Mécanisme de contrôle de l'entrée en mitose par Polo-like kinase 1 (PlK1)

Lilia Gheghiani

▶ **To cite this version:**

Lilia Gheghiani. Mécanisme de contrôle de l'entrée en mitose par Polo-like kinase 1 (PlK1). Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066385 . tel-01744330

HAL Id: tel-01744330
https://theses.hal.science/tel-01744330

Submitted on 27 Mar 2018

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.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Complexité du vivant

UMR8200-CNRS *Stabilité génétique et oncogenèse*

Équipe de recherche : *Division cellulaire et stabilité génomique*

Mécanismes de contrôle de l'entrée en mitose par

Polo-like kinase 1 (Plk1)

Par Lilia GHEGHIANI

Thèse de doctorat de BIOLOGIE

Dirigée par le Dr Olivier GAVET

Présentée et soutenue publiquement le 19 juillet 2017

Devant un jury composé de :

Pr. Sobczak-Thépot Joëlle,	Présidente
Dr. Pintard Lionel,	Rapporteur
Dr. Lorca Thierry	Rapporteur
Dr. Karess Roger	Examinateur
Dr. Gavet Olivier	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

À tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'avancer dans cette étape.

Science sans conscience n'est que ruine de l'âme. Rabelais

Sommaire

Sommaire 2
Table des figures : 4
Abréviations 6
Introduction 10
Partie I: La transition G2 mitose 11
A. Historique : Concept de cycle cellulaire 11
B. La phase G2 et ses rôles 12
1) Accumulation de protéines nécessaires pour initier l'entrée en mitose 12
2) Terminaison du processus de réplication de l'ADN 13
3) Mise en place de marques épigénétiques et identité cellulaire 14
C. L'entrée en mitose 16
1) Le MPF, un facteur universel conduisant à l'entrée en mitose 16
2) Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1 19
a) Régulation de la quantité de Cycline B 19
- Régulation transcriptionnelle 19
- Dégradation protéique 20
b) Régulation de l'activité de Cdk1 par phosphorylation déphosphorylation 21
- Phosphorylation Thr161 activatrice 22
- Phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et la Tyr15 22
- Déphosphorylation activatrice des résidus Thr14 et la Tyr15 25
c) Distribution subcellulaires de Cycline B1-Cdk1 et ses régulateurs direct 26
3) Cinétique d'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 au cours de la progression G2-Mitose 29
4) Mécanismes de régulation en amont du complexe Cycline B1-Cdk1 30
a) Régulation de l'activité des phosphatases Cdc25A, B& C 31
- Cdc25A 31
- Cdc25B 31
- Cdc25C 32
b) Régulation de l'activité de la kinase Wee1 33
c) Cycline A2-Cdk un activateur de l'entrée en mitose 34
Partie II : Polo-like kinase 1 un régulateur potentiel de l'entrée en mitose 36
A. La famille des Polo-like kinases 36
1) Découverte de la kinase Polo 36
2) Une famille conservée au cours de l'évolution 37
B. Polo-like kinase 1 : organisation structurelle 39
1) Le domaine catalytique 39
2) Le Polo-box domain ou PBD 40
C. Mécanismes de régulation spatio-temporelle de l'activité de Plk1 41
1) Régulation spatio-temporelle 41
a) Localisation subcellulaire de Plk1 41
b) Régulation de la localisation par l'interaction de Plk1 avec ses substrats 41
c) Trois résidus W414, H538 et K540, indispensable pour l'interaction de Plk1 avec ses substrats 43
d) Une séquence NLS contribue à la régulation de la localisation de Plk1 44
2) Régulation du niveau protéique au cours du cycle cellulaire 45
a) Régulation transcriptionnelle 45
b) Régulation de la stabilité protéique 46

3) Régulation de l'activité enzymatique 47
a) Régulation de l'activité catalytique via le PDB 47
b) Activation de Plk1 par phosphorylation de la boucle d'activation 48
c) Les phosphatases opposées à l'activité Plk1 52
4) Cinétique d'activation de Plk1 53

D. Polo-like kinase 1 : activateur de l'entrée en mitose ? 54
1) Cas chez le modèle d'étude *Xenopus laevis* 55
2) Cas chez le modèle d'étude levure *S.pombe* et *S.cerevisiae* 56
3) Cas chez le modèle d'étude de souris 57
4) Cas chez le modèle d'étude de lignées de cellules de mammifères 59
a) Importance au cours d'un cycle non perturbé ? 59
b) Plk1 nécessaire au redémarrage du cycle après un arrêt en phase G2 60

E. Polo-like kinase1 : une cible thérapeutique majeure 62

Résultats 64

Partie I : Méthode de développement de biosenseurs FRET pour l'analyse spatio-temporelle de variations d'activités kinase. 65

Revue 1 : Spatiotemporal Investigation of Phosphorylation Events During Cell Cycle Progression. 71

Partie II : Développement d'un biosenseur FRET spécifique pour l'étude des variations d'activité des kinases Aurora-A et Plk1 au cours de la transition G2/mitose. 72

A. Développement et évaluation d'un biosenseur FRET de la kinase Aurora-A 73

B. Test de la spécificité des constructions pour l'activité Aurora-A 76

C. Étude de la cinétique d'activation d'Aurora-A au cours de la progression G2-mitose 79

Partie III : L'activation de Plk1 en fin de phase G2 déclenche l'entrée des cellules en mitose 81

Article : Plk1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis 83

Discussion 84

A. L'inhibition de l'activité de Plk1 conduit à un arrêt des cellules en mitose 84
1) Étude de l'importance de Plk1 dans le contrôle de l'entrée en mitose des cellules cancéreuses HeLa et non transformées hTERT RPE1 85
2) Étude de l'effet de l'inhibition de Plk1 à long terme 87

B. Suivi de l'activité de Plk1 au cours de la progression G2-mitose 89

C. Les mécanismes moléculaires par lesquelles Plk1 contrôle l'entrée en mitose 92

D. Cycline A2-Cdk, un candidat pour coordonner la réplication du génome et l'entrée en mitose via la régulation de l'activité de Plk1 93

Annexe 96

Bibliographie 97

Table des figures :

Figure 1 : le cycle cellulaire : Composé de 2 étapes : l'interphase composée des phases G1, S (réplication de l'ADN) et G2 ; et la mitose. 11
Figure 2 : L'accumulation des régulateurs de l'entrée en mitose en phase G2 est régulée par de multiples facteurs de transcription. 13
Figure 3 : Phosphorylation de l'histone H3 en phase G2 14
Figure 4 : La découverte de l'activité MPF à partir d'ovocytes de *Rana pipiens*. 16
Figure 5 : Représentation tridimensionnelle du facteur MPF composé de la sous unité régulatrice Cycline B et de la sous unité activatrice Cdk1, adapté de [46]. 17
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de Cdk1 associé à Cks1 adapté de [46]. 18
Figure 7 : Comparaison de la séquence des promoteurs de Cycline B1 et Cycline B2 humaines et de souris. Adapté de [64]. 19
Figure 8 : Régulation de la transcription de l'ARN messager de Cycline B1 au cours des phases du cycle cellulaire. 20
Figure 9 : Régulation de l'activité de l'APC/C et de la dégradation des Cycline mitotique au cours du cycle cellulaire d'après[70] 21
Figure 10 : Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1 chez les mammifères. 26
Figure 11 : Suivi spatio-temporel de Cycline B1 au cours de la transition G2-mitose. 27
Figure 12 : Localisation subcellulaire des régulateurs du complexe Cycline B1-Cdk1 28
Figure 13 : Suivi en temps réel de la cinétique d'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 au cours du cycle cellulaire. 30
Figure 14 : Profil du niveau protéique et d'activité des cdc25s au cours du cycle cellulaire. 33
Figure 15 : Régulateurs potentiels en amont du complexes Cycline B1-Cdk1. 35
Figure 16 : Phénotypes *polo*$^{-1}$ décrits chez *Drosophila Melanogaster*. Images reproduites d'après[206]. 36
Figure 17 : Figure résumant les fonctions des protéines de type Polo de différentes espèces. 38
Figure 18 : Séquences consensus phosphorylées par Plk1 (adapté de [224]) 39
Figure 19 : Alignement de séquence et repliement dans l'espace des Polo-box 1 et 2 (adapté de [233]). 40
Figure 20 : Localisation subcellulaire de Plk1 au cours de la progression G2 mitose (en rouge Plk1 en bleu marquage ADN en vert marquage tubuline) (D'après [246]) 41
Figure 21 : la mono ubiquitinylation de Plk1 au niveau des kinétochores par l'ubiquitine ligase CUL3-KLHL22 conduit à sa délocalisation. (d'après [265]). 43
Figure 22 : Le PDB de Plk1 joue un rôle majeur dans la localisation de la protéine (d'après[267]). 44
Figure 23 : Régulation de la transcription de Plk1 au cours des phases G1et G2. 46
Figure 21 : Cinétique de dégradation de Plk1 en sortie de mitose. 47
Figure 25 : Activation de Plk1 par le co-facteur hBora et la kinase Aurora-A. D'après[282] 50
Figure 26 : Position et séquence consensus du résidu Ser137, et du résidu essentiel pour l'activation de Plk1 Thr210. 51
Figure 27 : Inactivation de Plk1 en mitose par le complexe MYPT1-PP1C. 52
Figure 28 : Fonctions biologiques de Plk1 en mitose. 54
Figure 29 : L'anticorps ant-Plx1 ou l'IgG témoin ont été micro-injecté dans un blastomère d'un embryon à deux cellules, et le développement embryonnaire a été surveillé avec un microscope à dissection (d'après [308]). 55
Figure 30 : Modèle concernant le rôle de Plo1 dans le processus d'activation de CyclineB-Cdc2 et l'entrée en mitose. 57

