 104(24):10045–50.

Cemma M, Kim PK, Brumell JH. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy.* 2011 ; 7(3):341–5.

Chalasan ML, Swarup G, Balasubramanian D. Optineurin and Its Mutants: Molecules Associated with Some Forms of Glaucoma. *Ophthalmic Res.* 2009 ; 42(4):176–84.

Chan EHY, Santamaria A, Silljé HHW, Nigg EA. Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma*. 2008 ; 117(5):457–69.

Chase D, Feng Y, Hanshew B, Winkles JA, Longo DL, Ferris DK. Expression and phosphorylation of fibroblast-growth-factor-inducible kinase (Fnk) during cell-cycle progression. *Biochem. J*. 1998 ; 333:655–60.

Chase D, Serafinas C, Ashcroft N, Kosinski M, et al. The Polo-Like Kinase PLK-1 Is Required for Nuclear Envelope Breakdown and the Completion of Meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis*. 2000 ; 26:26-41.

Chau T-L, Gioia R, Gatot J-S, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle J-P, et al. Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends Biochem. Sci*. 2008 ; 33(4):171–80.

Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2008 ; 9(1):33–46.

Cheng K-Y, Lowe ED, Sinclair J, Nigg EA, Johnson LN. The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J*. 2003 ; 22(21):5757–68.

Chi Z-L, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, et al. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet*. 2010 ; 19(13):2606–15.

Chibalina MV, Roberts RC, Arden SD, Kendrick-Jones J, Buss F. Rab8-optineurin-myosin VI: analysis of interactions and functions in the secretory pathway. *Meth. Enzymol*. 2008 ; 438:11–24.

Cizmecioglu O, Warnke S, Arnold M, Duensing S, Hoffmann I. Plk2 regulated centriole duplication is dependent on its localization to the centrioles and a functional polo-box domain. *Cell Cycle*. 2008 ; 7(22):3548–55.

Clay FJ, McEwen SJ, Bertoncetto I, Wilks AF, Dunn AR. Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1993 ; 90(11):4882–6.

Colanzi A, Corda D. Mitosis controls the Golgi and the Golgi controls mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2007 ; 19(4):386–93.

A B C **D** E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y, Winkles JA. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J. Biol. Chem*. 1995 ; 270(17):10351–7.

Duncan PI, Pollet N, Niehrs C, Nigg EA. Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res*. 2001 ; 270(1):78–87.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Eckerdt F, Yamamoto TM, Lewellyn AL, Maller JL. Identification of a polo-like kinase 4-dependent pathway for de novo centriole formation. *Curr. Biol.* 2011 ; 21(5):428–32.

Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene.* 2005 ; 24(2):267–76.

Elia AEH, Rellos P, Haire LF, Chao JW, Ivins FJ, Hoepker K, et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell.* 2003 ; 115(1):83–95.

Elia AEH, Cantley LC, Yaffe MB. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science.* 2003 ; 299:1228–1231.

Elowe S, Hümmer S, Uldschmid A, Li X, Nigg EA. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev.* 2007 ; 21(17):2205–19.

Engelbert D, Schnerch D, Baumgarten A, Wäsch R. The ubiquitin ligase APC(Cdh1) is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene.* 2008 ; 27(7):907–17.

Eskelinen E-L, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic.* 2002 ; 3(12):878–93.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Fabbro M, Zhou B-B, Takahashi M, Sarcevic B, Lal P, Graham ME, et al. Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev. Cell.* 2005 ; 9(4):477–88.

Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, MacDonald ME. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum. Mol. Genet.* 1998 ; 7(9):1463–74.

Feinstein TN, Linstedt AD. GRASP55 regulates Golgi ribbon formation. *Mol. Biol. Cell.* 2008 ; 19(7):2696–707.

Ferris DK, Maloid SC, Li CC. Ubiquitination and proteasome mediated degradation of polo-like kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 ; 252(2):340–4.

Fode C, Motro B, Yousefi S, Heffernan M, Dennis JW. Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the Drosophila polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 ; 91(14):6388–92.

Fu Z, Malureanu L, Huang J, Wang W, Li H, van Deursen JM, et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* 2008 ; 10(9):1076–82.

Fürthauer M, González-Gaitán M. Endocytosis and mitosis: a two-way relationship. *Cell Cycle*. 2009 ; 8(20):3311–8.

*A B C D E F **G** H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

Gao L, Coope H, Grant S, Ma A, Ley SC, Harhaj EW. ABIN1 protein cooperates with TAX1BP1 and A20 proteins to inhibit antiviral signaling. *J. Biol. Chem.* 2011 ; 286(42):36592–602.

Geetha T, Wooten MW. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett.* 2002 ; 512(1-3):19–24.

Giménez-Abián JF, Sumara I, Hirota T, Hauf S, Gerlich D, la Torre de C, et al. Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* 2004 ; 14(13):1187–93.

Gleason CE, Ordureau A, Gourlay R, Arthur JSC, Cohen P. Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon β . *J. Biol. Chem.* 2011 ; 286(41):35663–74.

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

Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, Nigg EA. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 1995 ; 129(6):1617–28.

Golsteyn RM, Schultz SJ, Bartek J, Ziemiecki A, Ried T, Nigg EA. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila polo* and *Saccharomyces cerevisiae Cdc5*. *J. Cell. Sci.* 1994 ; 107:1509–17.

Gopinathan L, Ratnacaram CK, Kaldis P. Results and Problems in Cell Differentiation. Kubiak JZ, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 365–89.