Figure 31 : Des embryons homozygotes Plk1$^{-/-}$ s'arrêtent de manière très précoce au stade huit cellules en absence de figures mitotiques. 58
Figure 32 : Plk1 est un élément central pour le retour des cellules dans le cycle cellulaire après induction de dommages à l'ADN en phase G2. 61
Figure 33 : Comparaison de l'expression de Plk1 entre cellules humaines cancéreuses de différentes origines et tissu normal d'après [318] 63
Figure 34 : Principe de fonctionnement d'un biosenseur FRET. 67
Figure 35 : Banque plasmidique dédiée au développement d'un biosenseur FRET. 69
Figure 36: Schéma explicatif de la réalisation des différentes formes permutées de Venus. . 70
Figure 37 : Comparaison du signal FRET pour chaque construction sur cellule en interphase et en mitose. 75
Figure 38 : Les variations du signal FRET détectées entre l'interphase et la mitose sont dépendantes de l'état de phosphorylation du site A. 76
Figure 39: Le signal FRET mesuré en mitose est dépendant de l'activité d'Aurora-A et des phosphatases opposées PP1 et/ou PP2A. 78
Figure 40 : Suivi de la cinétique d'activation de la kinase Aurora-A au cours de la progression G2-mitose. 80
Figure 41 : modèle de mécanismes moléculaires contrôlant l'entrée en division. 82
Figure 42 : Effet de l'inhibition de Plk1, à différentes doses, sur la cinétique d'entrée des cellules hTERT RPE-1. 86
Figure 43 : Comparaison de l'effet de l'inhibition de Plk1, à différentes doses, sur la cinétique d'entrée en mitose des cellules HeLa et hTERT RPE-1. 87
Figure 44 : Effet de l'inhibition de Plk^{as} à long terme sur la cinétique d'entrée sur les cellules hTERT RPE-1 *PLK1*$^{-/-}$ GFP-Plk1^{as}. 89
Figure 45 : Comparaison de la cinétique d'activation des kinases Plk1 et Cycline B1Cdk1 au cours de la progression G2-mitose. 91

Abréviations

53BP1	p53 binding protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APC/C	Anaphase-promoting complex/Cyclosome
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
AS	Analogue sensitive
ATP	Adénosine 5'-triphoshate
BLM	Bloom syndrome protein
Brca2	Breast cancer susceptibility protein-2
BrdU	Bromodésoxyuridine
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazoles1
BubR1	Bub1-related protein 1
CAK	Cdk-Activating Kinase
CCNB	Gène codant pour la Cycline B
CDC	Cell Division Cycle
CDE	Cell cycle Dependent Element
Cdh1	Cdc20- homologue 1
CDK	Cyclin Dependente Kinase
CENP	Centromere-Associated protein
Chfr	Checkpoint with forkhead and ring finger domains protein
Chk1/2	Checkpoint Kinase 1/2
CHR	Cell cycle genes Homology Region
CKI	CDK inhibitor
Cks	Cyclin-dependent kinase subunit 1
CRS	Cytoplasmic Retention Signal
C-Tak1	Cdc25C associated protein kinase 1
CUL3	Cullin-based ubiquitin ligases 3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA Damage Response
FHA1/2	phosphothreonine binding forkhead-associated
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FKH-TF	Forkhead Transcription Factors
FoxM1	Forkhead box protein M1
FRA3B	Fragile Site, Aphidicolin Type 3B
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
G1	Gap 1
GFP	Green Fluorescent Protein
H1/3	Histone type 1/3
Hbo1	human histone acetyltransferase binding to Orc1
hBora	Human Protein aurora borealis

HP1	Heterochromatin Protein 1
Hsp90	heat shock protein 90
kDa	kilo dalton
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
Mik1	Mitotic inhibitor kinase 1
MPF	Mitosis Promoting Factor
MYPT1	Myosin phosphatase target subunit 1
Myt1	Myelin transcription factor 1
NES	Nuclear export signal
NF-Y	Nuclear transcription factor Y
NLS	Nuclear localization sequence
Orc2	Origin recognition complex subunit 2
p107	Retinoblastoma-like 1
p130	Retinoblastoma-like 2
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p38	Mitogen-activated protein kinase
p53	Cellular tumor antigen p53
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PBD	Polo Binding Domain
PICH	Plk1-interacting checkpoint helicase
Plk1	Polo-like kinase 1
Pol	Polymerase
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
PRC1	Protein Regulator of Cytokinesis 1
pré-RC	pre-Replicative Complex
RB	Rétinoblastome protein
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
Sak	Serine/threonine-protein kinase PLK4
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
Wee	signifie petit

Avant-propos,

Les cellules qui prolifèrent, répliquent d'abord entièrement leur génome pendant la phase de réplication (phase S) avant la séparation physique de leur matériel génétique en deux ensembles identiques au cours de la mitose. L'une des principales exigences du cycle cellulaire est une coordination étroite entre l'achèvement du processus de réplication et/ou la réparation des dommages de l'ADN, avec l'entrée des cellules en mitose, ceci afin de maintenir l'intégrité génétique essentielle à l'identité et à la survie de la descendance cellulaire. Entre la phase de réplication et la mitose, toutes les cellules somatiques exécutent de manière reproductible une phase intermédiaire, la phase G2, d'une durée de plusieurs heures. Des études ont révélé que la durée de cette phase est constante pendant les divisions cellulaires successives au sein d'un type cellulaire donné. Cependant, les mécanismes moléculaires qui contrôlent précisément sa durée au cours d'un cycle cellulaire non perturbé restent mal caractérisés. Dans ce contexte, l'objectif principal de mon projet de thèse a été de d'élucider les voies de signalisation qui contrôlent la durée de la phase G2 et donc l'entrée en mitose au cours d'un cycle normal. Notre compréhension actuelle des mécanismes qui contrôlent étroitement et précisément la transition vers la mitose souffrent fortement des limitations inhérentes à toute procédure de synchronisation pour les approches biochimiques et à l'absence de résolution spatio-temporelle. Par conséquent, nous avons utilisé des biosensors FRET génétiquement codé (Förster Resonance Energy Transfer) pour analyser la régulation spatio-temporelle des activités kinase et déchiffrer les étapes moléculaires successives qui contrôlent de façon reproductible l'initiation de la division cellulaire au sein de cellules vivantes suivi individuellement. En utilisant cette approche, il a été précédemment

déterminé que la kinase Cycline B1-Cdk1, facteur universel permettant l'entrée en mitose, est soudainement activée en fin de phase G2 et déclenche immédiatement des événements cytoplasmiques et nucléaires qui définissent l'apparition de la prophase. Cette kinase maitresse est sous le contrôle d'un ensemble de régulateurs directs, des kinases inhibitrices (Wee1 et Myt1) et des phosphatases activatrices (Cdc25A, B et C). Son activation soudaine révèle qu'une modification rapide de l'équilibre entre ses régulateurs opposés prend place en fin de phase G2 par des mécanismes moléculaires qui restent à élucider. Dans ce cadre au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle potentiel de la kinase Polo-like kinase 1 (Plk1) pour l'initiation de l'activation de Cycline B1-Cdk1. Plk1 est essentielle lors de la division cellulaire et est impliquée dans la maturation des centrosomes, la cohésion des chromatides sœurs, l'attachement correcte des kinetochores aux microtubules et au cours de la cytocinèse. Plk1 est surexprimé dans de nombreux cancers humains (carcinome colorectal et pulmonaire, cancer du sein et de l'ovaire, gliome et mélanome) et constitue une cible thérapeutique majeure. Bien que ses rôles au cours de la mitose soient bien caractérisés, sa contribution dans la régulation de l'entrée des cellules en mitose reste controversée. En effet, la perturbation de l'activité de Plk1 par ARN interférence ou l'injection d'anticorps anti-Plk1 dans différentes conditions expérimentales a donné des résultats contradictoires avec soit un arrêt prononcé en mitose ou soit un arrêt des cellules en phase G2. Au niveau moléculaire, Plk1 phosphoryle au moins *in vitro*, plusieurs régulateurs de Cycline B1-Cdk1, tels que Cdc25B & C, et Wee1 et Myt1, une manière par laquelle il pourrait contrôler l'entrée des cellules en mitose. Cependant, il reste largement inconnu si ces événements de phosphorylation se produisent *in vivo* et / ou s'ils sont initiés avant ou après l'entrée en mitose et s'ils contribuent de manière significative au processus de l'activation de CyclinB1-Cdk1 permettant l'entrée en mitose.

Introduction

Partie I: La transition G2 mitose

A. Historique : Concept de cycle cellulaire

Les premières observations de la division cellulaire datent d'un siècle et demi. En 1826, Virchow proposa son célèbre postulat « omni cellula e cellula » signifiant que toute cellule naît de la fission d'une cellule préexistante. Ce n'est qu'en 1953 que le concept de « cycle » cellulaire fut proposé par Howard et Pelc. En faisant croitre, des racines de germes de *Vicia faba* en présence de l'isotope P^{32}, ils marquèrent l'ADN nouvellement synthétisé, révélé par autoradiographie[1,2]. Ils montrèrent que l'isotope était incorporé dans l'ADN uniquement durant une période de 6h qu'ils nommèrent phase de synthèse (phase S). Par ailleurs, ils observèrent que cette phase était comprise entre deux phases de délai : une première phase d'une durée de 12h entre la division cellulaire et la réabsorption de l'isotope dans un nouvel ADN synthétisé ; et une seconde phase d'une durée de 8h entre la fin de l'incorporation de l'isotope et la division cellulaire. Ainsi, Howard et Pelc furent les premiers à proposer un découpage du cycle cellulaire en quatre phases avec : une phase de synthèse de l'ADN, qu'ils nommèrent phase S, et une phase de division des cellules ou mitose, comprise entre deux périodes de délai : une phase pré-S appelée la phase G1 et une phase pré-mitotique appelée la phase G2 [1,2] (figure1). Depuis, le concept de cycle cellulaire a fait l'objet de très nombreuses études, et l'utilisation de nombreux modèles tels que les levures, les embryons d'oursins, les ovocytes d'étoiles de mer et d'amphibiens, la mouche, le nématode, ou les cellules de mammifères en culture ont permis l'établissement d'un modèle général de contrôle du cycle cellulaire.

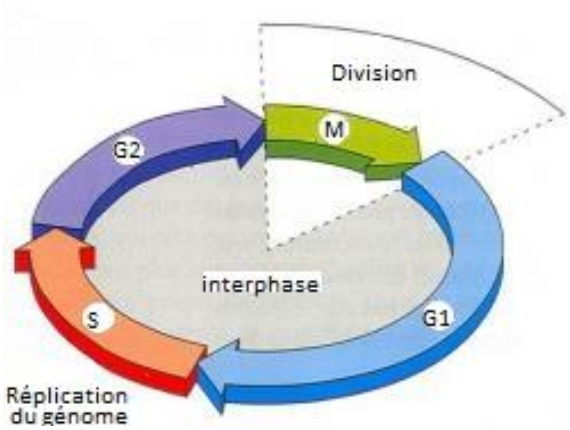


Figure 1 : le cycle cellulaire : Composé de 2 étapes : l'interphase composée des phases G1, S (réplication de l'ADN) et G2 ; et la mitose.

B. La phase G2 et ses rôles

Une exigence majeure de la prolifération cellulaire est le maintien de l'intégrité de l'information génétique, essentiel pour l'identité, la survie et/ou le devenir des cellules filles. Contrairement aux cellules embryonnaires précoces, les cellules somatiques effectuent une phase G2 intermédiaire préparant au processus de division cellulaire. Des travaux récents mettent en évidence que la durée de la phase G2 est relativement constante au cours des cycles cellulaires successifs pour un type cellulaire donné [3]. L'importance de la phase G2 pour le maintien de l'information génétique et/ou épigénétique ainsi que les mécanismes moléculaires contrôlant sa progression, restent très mal caractérisés. Plusieurs rôles ont été proposés :

1) Accumulation de protéines nécessaires pour initier l'entrée en mitose

La phase G2 est une phase au cours de laquelle de nombreuses protéines sont synthétisées, permettant à la cellule de se préparer au processus de division cellulaire. En effet, l'accumulation de différents régulateurs essentiels pour l'entrée et la progression en mitose tels que Cycline B, Plk1, Aurora-A et Cdc25B, mais également des éléments essentiels pour l'assemblage des kinétochores en prophase et la ségrégation des chromosomes en mitose tels que CEMP-F et Aurora-B, est initiée au cours de la transition S/G2[4,5]. L'accumulation de tels régulateurs est corrélée à l'expression des gènes et la détection des ARNm correspondant spécifiquement au cours de la phase G2[6,7]. L'expression de ces gènes est non seulement sous le contrôle d'éléments de régulation internes à leurs promoteurs tel que les éléments CDE/CHR (Cell cycle Dependent Element/ Cell cycle genes Homology Region)[8–10], mais également de facteurs de transcription tels que FoxM1 (Forkhead box protein M1), NF-Y (Nuclear transcription factor Y), B-Myb-E2F, E2F4 et CDF-1[5,9,10]. Alors que les éléments CDE/CHR, CDF-1, E2F4 régulent négativement la transcription en phase G1, les éléments FOXM1, B-Myb-E2F, NF-Y l'activent de spécifiquement en phase G2. Suite à son expression en phase G2, la kinase Polo like kinase 1 (Plk1) participe à l'activation de l'expression de son propre gène en stimulant l'activité du facteur de transcription FoxM1[11]. Cependant, la stimulation de l'activité de FoxM1 par Plk1 requiert un événement d'amorçage dépendant de la pré-phosphorylation par une Cdk[12,13]. Dans ce cadre, il a été montré que FoxM1 est également régulé par une activité Cycline A2-Cdk qui augmente au cours de la

transition S/G2 suggérant ainsi que Cycline A2-Cdk1/2 et Plk1 pourraient collaborer pour activer FoxM1[13,14]. (Résumé figure 2)

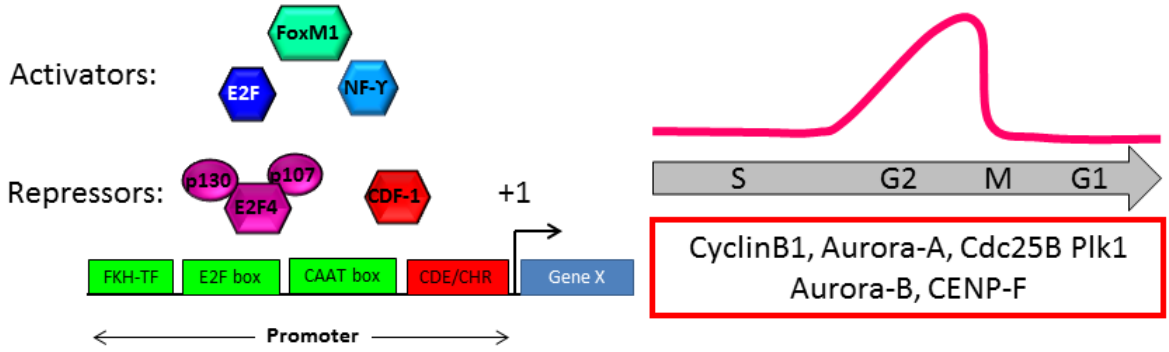


Figure 2 : L'accumulation des régulateurs de l'entrée en mitose en phase G2 est régulée par de multiples facteurs de transcription.

2) Terminaison du processus de réplication de l'ADN

Sous certaines conditions, la phase G2 pourrait permettre de terminer la réplication de certaines régions du génome notamment lors d'un stress réplicatif conduisant à un ralentissement de la machinerie de réplication. En accord avec cette hypothèse, il a été mis en évidence que la machinerie de réplication est toujours compétente en phase G2, dans des cellules possédant un ou plusieurs micronoyaux [15]. Cette réplication tardive, principalement prise en charge par la polymérase Pol η, est exacerbée dans des conditions de stress réplicatif (traitement des cellules avec l'aphidicoline un inhibiteur des polymérases) [15,16]. Parmi les régions du génome dont la réplication pourrait se poursuivre en phase G2 figurent les sites fragiles communs, les régions centromériques et téléomériques, qui sont caractérisées par un faible nombre d'origines de réplication actives [17]. Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence que ces régions possèdent des expansions de répétitions de nucléotides (mini-satellites riches en AT, tri-nucléotides CGG) qui ont la capacité d'adopter des structures secondaires bloquant la progression des fourches de réplication et pouvant ainsi favoriser l'apparition de cassures de l'ADN [18–21]. En accord, Le Beau et collaborateurs furent les premiers à proposer la possibilité d'une réplication tardive en phase G2, en travaillant sur le site fragile FRA3B[22]. Leurs travaux ont permis de proposer que certaines cellules pouvaient entrer en phase G2 (immunomarquage Cycline B) sans avoir achevées leur réplication notamment au niveau du site fragile étudié (FISH + marquage BrdU) [22]. Néanmoins, jusqu'à présent cette réplication tardive a été essentiellement mise en évidence soit en conditions de

stress réplicatif soit au sein de cellules tumorales, ainsi il reste à déterminer si c'est effectivement le cas dans des conditions non perturbées et au sein de cellules non transformées.

3) Mise en place de marques épigénétiques et identité cellulaire

De multiples modifications épigénétiques ont été décrites en phase G2 telles que la méthylation, la déacétylation ou la phosphorylation d'histones, qui pourraient être important pour le maintien de l'intégrité génétique [23-31] [23,24]. Par exemple, Monier et collègues ont montré que la triméthylation de l'histone H3, initié en phase G2, favorise le recrutement de la kinase Aurora-B au niveau des régions centromériques et péri-centromériques[24]. Dans ces conditions, Aurora-B peut alors phosphoryler l'histone H3 sur le résidu Ser10 conduisant à la dissociation du facteur de remodelage de la chromatine Heterochromatin Protein 1 (HP1) (figure 3).

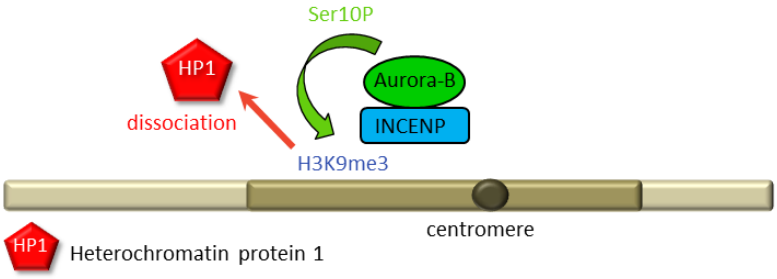


Figure 3 : Phosphorylation de l'histone H3 en phase G2

Une perturbation de ces marques épigénétiques peut conduire à un changement de la topologie de la chromatine, de manière globale ou locale (notamment au niveau des régions centromériques et péri-centromériques), avant l'entrée en mitose [24–26]. En accord, Heit et collaborateurs ont mis en évidence que l'inhibition de la trimethylation de la chromatine au niveau de H3K9 et H4K20, en phase G2 par traitement AdOx, affecte la topologie de l'hétérochromatine péri-centromérique conduisant à l'activation des mécanismes de surveillance en mitose (Spindle Assembly Checkpoint) [23,24]. De manière intéressante, l'inhibition de ces marques épigénétiques peut également conduire, de manière transitoire, à un ralentissement de la progression G2-mitose via l'activation d'un « antéphase checkpoint » dépendant de l'activation des protéine p38 et chfr [27–29]. D'autres expériences de perturbations de ces marques épigénétiques mettent également en évidence une ségrégation incorrecte des chromosomes en mitose, suggérant que celles-ci pourraient être requises pour la topologie de la chromatine centromérique/ou l'assemblage des kinétochores [30,31]. Enfin une autre

possibilité serait que l'inhibition de ces modifications épigénétiques en G2 pourrait perturber l'identité de la descendance cellulaire, mais cette dernière proposition reste à être explorer.

C. L'entrée en mitose

1) Le MPF, un facteur universel conduisant à l'entrée en mitose

C'est dans les années 1960-1970 que fut découvert le facteur universel permettant l'entrée des cellules en mitose. Ce sont les travaux de Masui et collaborateurs réalisés à partir d'ovocytes d'amphibiens *Rana pipiens* qui furent les plus marquants[32]. En effet, leurs expériences ont permis, pour la première fois, l'identification d'un facteur cytoplasmique responsable de la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'émission du premier globule polaire (maturation méiotique) d'un ovocyte arrêté en prophase de première division de méiose (assimilé à la phase G2)[32] (figure 4). Ce facteur provenant d'un ovocyte bloqué en métaphase de deuxième division fut alors nommé Maturation Promoting Factor (ou MPF). Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence que ce facteur était aussi bien requis pour l'entrée en méiose qu'en mitose, il fut donc renommé « M-phase/Mitosis Promoting Factor » [33]. A la même époque, le MPF fut isolé et caractérisé dans les cellules humaines [6], des ovocytes de Xénope [34] et de Drosophile [35] démontrant ainsi son universalité pour le contrôle de la transition G2/M.