Goto H, Kiyono T, Tomono Y, Kawajiri A, Urano T, Furukawa K, et al. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Cell Biol.* 2006 ; 8(2):180–7.

Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011 ; 333(6046):1109–12.

Gunawardena RW, Siddiqui H, Solomon DA, Mayhew CN, Held J, Angus SP, et al. Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279(28):29278–85.

A B C D E F G **H** I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Habedanck R, Stierhof Y-D, Wilkinson CJ, Nigg EA. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* 2005 ; 7(11):1140–6.

Hamanaka R, Smith MR, O'Connor PM, Maloid S, Mihalic K, Spivak JL, et al. Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J. Biol. Chem.* 1995 ; 270(36):21086–91.

Hamanaka R, Maloid S, Smith MR, O'Connell CD, Longo DL, Ferris DK. Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila* polo serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ.* 1994 ; 5(3):249–57.

Hanisch A, Wehner A, Nigg EA, Silljé HHW. Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting. *Mol. Biol. Cell.* 2006 ; 17(1):448–59.

Hansen DV, Loktev AV, Ban KH, Jackson PK. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol. Biol. Cell.* 2004 ; 15(12):5623–34.

Hara T, Abe M, Inoue H, Yu L-R, Veenstra TD, Kang YH, et al. Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase. *Oncogene.* 2006 ; 25(4):566–78.

Harhaj NS, Sun S-C, Harhaj EW. Activation of NF-kappa B by the human T cell leukemia virus type I Tax oncoprotein is associated with ubiquitin-dependent relocalization of I kappa B kinase. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282(6):4185–92.

Harjes P, Wanker EE. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* 2003 ; 28(8):425–33.

Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279(36):37211–4.

Hattula K, Peränen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr. Biol.* 2000 ; 10(24):1603–6.

Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters J-M. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 2005 ; 3(3):e69.

Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012 ; 26(3):203–34.

Hiscott J. Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 ; 18(5-6):483–90.

Hoffner G, Kahlem P, Djian P. Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J. Cell. Sci.* 2002 ; 115:941–8.

Holtrich U, Wolf G, Yuan J, Bereiter-Hahn J, Karn T, Weiler M, et al. Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene.* 2000 ; 19(42):4832–9.

Holtrich U, Wolf G, Bräuninger A, Karn T, Böhme B, Rübsamen-Waigmann H, et al. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 ; 91(5):1736–40.

Hornig NCD, Uhlmann F. Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *EMBO J.* 2004 ; 23(15):3144–53.

Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu Z-H, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.* 2003 ; 115(5):565–76.

Hudson JW, Kozarova A, Cheung P, Macmillan JC, Swallow CJ, Cross JC, et al. Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr. Biol.* 2001 ; 11(6):441–6.

Hutterer A, Berdnik D, Wirtz-Peitz F, Zigman M, Schleiffer A, Knoblich JA. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev. Cell.* 2006 ; 11(2):147–57.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Incassati A, Patel D, McCance DJ. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene.* 2006 ; 25(17):2444–51.

Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 ; 2(3):a000158.

Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S, et al. Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol.* 2011 ; 121(4):555–7.

Ito M, Nakano T, Erdödi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol. Cell. Biochem.* 2004 ; 259(1-2):197–209.

A B C D E F G H I **J** K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* 2003 ; 5(2):143–8.

Jackson MW, Agarwal MK, Yang J, Bruss P, Uchiumi T, Agarwal ML, et al. p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J. Cell. Sci.* 2005 ; 118:1821–32.

Jang Y-J, Ma S, Terada Y, Erikson RL. Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277(46):44115–20.

Jang Y-J, Lin C-Y, Ma S, Erikson RL. Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 ; 99(4):1984–9.

Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 ; 12(1):35–48.

Journo C, Filipe J, About F, Chevalier SA, Afonso PV, Brady JN, et al. NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* 2009 ; 5(7):e1000521.

A B C D E F G H I J **K** L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Kachaner D, Filipe J, Laplantine E, Bauch A, Bennett KL, Superti-Furga G, et al. Plk1-Dependent Phosphorylation of Optineurin Provides a Negative Feedback Mechanism for Mitotic Progression. *Mol. Cell.* 2012 ; 45(4):553–66.

Kang D, Chen J, Wong J, Fang G. The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J. Cell Biol.* 2002 ; 156(2):249–59.

Kang YH, Park J-E, Yu L-R, Soung N-K, Yun S-M, Bang JK, et al. Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation. *Mol. Cell.* 2006 ; 24(3):409–22.

Kapoor TM, Lampson MA, Hergert P, Cameron L, Cimini D, Salmon ED, et al. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science.* 2006 ; 311(5759):388–91.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004 ; 432(7015):316–23.

Kauselmann G, Weiler M, Wulff P, Jessberger S, Konietzko U, Scafidi J, et al. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *EMBO J.* 1999 ; 18(20):5528–39.

Kelm O, Wind M, Lehmann WD, Nigg EA. Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277(28):25247–56.

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011 ; 377(9769):942–55.

Kitada K, Johnson AL, Johnston LH, Sugino A. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol. Cell. Biol.* 1993 ; 13(7):4445–57.

Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K-I, Iemura S-I, Natsume T, Kawashima SA, et al. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*. 2006 ; 441(7089):46–52.

Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J. Cutan. Pathol.* 2002 ; 29(6):354–8.

Knodler LA, Celli J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell. Microbiol.* 2011 ; 13(9):1319–27.

Ko MA, Rosario CO, Hudson JW, Kulkarni S, Pollett A, Dennis JW, et al. Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat. Genet.* 2005 ; 37(8):883–8.

Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, et al. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell.* 1998 ; 1(3):371–80.

Kraft C, Herzog F, Gieffers C, Mechtler K, Hagting A, Pines J, et al. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* 2003 ; 22(24):6598–609.

Kumagai A, Dunphy WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*. 1996 ; 273(5280):1377–80.

Kutty RK, Chen S, Samuel W, Vijayasarathy C, Duncan T, Tsai J-Y, et al. Cell density-dependent nuclear/cytoplasmic localization of NORPEG (RAI14) protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 ; 345(4):1333–41.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* 1996 ; 135:1701–13.

Laoukili J, Kooistra MRH, Brás A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* 2005 ; 7(2):126–36.

Laplantine E, Fontan E, Chiaravalli J, Lopez T, Lakisic G, Véron M, et al. NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J.* 2009 ; 28(19):2885–95.

- Lee KS, Grenfell TZ, Yarm FR, Erikson RL. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 ; 95(16):9301–6.
- Lee KS, Erikson RL. Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol. Cell. Biol.* 1997 ; 17(6):3408–17.
- Lee KS, Yuan YL, Kuriyama R, Erikson RL. Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol. Cell. Biol.* 1995 ; 15(12):7143–51.
- Lee KS, Oh D-Y, Kang YH, Park J-E. Self-regulated mechanism of Plk1 localization to kinetochores: lessons from the Plk1-PBIP1 interaction. *Cell Div.* 2008 ; 3:4.
- Lénárt P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, et al. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr. Biol.* 2007 ; 17(4):304–15.
- Leng M, Bessuso D, Jung SY, Wang Y, Qin J. Targeting Plk1 to chromosome arms and regulating chromosome compaction by the PICH ATPase. *Cell Cycle.* 2008 ; 7(10):1480–9.
- Li B, Ouyang B, Pan H, Reissmann PT, Slamon DJ, Arceci R, et al. Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271(32):19402–8.
- Li J, Tan M, Li L, Pamarthy D, Lawrence TS, Sun Y. SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia.* 2005 ; 7(4):312–23.
- Li Y, Kang J, Horwitz MS. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol. Cell. Biol.* 1998 ; 18(3):1601–10.
- Lin CY, Madsen ML, Yarm FR, Jang YJ, Liu X, Erikson RL. Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 ; 97(23):12589–94.
- Lindon C, Pines J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* 2004 ; 164(2):233–41.
- Litvak V, Argov R, Dahan N, Ramachandran S, Amarilio R, Shainskaya A, et al. Mitotic phosphorylation of the peripheral Golgi protein Nir2 by Cdk1 provides a docking mechanism for Plk1 and affects cytokinesis completion. *Mol. Cell.* 2004 ; 14(3):319–30.
- Liu XS, Song B, Liu X. The substrates of Plk1, beyond the functions in mitosis. *Protein Cell.* 2010 ; 1(11):999–1010.
- Liu Y, Allingham RR. Molecular genetics in glaucoma. *Exp. Eye Res.* 2011 ; 93(4):331–9.

Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, Gonzalez C, et al. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1991 ; 5:2153–65.

López-Sánchez I, Sanz-García M, Lazo PA. Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Mol. Cell. Biol.* 2009 ; 29(5):1189–201.

Losada A, Hirano M, Hirano T. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev.* 2002 ; 16(23):3004–16.

Lowery DM, Clauser KR, Hjerrild M, Lim D, Alexander J, Kishi K, et al. Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *EMBO J.* 2007 ; 26(9):2262–73.

Lowery DM, Lim D, Yaffe MB. Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene.* 2005 ; 24(2):248–59.

Lu L-Y, Wood JL, Minter-Dykhouse K, Ye L, Saunders TL, Yu X, et al. Polo-like kinase 1 is essential for early embryonic development and tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.* 2008 ; 28(22):6870–6.

Luo J, Liu X. Polo-like kinase 1, on the rise from cell cycle regulation to prostate cancer development. *Protein Cell.* 2012.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Ma S, Charron J, Erikson RL. Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 2003 ; 23(19):6936–43.

Ma S, Liu M-A, Yuan Y-LO, Erikson RL. The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB. *Mol. Cancer Res.* 2003 ; 1(5):376–84.

Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature.* 2008 ; 455(7209):119–23.

Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, et al. Optineurin negatively regulates the induction of IFN β in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog.* 2010 ; 6(2):e1000778.

De Marco N, Buono M, Troise F, Diez-Roux G. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281(23):16147–56.

Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JDR, Jackson PK. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev. Cell.* 2003 ; 4:813–26.