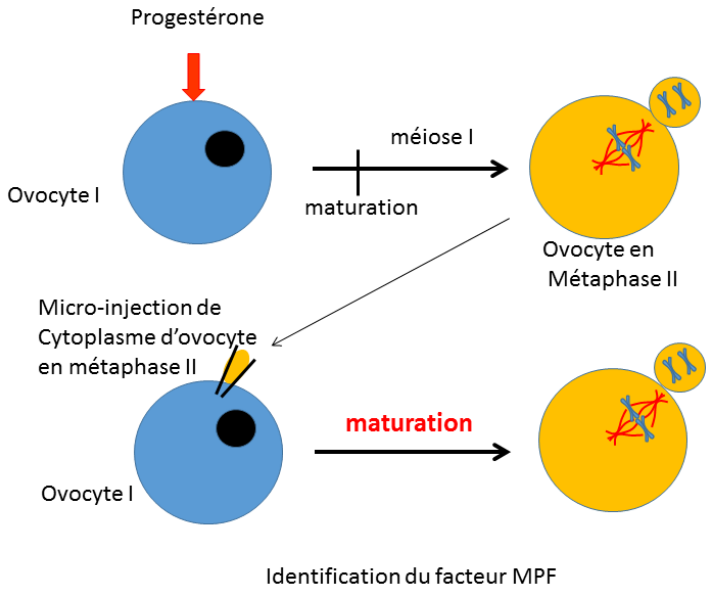


Figure 4 : La découverte de l'activité MPF à partir d'ovocytes de *Rana pipiens*.
L'injection du cytoplasme prélevé dans un ovocyte II maturé (bloqué en métaphase II) dans un ovocyte I, induit l'entrée en méiose de ce dernier. Cette expérience permis l'identification d'un facteur cytoplasmique, appelé MPF, suffisant pour induire l'entrée en méiose.

Depuis le début des années 1980 et les progrès de la génétique et de la biologie moléculaire, les recherches se sont orientées vers la compréhension du contrôle moléculaire du cycle cellulaire. Hartwell et collaborateurs furent les premiers à montrer que la progression du cycle cellulaire est régulée par l'expression de certains gènes [36–38]. Des cribles génétiques correspondant à des mutations thermosensibles réalisés chez *S. cerevisae* permirent l'isolement de souches mutantes arrêtées en des points spécifiques du cycle cellulaire, conduisant à l'identification d'une centaine de gènes impliqués spécifiquement dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire[39]. Ces gènes furent alors nommés *Cdc* pour « cell division cycle » [39]. Parmi eux, *Cdc28* a été identifié comme étant un gène contrôlant la progression en phase G1 et fût ainsi appelé gène « start »[40]. Selon le même principe, un crible génétique chez *S. pombe* fut établit par Paul Nurse, permettant également l'isolation de mutants *Cdc* dont l'étude permit la caractérisation notamment d'un gène équivalent au gène *Cdc28* trouvé par Hartwell [41]. Ce gène, appelé *Cdc2*, codant pour une protéine kinase d'environ 34 kDa, contrôle à la fois la transition G1/S et G2/M[41].

Au début des années 90, le MPF purifié à partir d'ovocytes d'amphibiens, fut caractérisé comme étant un hétérodimère composé de deux protéines, une de 34 kDa et l'autre de 45 kDa [42,43] (figure 5). Alors que la protéine de 34 kDa fut corrélé aux protéines p34Cdc2 et Cdc28 de *S. pombe* et *S. cerevisiae*, respectivement [42,43], le deuxième composant de 40 à 60 kDa, suivant les organismes, fut identifié comme une protéine Cycline : la Cycline B [34,43,44]. La Cycline B étant déterminée comme la sous-unité régulatrice de la protéine kinase, Cdc2, la sous unité catalytique, fut alors renommée Cdk1 pour « Cyclin-dependent kinase 1 »[45].

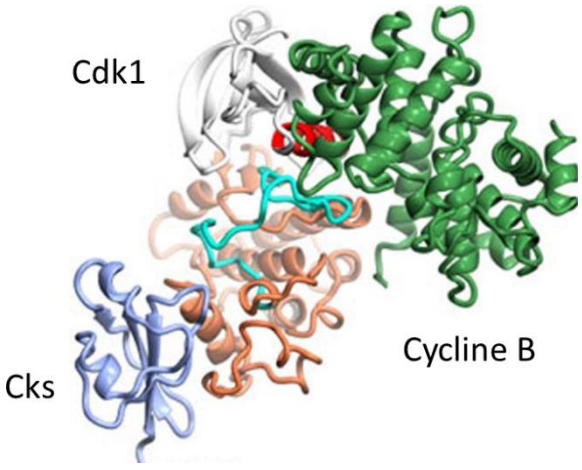


Figure 5 : Représentation tridimensionnelle du facteur MPF composé de la sous unité régulatrice Cycline B et de la sous unité activatrice Cdk1, adapté de [46].

L'étude de la structure moléculaire de Cdk2 humaine a permis de classifier les Cdk dans la famille des protéines Ser/Thr kinase notamment caractérisées par une large boucle flexible ou « T-loop » constituant la « boucle d'activation » [47] (figure 6). Les Cdks libres sont dans une configuration inactive où la boucle d'activation bloque le site catalytique[46]. L'association Cycline/Cdk permet un changement de conformation de la sous unité Cdk responsable du déplacement de la boucle d'activation libérant ainsi le site de fixation de l'ATP et le site de liaison du substrat (domaine carboxy-terminal)[46]. Ainsi pour être fonctionnelle, Cdk1 doit obligatoirement s'associer avec sa sous unité régulatrice Cycline B[48]. Cette association fait intervenir le domaine PSTAIRE de Cdk1 (une séquence conservée xGxPxxxxREx, où x représente n'importe quel acide aminé, dans l'extrémité NH_2 terminale), et le domaine « Cyclin box » de la Cycline B [46,49,50].

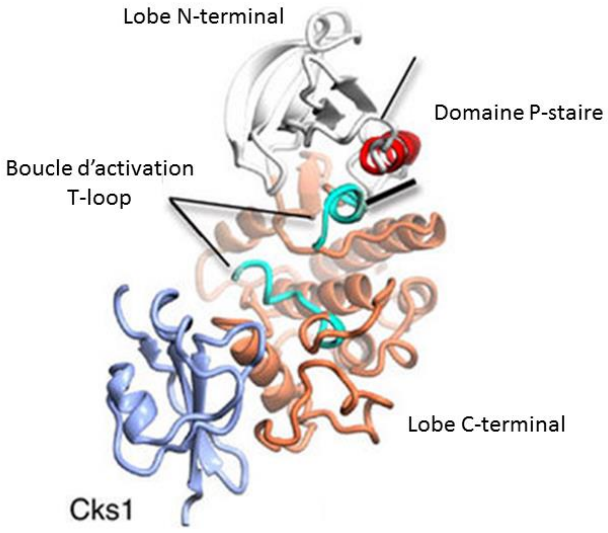


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de Cdk1 associé à Cks1 adapté de [46].

Chez les mammifères la Cycline B existe sous trois formes : B1, B2 et B3, qui diffèrent par leur extrémité amino-terminale [51]. Dans la plupart des cellules, Cdk1 est principalement retrouvé associée soit avec la sous-unité Cycline B1 soit avec Cycline B2. Alors que Cycline B1 joue un rôle essentiel pour la survie cellulaire (une invalidation du gène chez le modèle de souris conduit à une mort *in utero* [52]), Cycline B2 n'est pas indispensable (l'invalidation du gène est viable [52]). Cette observation suggère que Cycline B1 peut compenser la perte de Cycline B2, mais non l'inverse. Cycline B3 quant à elle s'associe avec Cdk2, mais ce complexe ne présente aucune activité catalytique[53]. Par ailleurs, la surexpression d'un mutant Cycline B3 non-dégradable conduit à un blocage des cellules aux transitions des phases G1 / S et G2 / M [54].

2) Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1

Suite à la caractérisation du complexe Cycline B-Cdk1 très rapidement les premiers modèles de régulation furent alors élaborés [55,56]. L'activité catalytique du complexe porté par la sous unité Cdk1 est finement régulé tant au niveau transcritptionel que post-traductionnel[57].

a) Régulation de la quantité de Cycline B

- **Régulation transcriptionnelle**

Puisque la concentration de la protéine Cdk1 est à la fois en excès et constante au cours du cycle cellulaire, la formation du complexe Cycline B-Cdk1 est essentiellement contrôlée par la régulation de la quantité de Cycline B. Les travaux de Tim Hunt et collègues ont montré que les cyclines mitotiques (Cycline B et A) subissent des cycles périodiques de destruction et de resynthèse, en phase avec l'état mitotique [58]. En effet, le niveau protéique de Cycline B faible en phase G1, augmente à partir de la fin de la phase S atteint son maximum à la transition G2/M, puis diminue pour quasiment disparaître lors du retour en phase G1[4,59,60]. L'accumulation progressive de Cycline B1/2 au cours de la phase G2 est associée à une régulation transcriptionnelle du gène correspondant CCNB1/2 [59,60]. En effet, la transcription du gène CCNB1/2 suit également des cycles périodique, et ceci lié à la présence au sein de son promoteur d'éléments de régulation interne notamment de deux régions CAAT et une région CDE/CHR[9,63,69,70] (figure 7).

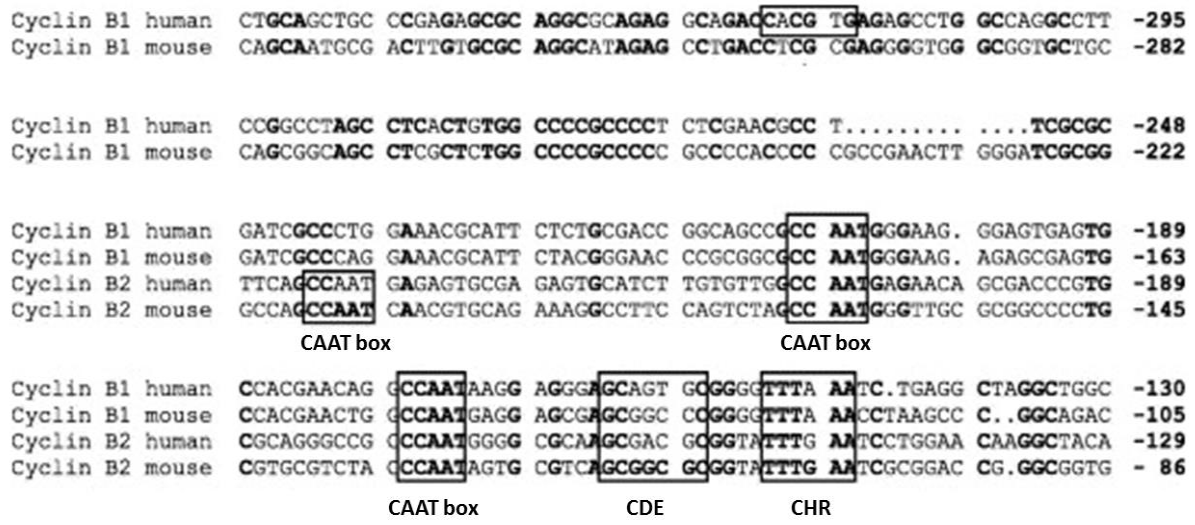


Figure 7 : Comparaison de la séquence des promoteurs de Cycline B1 et Cycline B2 humaines et de souris. Adapté de [64].