- Maroto B, Ye MB, Lohneysen von K, Schnelzer A, Knaus UG. P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1. *Oncogene*. 2008 ; 27(36):4900–8.
- Marsh BJ, Howell KE. The mammalian Golgi--complex debates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002 ; 3(10):789–95.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010 ; 465(7295):223–6.
- Matsumura F, Yamakita Y, Yamashiro S. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 controls chromatid segregation. *J. Biol. Chem.* 2011 ; 286(12):10825–33.
- Matsumura F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008 ; 369(1):149–56.
- Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* 2005 ; 15(7):371–7.
- Matsumura S, Toyoshima F, Nishida E. Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282(20):15217–27.
- McInnes C, Mazumdar A, Mezna M, Meades C, Midgley C, Scaerou F, et al. Inhibitors of Polo-like kinase reveal roles in spindle-pole maintenance. *Nat. Chem. Biol.* 2006 ; 2(11):608–17.
- McKenzie L, King S, Marcar L, Nicol S, Dias SS, Schumm K, et al. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle*. 2010 ; 9(20):4200–12.
- Meng Q, Lv J, Ge H, Zhang L, Xue F, Zhu Y, et al. Overexpressed mutant optineurin(E50K) induces retinal ganglion cells apoptosis via the mitochondrial pathway. *Mol Biol Rep.* 2012.
- Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* 2002 ; 21(4):483–92.
- Michou L, Collet C, Laplanche J-L, Orcel P, Cornélis F. Génétique de la maladie de Paget. *Revue du Rhumatisme.* 2006 ; 73(5):422–8.
- Millecamps S, Boillée S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, et al. Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging.* 2011 ; 32(3):557.e11–3.
- Mishima M, Kaitna S, Glotzer M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell.* 2002 ; 2(1):41–54.
- Mondal G, Ohashi A, Yang L, Rowley M, Couch FJ. Tex14, a plk1-regulated protein, is required for kinetochore-microtubule attachment and regulation of the spindle assembly checkpoint. *Mol. Cell.* 2012 ; 45(5):680–95.

Morton S, Hesson L, Peggie M, Cohen P. Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. *FEBS Lett.* 2008 ; 582(6):997–1002.

Moshe Y, Boulaire J, Pagano M, Hershko A. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 ; 101(21):7937–42.

Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA, Nigg EA. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 ; 239(2):377–85.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* 2004 ; 116(2):221–34.

Musacchio A. Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2011 ; 366(1584):3595–604.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Nagabhushana A, Bansal M, Swarup G. Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNF α -induced NF- κ B activation. *PLoS ONE.* 2011 ; 6(3):e17477.

Nagabhushana A, Chalasani ML, Jain N, Radha V, Rangaraj N, Balasubramanian D, et al. Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant. *BMC Cell Biol.* 2010 ; 11:4.

Nakajima H, Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278(28):25277–80.

Neef R, Gruneberg U, Kopajtich R, Li X, Nigg EA, Sillje H, et al. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat. Cell Biol.* 2007 ; 9(4):436–44.

Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, Nigg EA, Mayer TU, et al. Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 2003 ; 162(5):863–75.

Niiya F, Tatsumoto T, Lee KS, Miki T. Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene.* 2006 ; 25(6):827–37.

Nishimura Y, Yonemura S. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J. Cell. Sci.* 2006 ; 119:104–14.

Nishino M, Kurasawa Y, Evans R, Lin S-H, Brinkley BR, Yu-Lee L-Y. NudC is required for Plk1 targeting to the kinetochore and chromosome congression. *Curr. Biol.* 2006 ; 16(14):1414–21.

A B C D E F G H I J K L M N **O** P Q R S T U V W X Y Z

Ohkura H, Hagan IM, Glover DM. The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* 1995 ; 9(9):1059–73.

Oshimori N, Ohsugi M, Yamamoto T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat. Cell Biol.* 2006 ; 8(10):1095–101.

Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B, et al. Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(45):28646–51.

A B C D E F G H I J K L M N O **P** Q R S T U V W X Y Z

Pak DTS. Targeted Protein Degradation and Synapse Remodeling by an Inducible Protein Kinase. *Science.* 2003 ; 302(5649):1368–73.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282(33):24131–45.

Pavicic-Kaltenbrunner V, Mishima M, Glotzer M. Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol. Biol. Cell.* 2007 ; 18(12):4992–5003.

Petronczki M, Lénárt P, Peters J-M. Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell.* 2008 ; 14(5):646–59.

Petronczki M, Glotzer M, Kraut N, Peters J-M. Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev. Cell.* 2007 ; 12(5):713–25.

Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* 2005 ; 15(12):651–8.

Preisinger C, Körner R, Wind M, Lehmann WD, Kopajtich R, Barr FA. Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J.* 2005 ; 24(4):753–65.

Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat. Cell Biol.* 2006 ; 8(3):238–48.

*A B C D E F G H I J K L M N O P **Q** R S T U V W X Y Z*

Qi W, Tang Z, Yu H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol. Biol. Cell.* 2006 ; 17(8):3705–16.

Qian YW, Erikson E, Maller JL. Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *Mol. Cell. Biol.* 1999 ; 19(12):8625–32.

*A B C D E F G H I J K L M N O P **Q** **R** S T U V W X Y Z*

Ralston SH, Albagha OME. Genetic determinants of Paget's disease of bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011 ; 1240:53–60.

Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK. Emil1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell.* 2001 ; 105(5):645–55.

Rezaie T, Sarfarazi M. Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin. *Genomics.* 2005 ; 85(1):131–8.

Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* 2002 ; 295(5557):1077–9.

Rizki A, Mott JD, Bissell MJ. Polo-like kinase 1 is involved in invasion through extracellular matrix. *Cancer Res.* 2007 ; 67(23):11106–10.

Rodrigues-Martins A, Riparbelli M, Callaini G, Glover DM, Bettencourt-Dias M. From centriole biogenesis to cellular function: centrioles are essential for cell division at critical developmental stages. *Cell Cycle.* 2008 ; 7(1):11–6.

Rosasco-Nitcher SE, Lan W, Khorasanizadeh S, Stukenberg PT. Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science.* 2008 ; 319(5862):469–72.

Ruan Q, Wang Q, Xie S, Fang Y, Darzynkiewicz Z, Guan K, et al. Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 2004 ; 294(1):51–9.

*A B C D E F G H I J K L M N O P **Q** **R** **S** T U V W X Y Z*

Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* 2005 ; 169(2):285–95.

Saio T, Yokochi M, Inagaki F. The NMR structure of the p62 PB1 domain, a key protein in autophagy and NF- κ B signaling pathway. *J Biomol NMR.* 2009 ; 45(3):335–41.

Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, Yoshida A, Maruyama H, Kawakami H. Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neurosci Lett*. 2011.

Salaun P, Rannou Y, Prigent C. Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008 ; 617:41–56.

Santamaria A, Neef R, Eberspächer U, Eis K, Husemann M, Mumberg D, et al. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol. Biol. Cell*. 2007 ; 18(10):4024–36.

Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009 ; 28(33):2925–39.

Schwamborn K, Weil R, Courtois G, Whiteside ST, Israël A. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275(30):22780–9.

Scolnick DM, Halazonetis TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*. 2000 ; 406(6794):430–5.

Seeburg DP, Feliu-Mojer M, Gaiottino J, Pak DTS, Sheng M. Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. *Neuron*. 2008 ; 58(4):571–83.

Seki A, Coppinger JA, Jang C-Y, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 2008 ; 320(5883):1655–8.

Sengupta D, Linstedt AD. Mitotic inhibition of GRASP65 organelle tethering involves Polo-like kinase 1 (PLK1) phosphorylation proximate to an internal PDZ ligand. *J. Biol. Chem.* 2010 ; 285(51):39994–40003.

Shimizu-Yoshida Y, Sugiyama K, Rogounovitch T, Ohtsuru A, Namba H, Saenko V, et al. Radiation-inducible hSNK gene is transcriptionally regulated by p53 binding homology element in human thyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 ; 289(2):491–8.

Sillibourne JE, Tack F, Vloemans N, Boeckx A, Thambirajah S, Bonnet P, et al. Autophosphorylation of polo-like kinase 4 and its role in centriole duplication. *Mol. Biol. Cell*. 2010 ; 21(4):547–61.

Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G, Erikson RL. Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1992 ; 12(9):4164–9.

Sippl C, Bosserhoff AK, Fischer D, Tamm ER. Depletion of optineurin in RGC-5 cells derived from retinal neurons causes apoptosis and reduces the secretion of neurotrophins. *Exp. Eye Res.* 2011.

Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, et al. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 ; 234(2):397–405.

Smits VA, Klompmaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2000 ; 2(9):672–6.

Solski JA, Williams KL, Yang S, Nicholson GA, Blair IP. Mutation analysis of the optineurin gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging.* 2012 ; 33(1):210.e9–10.

Somers WG, Saint R. A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Dev. Cell.* 2003 ; 4(1):29–39.

Stegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr. Biol.* 2007 ; 17(4):316–22.

Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 ; 9(8):643–60.

Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF-kappaB mediates tumor necrosis factor alpha-induced expression of optineurin, a negative regulator of NF-kappaB. *PLoS ONE.* 2009 ; 4(4):e5114.

Sumara I, Giménez-Abián JF, Gerlich D, Hirota T, Kraft C, la Torre de C, et al. Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol.* 2004 ; 14(19):1712–22.

Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, et al. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell.* 2002 ; 9(3):515–25.

Sun S-C. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 ; 8(7):501–11.

Sun S-C, Yamaoka S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene.* 2005 ; 24(39):5952–64.

Sunkel CE, Glover DM. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell. Sci.* 1988 ; 89:25–38.

Sütterlin C, Lin CY, Feng Y, Ferris DK, Erikson RL, Malhotra V. Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 ; 98(16):9128–32.

Sütterlin C, Hsu P, Mallabiabarrena A, Malhotra V. Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell.* 2002 ; 109(3):359–69.

Swarup G, Nagabhushana A. Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. *J Biosci.* 2010 ; 35(4):501–5.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett.* 2001 ; 169(1):41–9.

Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis-cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008 ; 20(6):650–60.

Tang Z, Shu H, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC, Yu H. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev. Cell.* 2006 ; 10(5):575–85.

Taniguchi E, Toyoshima-Morimoto F, Nishida E. Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277(50):48884–8.

Tategu M, Nakagawa H, Sasaki K, Yamauchi R, Sekimachi S, Suita Y, et al. Transcriptional regulation of human polo-like kinases and early mitotic inhibitor. *J Genet Genomics.* 2008 ; 35(4):215–24.

Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I, Miki T. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 1999 ; 147(5):921–8.

Taylor WR, Schonthal AH, Galante J, Stark GR. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276(3):1998–2006.

Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, Muhlinen von N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 2009 ; 10(11):1215–21.

del Toro D, Alberch J, Lázaro-Diéguéz F, Martín-Ibáñez R, Xifró X, Egea G, et al. Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell.* 2009 ; 20(5):1478–92.

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature.* 2001 ; 410(6825):215–20.

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* 2002 ; 3(4):341–8.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Uchiumi T, Longo DL, Ferris DK. Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(14):9166–74.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Verhelst K, Carpentier I, Beyaert R. Regulation of TNF-induced NF- κ B activation by different cytoplasmic ubiquitination events. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 ; 22(5-6):277–86.

Vetterkind S, Lee E, Sundberg E, Poythress RH, Tao TC, Preuss U, et al. Par-4: a new activator of myosin phosphatase. *Mol. Biol. Cell.* 2010 ; 21(7):1214–24.