En phase G1, la fixation du facteur CDF-1 au niveau des éléments CDE/CHR, ainsi que d'un facteur de transcription répressif de la famille E2F, E2F4, en partenariat avec les protéines p107 et p130 (également appelée Retinoblastoma-like 1 et 2 respectivement) au niveau des séquences E2F du promoteur, bloque la transcription du gène [9] (figure 8). En phase G2, la transcription de l'ARN messager de Cycline B1 (et B2) est activée par différents facteurs de transcription, dont NF-Y, B-Myb, E2F et FoxM1[5,9,10] (figure 8). Ces facteurs de transcription sont activé par l'augmentation progressive en phase G2 de l'activité du complexe Cycline A2-Cdk [13,65]. Le facteur de transcription NF-Y est l'activateur principal de l'expression du gène *CCNB*. En collaboration avec les membres de la famille des protéines p300 / CBP qui présentent une activité histone acétyltransférase, il se fixe au niveau des boîtes CAAT du promoteur [9,66] (figure 8). Enfin, de manière intéressante, il a été montré que le promoteur de Cycline B1 se trouve en mitose dans une configuration ouverte lui permettant d'être occupé par des facteurs de transcription tels que NF-Y, conduisant l'expression de l'ARN messager de Cycline B1 même en mitose [67].

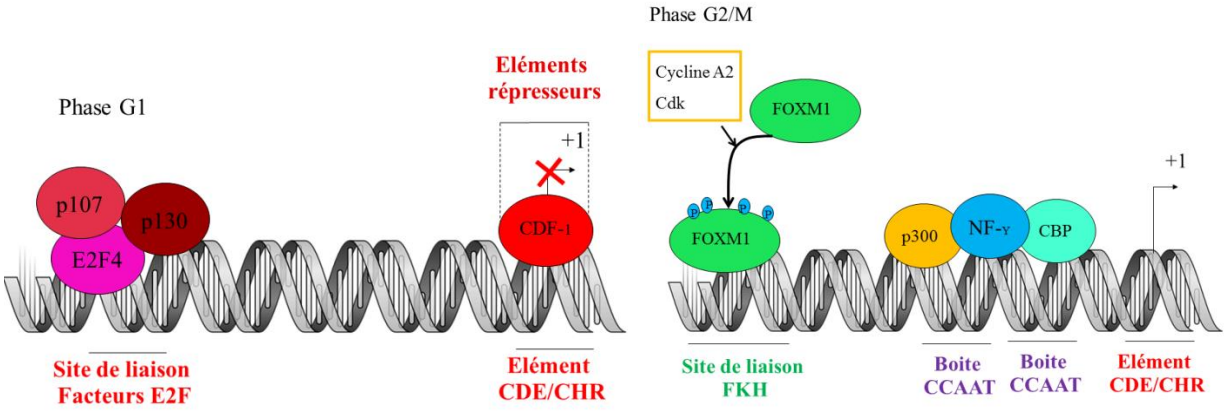


Figure 8 : Régulation de la transcription de l'ARN messager de Cycline B1 au cours des phases du cycle cellulaire.

- **Dégradation protéique**

Des analyses en temps réel montrent que le niveau de Cycline B diminue rapidement dès que le dernier chromosome s'aligne sur la plaque métaphasique [68]. Cycline B possède au niveau son domaine NH_2-terminal une courte séquence conservée appelée motif de destruction, (RxxLxxxN) reconnu par l'ubiquitine ligase APC/C [69]. Cette séquence est indispensable pour sa reconnaissance par l'ubiquitine ligase. En effet, il a été montré qu' une délétion ou des mutations de ce motif conduisent à la réduction ou à l'abolition de

l'ubiquitinylation de la Cycline B et sa dégradation [69]. Afin de reconnaitre ses substrats, l'ubiquitine ligase APC/C doit s'associer avec un co-activateur, soit Cdc20, soit Cdh1 [70]. L'APC/C s'associe d'abord avec Cdc20 dès la prométaphase puis avec Cdh1 en anaphase et pendant la phase G1. Cette association coordonnée dans le temps est dépendante d'une activité Cdk [71,72,73,74] (Figure 9). Chez la levure, une mutation des sites consensus de Cdk1 dans les sous-unités Cdc27, Cdc16 et Cdc23 de l'APC/C abolit largement sa liaison avec Cdc20, suggérant que l'activation du complexe APC/C ^{Cdc20} est amorcée par Cdk1[72]. A l'inverse, la phosphorylation de Cdh1 par le complexe Cycline B1-Cdk1 empêche son association avec l'APC/C [73,74]. En anaphase, alors que Cycline B1 est dégradée, le complexe APC/C ^{Cdh1} s'active pour permet de maintenir les faibles taux des Cyclines mitotiques tout au long de la phase G1 [75,76](figure 9).

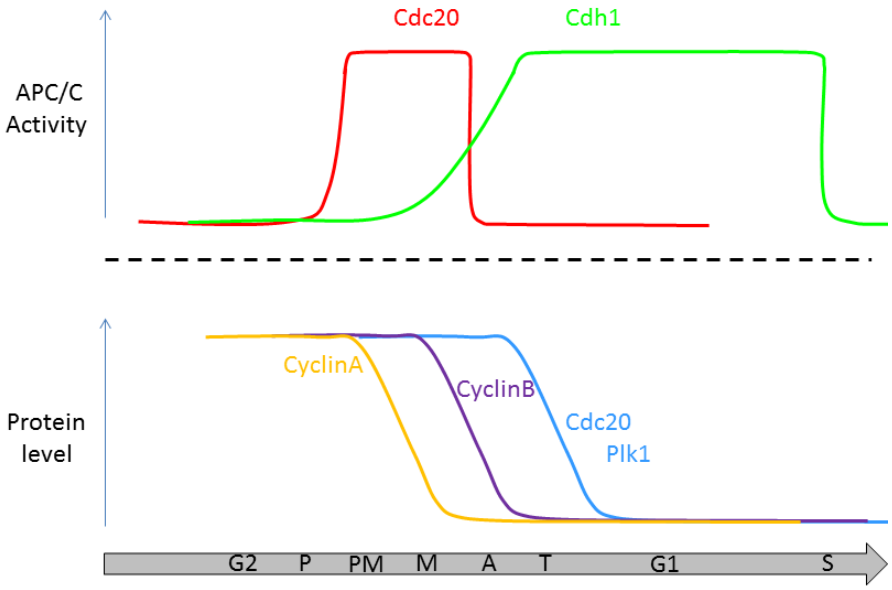


Figure 9 : Régulation de l'activité de l'APC/C et de la dégradation des Cycline mitotique au cours du cycle cellulaire d'après[70]

b) Régulation de l'activité de Cdk1 par phosphorylation déphosphorylation

De nombreux travaux chez les levures, les mammifères et la grenouille ont permis de mettre en évidence que dès lors que le complexe Cycline B-Cdk1 est formé, Cdk1 est phosphorylée au niveau de trois résidus (deux chez les levures): une phosphorylation activatrice sur le résidu Thr161et deux phosphorylations inhibitrices sur les résidus Thr14 et la Tyr15 [77–80] (figure 10).

- **Phosphorylation Thr161 activatrice**

La formation du complexe Cycline B-Cdk1 n'est pas suffisante pour l'activation de Cdk1. Cdk1 doit être phosphorylée sur le résidu Thr161, situé au niveau de sa boucle d'activation, pour être pleinement active [81]. Hautement conservée parmi les protéines Cdks, la phosphorylation de ce résidu est catalysée par la CAK ou « Cdk-Activating Kinase » [82]. Il a été montré que cette phosphorylation conduit à un changement de conformation de la protéine et participe à la reconnaissance et au positionnement des substrats de Cdk1[83,84]. Par ailleurs, il a également été proposé que la phosphorylation de ce résidu facilite l'hydrolyse de l'ATP ainsi correctement positionné [83].

Chez les mammifères, la phosphorylation de Cdk1 par la CAK requiert son association avec une Cycline ce qui contribue à stabiliser le complexe Cycline-Cdk1 [85]. Chez les eucaryotes supérieurs, la CAK est un complexe trimérique composé de Cdk7, de la sous-unité régulatrice Cycline H, et d'une troisième sous-unité MAT1 permettant de stabiliser l'interaction entre Cdk7 et la Cycline H [86]. De par le faite que l'abondance des différentes sous-unités du complexe CAK, son activité enzymatique et sa localisation nucléaire, ne changent pas au cours du cycle cellulaire, la phosphorylation de la boucle d'activation de Cdk1 ne constitue pas un élément limitant pour son activation [87]. Ainsi, bien que la phosphorylation de la Thr-161 soit essentielle à l'activation de Cdk1, c'est la formation du complexe Cycline-Cdk1 qui constitue la première étape de régulation. La déphosphorylation du résidu Thr161 est assurée par les phosphatases de la famille PP2C et/ou PP2A [88,89].