Vitour D, Dabo S, Ahmadi Pour M, Vilasco M, Vidalain P-O, Jacob Y, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J. Biol. Chem.* 2009 ; 284(33):21797–809.

Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, et al. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol. Cell.* 2006 ; 23(5):749–55.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V **W** X Y Z

Wang Y, Satoh A, Warren G. Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J. Biol. Chem.* 2005 ; 280(6):4921–8.

Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, et al. Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO J.* 2003 ; 22(3):569–79.

Warnke S, Kemmler S, Hames RS, Tsai H-L, Hoffmann-Rohrer U, Fry AM, et al. Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 2004 ; 14(13):1200–7.

Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Watanabe N, Hunter T, et al. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF β -TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 ; 101(13):4419–24.

van de Weerd BCM, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle.* 2006 ; 5(8):853–64.

van de Weerd BCM, van Vugt MATM, Lindon C, Kauw JJW, Rozendaal MJ, Klompaker R, et al. Uncoupling anaphase-promoting complex/cyclosome activity from spindle assembly checkpoint control by deregulating polo-like kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 2005 ; 25(5):2031–44.

Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Köbel M, et al. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2004 ; 90(4):815–21.

Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C, Jung K, et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate.* 2004 ; 60(3):240–5.

Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004 ; 430(7000):694–9.

Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science*. 2011 ; 333(6039):228–33.

Willoughby CE, Chan LLY, Herd S, Billingsley G, Noordeh N, Levin AV, et al. Defining the pathogenicity of optineurin in juvenile open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2004 ; 45(9):3122–30.

Wolfe BA, Takaki T, Petronczki M, Glotzer M. Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol*. 2009 ; 7(5):e1000110.

Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol*. 1997 ; 4(2):139–47.

Wu D, Asiedu M, Adelstein RS, Wei Q. A novel guanine nucleotide exchange factor MyoGEF is required for cytokinesis. *Cell Cycle*. 2006 ; 5(11):1234–9.

Wu X, Sun S-C. Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep*. 2007 ; 8(5):510–5.

Wu Y, Murányi A, Erdödi F, Hartshorne DJ. Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants. *J. Muscle Res. Cell. Motil*. 2005 ; 26(2-3):123–34.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Xie S, Wu H, Wang Q, Cogswell JP, Husain I, Conn C, et al. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J. Biol. Chem*. 2001 ; 276(46):43305–12.

Xie S, Xie B, Lee MY, Dai W. Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene*. 2005 ; 24(2):277–86.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Yamaguchi T, Goto H, Yokoyama T, Sillje H, Hanisch A, Uldschmid A, et al. Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol*. 2005 ; 171(3):431–6.

Yamashiro S, Yamakita Y, Totsukawa G, Goto H, Kaibuchi K, Ito M, et al. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev. Cell*. 2008 ; 14(5):787–97.

Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* 1998 ; 12(14):2131–43.

Yang Y, Bai J, Shen R, Brown SAN, Komissarova E, Huang Y, et al. Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions. *Cancer Res.* 2008 ; 68(11):4077–85.

Ying H, Yue BYJT. *Cellular and Molecular Biology of Optineurin*. 1st ed. International Review Of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc; 2012. p. 223–58.

Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene.* 2002 ; 21(54):8282–92.

Yuan Z, Becker EBE, Merlo P, Yamada T, DiBacco S, Konishi Y, et al. Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science.* 2008 ; 319(5870):1665–8.

Yüce O, Piekny A, Glotzer M. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J. Cell Biol.* 2005 ; 170(4):571–82.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Zhao W-M, Seki A, Fang G. Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 2006 ; 17(9):3881–96.

Zhao W-M, Fang G. MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 ; 102(37):13158–63.

Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 2009 ; 183(9):5909–16.

Zhu G, Wu C-J, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha- induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr. Biol.* 2007 ; 17(16):1438–43.

Zhu H, Chang B-D, Uchiumi T, Roninson IB. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle.* 2002 ; 1(1):59–66.

Zimmerman WC, Erikson RL. Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 ; 104(6):1847–52.

Zucchelli S, Marcuzzi F, Codrich M, Agostoni E, Vilotti S, Biagioli M, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) associates with huntingtin protein and promotes its atypical ubiquitination to enhance aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 2011 ; 286(28):25108–17.

ANNEXE

REVUE

Optineurin

A new vision of cell division control

David Kachaner, Emmanuel Laplantine, Pierre Génin, Robert Weil

Cell Cycle, 15 avril 2012

Optineurin

A new vision of cell division control

David Kachaner,^{1,2} Emmanuel Laplantine,¹ Pierre Génin¹ and Robert Weil^{1,*}

¹Institut Pasteur; Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire; CNRS URA 2582; Paris, France;

²Université Pierre et Marie Curie; Cellule Pasteur UPMC; Paris, France

Understanding the precise role played by a protein in a defined biological process can turn out to be a complicated challenge when the protein is involved in numerous and intricate functions. However, it constitutes an absolute requirement if we want to understand and integrate the subtleties of the pathways used by a cell or an organism to respond to external stress in a comprehensive manner. This understanding becomes particularly crucial when mutations of the protein have been linked to human pathologies. Optineurin (Optn, Optic neuropathy inducing) is a protein involved in primary open-angle glaucoma (POAG), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Paget's disease of bone, but it is difficult, from the current literature, to understand how gain or loss of function of this ubiquitously expressed protein might specifically lead to these pathologies. We have focused our attention on this protein, because Optn presents a strong homology in its amino acid sequence and structural organization with NEMO, the central regulatory element of the NF κ B cascade that was cloned in the laboratory. Despite this homology and its implication in the NF κ B pathway in some circumstances, Optn is a Golgi-resident protein with no direct connection to the classical NEMO/IKK complex.¹ To further understand its function, we decided to use a combination of biochemical and genetic in vitro and in cellulo approaches. This work allowed us to uncover an unexpected role for Optn during mitosis. Indeed, we demonstrated that Optn specifically regulates the activity of Polo-like kinase 1 (Plk1), a mitotic kinase playing a key role at each step of cell division.² The precise mechanism involved in this function was assessed

using a proteomic approach that revealed the association of Optn with the myosin phosphatase complex (MYPT1/PP1 β), previously shown to antagonize Plk1 activity.³

Plk1 belongs to a conserved family of serine/threonine protein kinases that play pivotal roles during the cell cycle.⁴ Plk1 regulates several mitotic events during cell division, including G₂/M transition, centrosome maturation, bipolar spindle formation, chromosome segregation, activation of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) and cytokinesis. All these mitotic functions require a precise regulation of Plk1 activity in time and space. Temporal control is achieved by transcriptional regulation, phosphorylation and proteolysis, whereas spatial control is regulated by interactors that target Plk1 to its sites of action. Plk1 expression increases during interphase and peaks during G₂ phase. At mitotic entry, Plk1 is activated by phosphorylation on threonine 210 following synergistic action of Bora and the kinase Aurora A. In contrast, the myosin phosphatase complex MYPT1/PP1 β dephosphorylates Plk1 and inactivates the kinase during the G₂/M phase.

Our work identified Optn as a negative regulator of Plk1 activity.² This negative regulation requires Optn phosphorylation on serine 177 by Plk1 at mitotic entry. This phosphorylation induces the translocation of Optn from the Golgi apparatus to the nucleus (Fig. 1). Subsequently, nuclear Optn promotes phosphorylation of its interacting partner MYPT1 and finally inactivation of Plk1. This study adds to the work of Yamashiro and colleagues which showed

that the phosphorylation of MYPT1 by Cdk1 creates a specific binding motif for the Polo-box domain (PBD) of Plk1, thereby allowing PP1 β , the catalytic subunit of the myosin phosphatase complex, to dephosphorylate Plk1 at Thr210.³ The importance of Optn for the controlled mitotic process was demonstrated by the observation that Optn silencing resulted in increased Plk1 activity, leading to major mitotic defects, such as chromosome separation abnormalities, abscission failure and, eventually, multinucleated cells.

In addition to its mitotic function, Optn has been involved in many other physiological processes: Golgi organization, exocytosis and membrane trafficking events, protection against oxidative stress-induced apoptosis, regulation of agonist-stimulated group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1) signaling, cyst formation, antiviral innate immune response and, more recently, autophagy of *Salmonella enterica*.⁵⁻¹⁰ Interestingly, the function of Optn in the selective autophagy of invading bacteria depends, on one hand, on the interaction of Optn with the ubiquitin-coated bacteria through its ubiquitin-binding domain and, on the other hand, on the phosphorylation of Optn at Ser177, as observed during mitosis.¹⁰ However, in this case, Optn phosphorylation is triggered by TBK1 (Tank-binding kinase 1) and does not lead to the nuclear translocation of Optn. This modification enhances the interaction of Optn with the autophagosomal marker LC3 (light chain 3), promoting the autophagic-dependent clearance of cytosolic *Salmonella*. Further work is required to investigate whether autophagy

*Correspondence to: Robert Weil; Email: rweil@pasteur.fr

Submitted: 03/05/12; Accepted: 03/21/12

<http://dx.doi.org/10.4161/cc.20116>

Comment on: Kachaner D, et al. Mol Cell 2012; 45:553-66; PMID:22365832.