- **Phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et la Tyr15**

L'activité de Cdk1 est également régulée par des phosphorylations inhibitrices jouant un rôle central dans le contrôle de l'entrée des cellules en mitose. Initialement identifié chez la levure *S.pombe*, le résidu Tyr15, situé à proximité du site de liaison de l'ATP de Cdc2, joue un rôle essentiel pour l'inhibition de son activité [79]. En effet, la mutation de ce résidu en une forme non phosphorylable conduit à une entrée prématurée des cellules en mitose [79]. Plusieurs données moléculaires, biochimiques et cristallographiques ont permis d'étudier le mécanisme par lequel la phosphorylation de la Tyr15 régule l'activité de Cdc2 [47,84,90–92]. Ainsi, il a été montré que la phosphorylation de ce site ne modifie pas la conformation du complexe Cycline-Cdk, contrairement à la phosphorylation du résidu Thr161, mais néanmoins, perturbe la liaison des Cdks avec leurs substrats [84]. Bien que le résidu Tyr15 soit à proximité du site

actif, sa phosphorylation n'empêche pas la fixation de l'ATP [84,90]. En revanche, il a été suggéré que le phosphate au niveau de ce résidu, pourrait modifier la conformation et/ou l'orientation de l'ATP, participant ainsi, à la réduction du pouvoir catalytique de Cdk1 [47,84,90].

L'enzyme principale responsable de la phosphorylation du résidu Tyr15 est la serine/ thréonine kinase Wee1 dont un homologue a été identifié chez tous les eucaryotes. Le gène correspondant a été identifié pour la première fois chez la levure *S. pombe,* lors d'un crible génétique qui a permis d'isoler le gène *Cdc2* [41,93]. Il a été constaté que l'inactivation de ce gène était responsable d'une entrée prématurée des cellules en mitose, avec un taille réduite de moitié par rapport au type sauvage [93]. À l'inverse, la surexpression de Wee1 conduit à un prolongement de la durée de la phase G2 avec des cellules jusqu'à quatre fois plus grandes qu'en conditions normales[93]. Ces résultats suggérèrent un rôle important de Wee1 dans le processus coordonnant la division cellulaire et la croissance cellulaire. Par la suite, une deuxième kinase, Mik1 (Mitotic inhibitor kinase 1), également capable de phosphoryler Cdk1 au niveau du résidu Tyr15 a été identifiée [94]. Bien que les deux kinases Wee1 et Mik1 phosphorylent le même résidu, il a été montré que, contrairement à la délétion du gène *wee1*, la délétion de *mik1* n'a aucun effet sur la croissance cellulaire [94]. En revanche, la double délétion *mik1/ wee1* conduit à un phénotype létal [94].

Un second résidu, situé à proximité de la Tyr15, Thr14 est également phosphorylé chez tous les eucaryotes supérieurs [80,81,95]. La phosphorylation sur ces résidus Tyr15 et Thr14 maintient Cdc2 dans un état inactif au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire[79,96]. Il a été montré que la déphosphorylation de ces deux résidus prenait place à la transition G2 / mitose, de manière concomitante avec l'activation de la kinase Cdc2 (test H1 kinase) [80]. La fonction de la phosphorylation du résidu Thr14 a été abordée en étudiant le comportement de formes mutantes de Cdc2 dans lesquelles les résidus Thr14 et/ou Tyr15 ont été remplacés par des acides aminés non phosphorylables. L'expression des formes mutantes de Cdc2 dans deux systèmes hétérologues (Cdc2 de poulet exprimée dans des cellules humaines HeLa [97] ou Cdc2 de souris traduite dans des extraits d'ovocytes de Xénopes [95]) ont produit des résultats similaires : l'expression de mutants simples n'a pas d'effet significatif alors que le double mutant entraîne une activation prématurée de la kinase Cycline B-Cdc2 et une entrée prématurée des cellules en mitose. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation d'un des deux résidus est suffisante pour empêcher l'activation de Cdc2. Ainsi, la déphosphorylation des deux résidus est une étape obligatoire pour l'initiation de l'entrée des cellules en mitose[80].

En parallèle, différentes études ont montré que l'expression d'un mutant non phosphorylable de Cdk1 sur les résidus Thr14 et Tyr15 (Cdk1 AF) dans des cellules de mammifères compromet le déroulement normal du cycle cellulaire[98]. En effet, l'expression de cette forme mutante induit une entrée prématurée des cellules en mitose suite à une réplication incomplète du génome [98]. Ainsi, il a été proposé que la phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 permet à la cellule d'atteindre une concentration suffisante de complexes Cycline B1-Cdk1 nécessaire pour le bon déroulement de la mitose [56,99].

À la recherche de la protéine humaine capable de compenser la perte de fonction du gène *Wee1* chez la levure *S.pombe*, Igarashi et collègues ont identifié l'homologue humain de la kinase Wee1 (huWee1) [100]. Bien que des différences structurales existent entre la kinase Wee1 humaine et son homologue chez *S.pombe* [101], la surexpression de la kinase huWee1 conduit également à un arrêt des cellules humaines en phase G2 [102]. La kinase humaine a une taille beaucoup plus petite que son homologue chez la levure avec 214 acides aminés en moins dans la région régulatrice amino-terminale [101]. Son domaine catalytique possède seulement 29 % d'identité avec la kinase Wee1 de *S.pombe* [103]. Contrairement à son homologue chez la levure qui est capable de phosphoryler les deux résidus Tyr15 et Thr14, la kinase huWee1 phosphoryle exclusivement le résidu Tyr15, suggérant qu'une deuxième kinase est requise pour phosphoryler le résidu Thr14 de Cdc2 [101,103,104].

La kinase Myt1 (Membrane-associated tyrosine and threonine specific Cdc2 inhibitory kinase 1), de séquence très similaire à la kinase huWee1 (46% d'identité) [105], a été initialement identifiée dans les fractions membranaires d'extraits d'ovocytes de Xénopes [106]. Myt1 est responsable de la phosphorylation du résidu Thr14, et est également capable de phosphoryler le résidu Tyr15 sur Cdc2 [106–109]. De manière remarquable, une corrélation temporelle a été mise en évidence entre la phosphorylation des résidus Thr161 et Thr14, suggérant que Myt1 pourrait inactiver rapidement les complexes Cycline B1-Cdk1 suite à leur assemblage[110,111].

Enfin, il est intéressant de noter que contrairement à la kinase Myt1 qui phosphoryle exclusivement Cdc2, la kinase Wee1 est capable de phosphoryler à la fois Cdc2 et Cdk2, suggérant son implication dans la régulation de la phase S, et la transition G2/mitose [101,112].

- **Déphosphorylation activatrice des résidus Thr14 et la Tyr15**

C'est par la même approche génétique que Nurse et collaborateurs ont identifié la phosphatase Cdc25 s'opposant à l'activité des kinases Wee1 et Mik1, chez la levure *S.pombe* [94,113]. En effet, il observa que la délétion de Cdc25 entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/mitose, et qu'à l'inverse sa surexpression induit une entrée prématurée des cellules en mitose de manière dose-dépendante [113]. La délétion de Cdc25 associée à un arrêt des cellules en fin de phase G2, est caractérisée par une accumulation de complexes Cycline B1-Cdc2 inactifs, phosphorylés sur le résidu Tyr15 [79,114]. Chez *Drosophila melanogaster*, l'homologue de la phosphatase Cdc25, stg fût décrit comme un élément essentiel contrôlant le timing et la localisation des divisions cellulaire au cours de l'embryogenèse [115]. D'autre part, chez *Xenopus laevis* l'addition de protéine Cdc25 purifiée en excès dans des extraits d'ovocytes conduit à la déphosphorylation prématurée du résidu Tyr15 et à l'activation du complexe Cycline B-Cdk1, détectée par la phosphorylation de l'histone H1 [116,117]. Dans ce cadre, plusieurs équipes ont montré que Cdc25 est responsable de la déphosphorylation de Cdk1, de manière directe, sur son résidu Tyr15 [116,118–121].

La phosphatase Cdc25 est une phosphatase atypique appelée Dual-Specificity Phosphatase (DSPase) [122]. En effet, en plus de posséder un motif HCX5R commun à toutes les tyrosine phosphatases, Cdc25 présente également une forte identité avec la phosphatase VH1 du virus de la vaccine, au niveau de son domaine Carboxy-terminal [120], ce qui lui donne la particularité de pouvoir déphosphoryler à la fois des résidus sérine et tyrosine [123]. Ainsi Cdc25 est responsable de la déphosphorylation à la fois du résidu Tyr15 mais également du résidu Thr14, ce qui conduit à l'activation de Cdk1 chez les eucaryotes supérieur [124].

Des homologues de Cdc25 sont présents chez tous les eucaryotes [125]. Chez l'homme, le génome comprend trois gènes codant pour des isoformes de Cdc25 (Cdc25A, B et C), chacune soumise à plusieurs épissages alternatifs [125–127]. Cdc25A, B, C sont capables de déphosphoryler Cdk1 et Cdk2, alors que seule Cdc25A est capable de déphosphoryler le complexe Cycline D-Cdk4/6 présent en phase G1[34,124,128].

L'analyse du rôle des Cdc25s chez la souris a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle partielle [129–131]. En effet, seule l'invalidation du gène *Cdc25A* est létale chez la souris à un stade précoce de l'embryogenèse (5-7ème jours) [129]. Les souris invalidées pour le gène *Cdc25B* et/ou *Cdc25C* ne présentent pas de phénotypes particuliers en dehors d'une stérilité chez les femelles liée à une incapacité des ovocytes à maturer [130,131]. Les cellules fibroblastiques (MEF; Mouse Embryonic Fibroblasts) *Cdc25B* $^{-/-}$ et *Cdc25C* $^{-/-}$

présentent une prolifération et une réponse aux lésions de l'ADN normales [129,132]. Cependant, il est intéressant de noter que l'inactivation conditionnelle de Cdc25A chez l'adulte, à l'inverse de l'embryon, est compensée par Cdc25B et/ou Cdc25C [132].