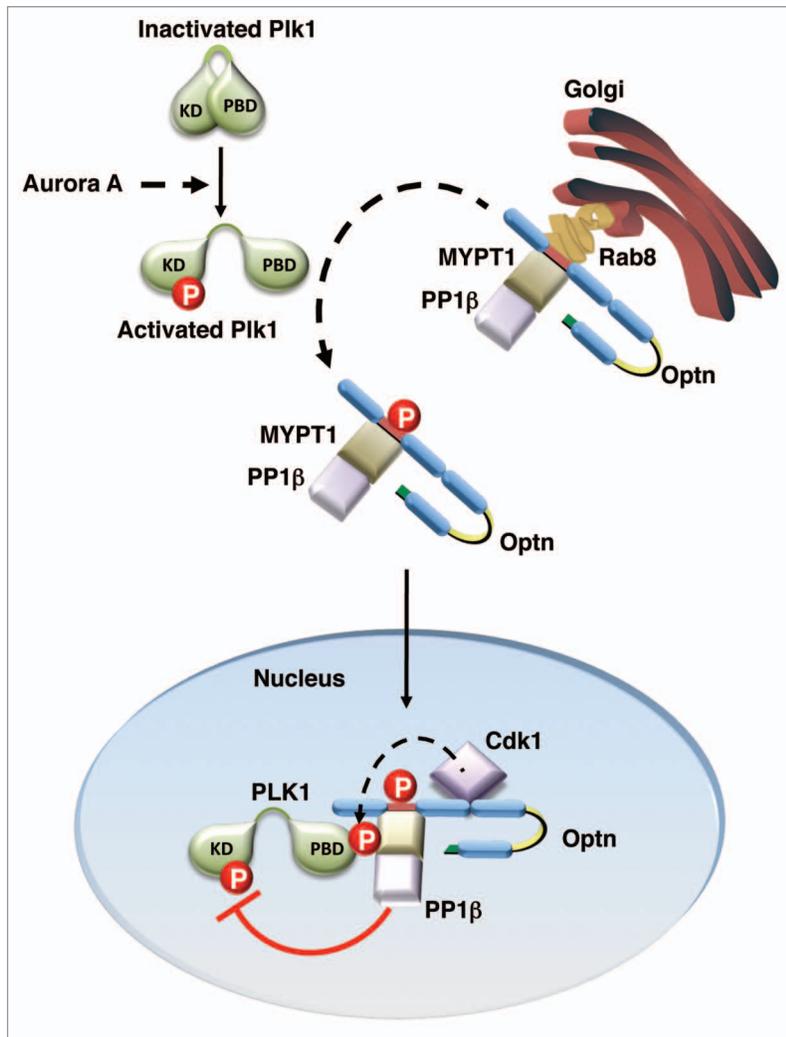


Figure 1. During G₂ phase, Aurora A phosphorylates Plk1 in the kinase domain (KD) at Thr210. Activated Plk1 phosphorylates Optn at Ser177 at the G₂/M transition. This mitosis-specific phosphorylation of Optn induces its dissociation from the Golgi-localized GTPase Rab8 and its translocation into the nucleus. Then, nuclear Optn promotes the phosphorylation of MYPT1 by Cdk1, generating the binding site for the Polo-Box Domain (PBD) of Plk1 and consequently, the dephosphorylation of Plk1 at Thr210 by PP1β.

of intracellular bacteria is affected during mitosis—i.e., when both Plk1 and TBK1 are susceptible to phosphorylate Optn at Ser177—and more generally, how Optn functions are regulated during mitosis.

The mechanisms responsible for primary open-angle glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and Paget’s disease of bone have not been elucidated, and it is therefore a challenging perspective to understand the relationships between the functions of Optn and their involvement in the development of these pathologies.

References

1. Schwamborn K, et al. *J Biol Chem* 2000; 275:22780-9; PMID:10807909; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M001500200>.
2. Kachaner D, et al. *Mol Cell* 2012; 45:553-66; PMID:22365832; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.030>.
3. Yamashiro S, et al. *Dev Cell* 2008; 14:787-97; PMID:18477460; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.013>.
4. Archambault V, et al. *Mol Cell Biol* 2009; 10:265-75.
5. Anborgh PH, et al. *J Biol Chem* 2005; 280:34840-8; PMID:16091361; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M504508200>.
6. De Marco N, et al. *J Biol Chem* 2006; 281:16147-56; PMID:16569640; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M601467200>.
7. Gleason CE, et al. *J Biol Chem* 2011; 286:35663-74; PMID:21862579; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.267567>.
8. Mankouri J, et al. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000778; PMID:20174559; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000778>.
9. Sahlender DA, et al. *J Cell Biol* 2005; 169:285-95; PMID:15837803; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200501162>.
10. Wild P, et al. *Science* 2011; 333:228-33; PMID:21617041; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1205405>.

RESUME

Optineurine (“Optic neuropathy-inducing”, Optn) est une protéine exprimée de façon ubiquitaire chez les vertébrés et impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du trafic vésiculaire associée à l’appareil de Golgi, la réponse immunitaire innée ou l’autophagie des bactéries.

Mon travail de thèse a permis de caractériser une nouvelle fonction d’Optn dans la régulation du cycle cellulaire. Plus précisément, j’ai pu montrer qu’Optn était un régulateur négatif de Polo-like kinase 1 (Plk1), une kinase qui joue un rôle clef dans chacune des étapes de la mitose : de la prophase à la cytokinèse.

L’expression, l’activité et la localisation de Plk1 sont régulées de façon très fine pendant le cycle cellulaire et des cellules provenant d’un grand nombre de cancers présentent une quantité anormalement élevée de Plk1. L’activité de cette kinase est en partie régulée par phosphorylation sur sa thréonine 210. Plk1 est phosphorylée en fin de phase G2 par la kinase Aurora A. Cette phosphorylation induit un changement de conformation de Plk1 qui permet à son domaine Polo-Box d’interagir avec ses substrats et à son domaine kinase de les phosphoryler. En fin de mitose, Plk1 est inactivée par déphosphorylation par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β (Myosin Phosphatase Targeting subunit 1 - Protein Phosphatase 1 β).

Les résultats présentés dans cette thèse montrent qu’Optn est phosphorylée par Plk1 sur la sérine 177 en début de mitose provoquant le détachement d’Optn de l’appareil de Golgi et son accumulation dans le noyau. Nous avons montré que la phosphorylation et la translocation nucléaire d’Optn étaient requises pour permettre la régulation négative de Plk1 par le complexe phosphatase MYPT1-PP1 β au cours de la mitose. Les conséquences fonctionnelles de la déplétion d’Optn et donc de l’hyperactivité de Plk1 sont des défauts de cytokinèse et de ségrégation des chromosomes, aboutissant à l’apparition de cellules plurinucléées. En conclusion, nos résultats mettent en évidence un mécanisme de rétrocontrôle négatif par lequel Plk1 module la localisation d’Optn pendant la mitose pour réguler sa propre activité.