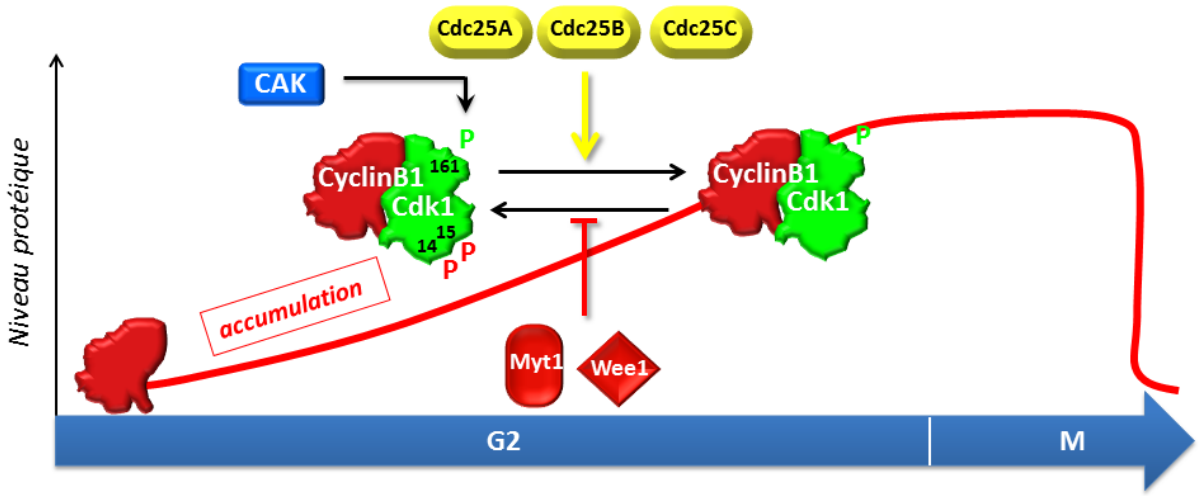


Figure 10 : Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1 chez les mammifères.

c) Distribution subcellulaires de Cycline B1-Cdk1 et ses régulateurs direct

Bien que Cycline B transite constamment entre le noyau et le cytoplasme, sa localisation, en interphase, est majoritairement cytoplasmique[133–135]. En effet, Cycline B possède une séquence d'export nucléaire (NES), également appelée Cytoplasmic Retention Signal (CRS), située au niveau de son domaine NH_2-terminal. Cette séquence est reconnue par le facteur d'export nucléaire exportine 1 ou CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1), responsable d'un export plus rapide de Cycline B au cytoplasme [133–135]. À la fin de la phase G2, une fraction de Cycline B1 est également retrouvée associée aux centrosomes [133].

Au cours de la prophase, Cycline B1 en association avec Cdk1 s'accumule rapidement au noyau avant la rupture de l'enveloppe nucléaire [133] (figure 11). Il a été montré que cette accumulation nucléaire est essentielle pour l'initiation d'évènements pré-mitotique, comme la condensation de la chromatine et la rupture de l'enveloppe nucléaire [134,136–139]. Les mécanismes moléculaires responsables de cet import sont restés un temps controversés. Initialement, il a été proposé que Plk1 pourrait être responsable de l'import nucléaire de Cycline B1 en prophase notamment via la phosphorylation d'un résidu (Ser147) localisé dans la séquence NES [140]. Des travaux ultérieurs ont infirmé ce modèle et montré que Plk1 n'est pas responsable de l'import nucléaire de Cycline B1 [141,142]. En prophase, l'activation initiale

de Cycline B1-Cdk1 dans le compartiment cytoplasmique déclenche sa translocation nucléaire via une stimulation de sa vitesse d'import ~ 40 fois plus rapide [142,143]. Cette translocation est vraisemblablement liée à une modification de la machinerie de transport nucléaire suite à l'activation de Cycline B1-Cdk1 [142]. Enfin, en mitose, une fraction de Cycline B1 est retrouvée liée au centrosome et au fuseau mitotique[133,144].

L'import dans le noyau de Cycline B1 a également été observée lors d'un arrêt irréversible des cellules en phase G2, en réponse à l'induction d'important dommages à l'ADN[145]. Dans ces conditions, il a été montré que l'import de Cycline B1 ne dépendait pas de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1, mais de l'activation des protéines p53 et p21. p21 hautement activée par p53, va séquestrer Cycline B1 au noyau, conduisant à sa dégradation, dépendante du complexe APC/C [Cdh1 146].

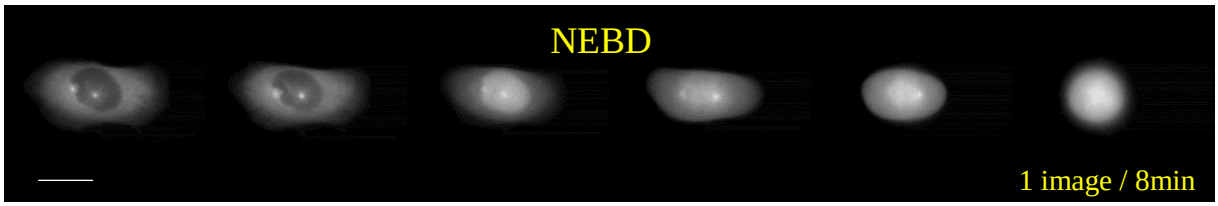


Figure 11 : Suivi spatio-temporel de Cycline B1 au cours de la transition G2-mitose. Cellule humaine HeLa exprimant stablement Cycline B1 fusionnée à un variant GFP (mRuby).

Chaque régulateur direct du complexe Cycline B1-Cdk1 a une distribution subcellulaire qui lui est propre ce qui permet une fine régulation du complexe (figure 12). Tandis que Wee1 est exclusivement localisée au noyau en interphase, Myt1 est retrouvée associée à des structures membranaires au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi [108,109,134]. En effet, Myt1 possède un segment transmembranaire, situé en dehors de son domaine catalytique[109]. Ce segment composé d'acides aminés hydrophobes ou non chargés, flanqués aux deux extrémités par un résidu basique (lysine ou arginine), lui permet d'être une protéine intégralement membranaire[109].

En ce qui concerne les phosphatases Cdc25A B&C, ce sont des protéines qui transitent en permanence entre le noyau et le cytoplasme. La présence de séquences NLS et NES respectivement positionnées en partie amino et carboxy-terminale, est indispensable à cette distribution spatiale dynamique [147–149]. Cependant, Cdc25A est majoritairement localisée au noyau grâce à sa séquence NLS forte [147]. En effet, l'expression d'une forme de Cdc25A

avec une séquence NLS non-fonctionnelle conduit à une redistribution de la protéine au cytoplasme [147]. Bien que Cdc25B possède des séquences NLS et NES assez proche de celle de Cdc25A, sa distribution intracellulaire au cours de la progression en phases S et G2 reste mal caractérisée. Pour autant, il a été proposé que Cdc25B soit localisé au noyau en phase S et début de phase G2 puis s'accumule au cytoplasme au cours de la progression en phase G2[150,151]. De manière intéressante, l'expression d'une forme de Cdc25B possédant une séquence NES non fonctionnelle diminue sa capacité à induire l'entrée des cellules en mitose, ce qui suggère que l'activité de cette phosphatase au cytoplasme est requise pour activer Cdk1 [148]. Enfin, Cdc25C est majoritairement cytoplasmique pendant l'interphase et s'accumule dans le noyau uniquement en fin de prophase, ce qui est vraisemblablement lié à l'augmentation de la perméabilité des pores nucléaires[136]. Plusieurs travaux ont mis en évidence que sa localisation cytoplasmique prédominante en interphase dépend à la fois d'une séquence NES et de l'interaction de Cdc25C (HsCdc25C et XlCdc25C) avec des protéines 14-3-3[152,153] .

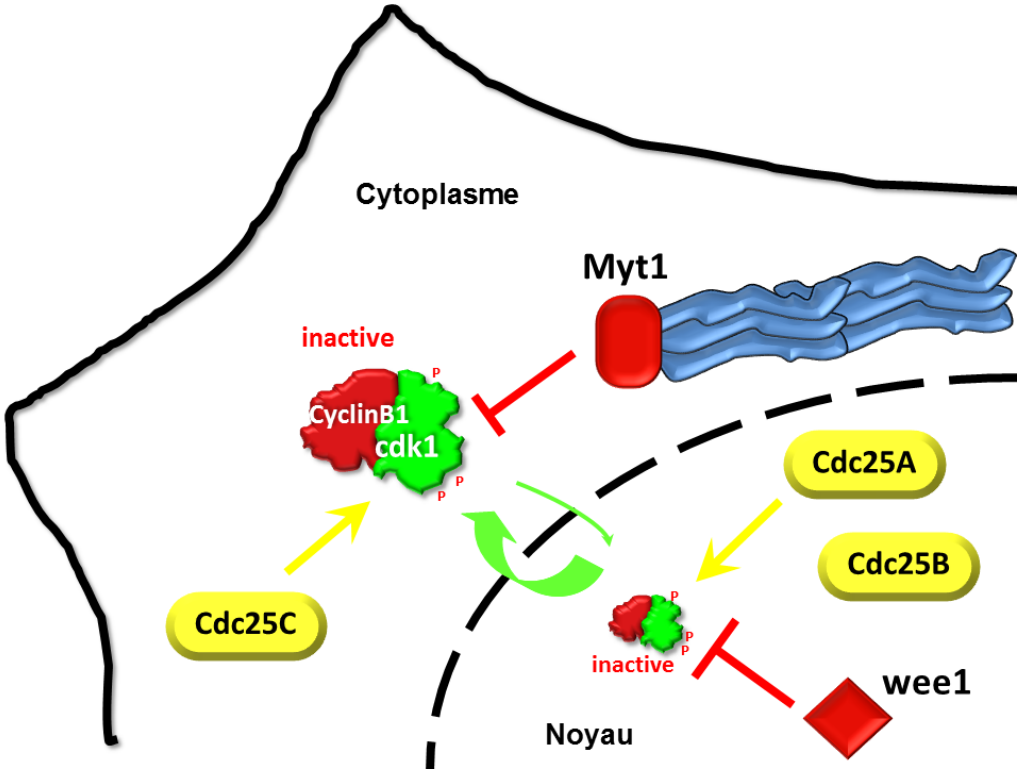


Figure 12 : Localisation subcellulaire des régulateurs du complexe Cycline B1-Cdk1

3) Cinétique d'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 au cours de la progression G2-Mitose

De par la grande complexité des mécanismes de régulations du complexe Cycline B1-Cdk1, la succession des étapes moléculaires qui prennent place au cours de la progression en phase G2 et qui aboutissent à l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 reste mal caractérisée. L'une des questions fondamentales abordée par de nombreuses études a été de déterminer à quel moment et/ou dans quel compartiment subcellulaire l'activation initiale du complexe Cycline B1-Cdk1 prend place au cours de la progression G2-mitose.

Pour répondre à cette question, il a été développé un pseudo-substrat spécifiquement phosphorylé par Cycline B1-Cdk1, et non par les complexes Cycline E-Cdk2 ou Cycline A2-Cdk2, dont les propriétés de fluorescence varient en fonction de son état phosphorylé versus non phosphorylé (Biosenseur FRET : Förster Resonance Energy Transfer) [136,144]. En utilisant cette approche expérimentale, la cinétique d'activation de Cycline B1-Cdk1 a pu être analysée en temps réel, dans chaque cellule suivi individuellement par des techniques de vidéo-microscopie. Les auteurs ont pu déterminer que l'activation initiale du complexe Cycline B1-Cdk1 prenait place de manière parfaitement reproductible en fin de phase G2, ~ 20 min avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD) dans les cellules humaines [144]. De manière remarquable, cette activation initiale est suffisante pour initier plusieurs événements cellulaires, dont l'import nucléaire du complexe Cycline B1-Cdk1, et ainsi permettre l'entrée en prophase [136,144]. Cette activation est ensuite suivie d'une augmentation progressive de l'activité Cycline B1-Cdk1 au cours de la prophase[136] (figure 12). Par ailleurs, il a été mis en évidence que différents niveaux d'activités permettent de contrôler différents évènements cellulaires comme la rupture de l'enveloppe nucléaire [136]. Ces résultats suggèrent que l'activation progressive de Cycline B1-Cdk1 lors de l'entrée en mitose est un moyen de coordonner la réorganisation cellulaire. L'activation initiale du complexe Cycline B1-Cdk1 suggère qu'un changement rapide de l'équilibre entre les activités opposées des kinases inhibitrices (Wee1&Myt1) et des phosphatases activatrices (Cdc25A, B, C) prend place en fin de phase G2 par des mécanismes moléculaires qui restent à élucider.

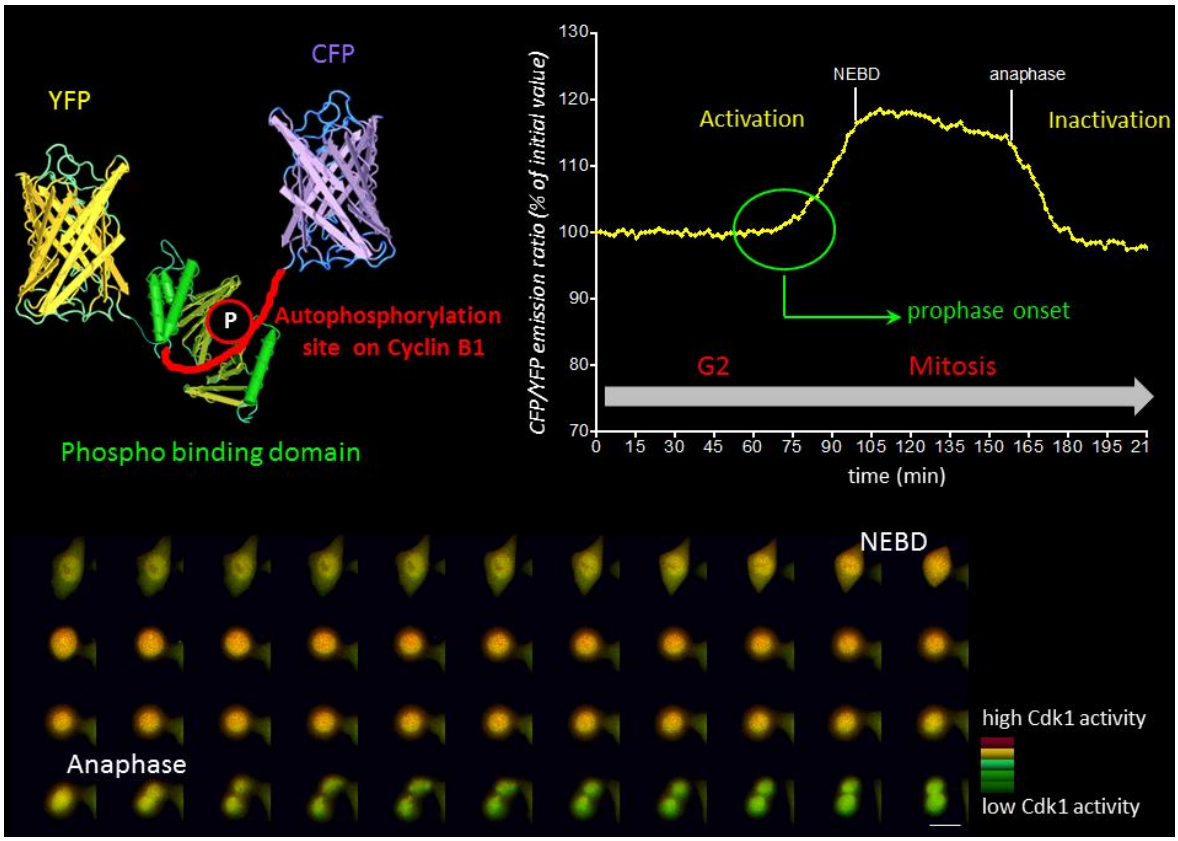


Figure 13 : Suivi en temps réel de la cinétique d'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 au cours du cycle cellulaire.

L'activité du complexe Cycline B1-Cdk1 a été analysée en temps réel par vidéo-microscopie dur cellule vivante via l'utilisation d'un biosenseur FRET représenté en haut à gauche de la figure [136,144].

4) Mécanismes de régulation en amont du complexe Cycline B1-Cdk1

Au cours d'un cycle cellulaire normal, plusieurs kinases ont été retrouvées participant à la régulation des phosphatases Cdc25s activatrices et des kinases Myt1&Wee1 inhibitrices (figure 15). Leur état de phosphorylation joue un rôle primordial dans leur abondance, leur localisation et/ou l'interaction avec leurs substrats tout au long du cycle cellulaire [154,155, 156].

a) Régulation de l'activité des phosphatases Cdc25A, B& C

- **Cdc25A**

L'activité enzymatique de Cdc25A est globalement corrélée avec l'accumulation de la protéine [154]. En fin de phase G1, Cdc25A s'accumule suite à l'activation de la transcription de son ARN messager médiée par les facteurs de transcription E2F-1 et c-Myc[157–159]. Cdc25A est une protéine relativement instable avec une demi-vie inférieure à 10 min. Deux ubiquitines ligases E3 (APC/C et SCF) sont impliquées dans sa dégradation suite à la reconnaissance de motifs particulier de Cdc25A[160]. Tandis que le complexe SCF intervient au cours des phases S et G2 en réponse à un stress, le complexe APC est requis en sortie de mitose[160]. Pour interagir avec Cdc25A , le complexe ubiquitine ligase SCFβ-^{TrCP} nécessite l'intervention des kinases p38 Chk1 et/ou Chk2 qui phosphorylent Cdc25A en de multiples résidus serine [160–164]. Cdc25A possède dans son domaine amino-terminal un motif KEN-box exclusivement reconnue par Cdh1[160,165]. La surexpression de Cdh1 entraîne une diminution significative du niveau protéique de Cdc25A, tandis que la délétion de Cdh1 par ARN interférence provoque une augmentation de la quantité de Cdc25A[160,165]. En mitose, le complexe Cycline B1-Cdk1 va, quant à lui, permettre la stabilisation de Cdc25A en phosphorylant ses résidus Ser18 et Ser116, ce qui conduit à l'inhibition de l'interaction de Cdc25A avec les ubiquitines ligases SCFβ-^{TrCP} et APC/C^{Cdh1} [165,166].

- **Cdc25B**

Cdc25B est exprimée à partir de la transition S/G2 suite à l'activation de l'expression de son ARN messager, sous le contrôle des facteurs de transcriptions NF-Y et FoxM1 [5,167]. Son activité enzymatique qui augmente progressivement au cours de la progression G2-mitose est régulé par de nombreuses kinases[168,169] (figure 14).Tout d'abord, il a été montré que le complexe Cycline A2-Cdk1/2 phosphoryle Cdc25B conduisant à son interaction avec une E3 ubiquitine ligase qui reste à déterminer[170]. Une autre kinase, pEg3, semble inhiber l'activité enzymatique de Cdc25B en phosphorylant ses résidus Ser169 et/ou Ser323 [151,152]. En mitose, Cdc25B est hyperphosphorylée au niveau de sa région amino-terminale, ce qui augmente son affinité et son activité envers son substrat Cycline B1-Cdk1, sans pour autant stimuler son activité envers Cycline A2-Cdk1/2[155]. Les kinases mitotiques responsables de cette phosphorylation restent mal caractérisées. Dans ce cadre, il a été observé que la kinase Aurora-A phosphoryle Cdc25B localisée au centrosome sur le résidu Ser353, et pourraient

conduire à l'augmentation de son activité [171]. D'autres candidats potentiels ont été proposés : la kinase CK2 qui phosphoryle et stimule l'activité enzymatique de Cdc25B au moins *in vitro,*[172] mais également la kinase Plk1 mais dont la signification biologique de la phosphorylation reste à étudier [173].

- **Cdc25C**

La quantité protéique de Cdc25C ne varie pas significativement au cours du cycle cellulaire [174] , bien que l'expression de son l'ARN message est initiée au cours de la transition S/G2 sous le contrôle des éléments CDE/CHR et des facteurs de transcription E2F sp1 sp3[175]. Cdc25C reste inactif pendant la majeure partie du cycle cellulaire[168,176]. Son activité enzymatique très faible à l'état non phosphorylé [155], ne devient mesurable qu'en fin de phase G2[168,176] (figure 14). En mitose, la phosphorylation sur de multiples résidus stimule son activité phosphatase et son affinité pour son substrat Cycline B1-Cdk1 [155]. Plusieurs sites phosphorylés par Cycline B1-Cdk1 ont été identifiés : Thr48, Thr67, Ser122, Thr130 et Ser214[177]. En plus du complexe Cycline B1-Cdk1, d'autres kinases phosphorylent Cdc25C et régulent sa fonction. La kinase C-Tak1 peut se lier et phosphoryler Cdc25C sur son résidu Ser216 [178]. Les kinases Chk1 et Chk2 phosphorylent également Cdc25C sur ce même résidu, créant ainsi un site de liaison pour la protéine 14-3-3 [156,179,180]. En accord, une mutation du résidu Ser216 inhibe l'interaction de Cdc25C avec la protéine 14-3-3 [156]. Tout comme Cdc25B, Cdc25C est également phosphorylé par la kinase Plk1 et cette phosphorylation stimule son activité enzymatique [181,182]. Cdc25C possède un site d'ancrage au niveau de la région NH_2-terminale, Thr130, reconnu par la kinase Plk1 permettant ainsi sa phosphorylation sur de nombreux sites qui reste à déterminer [183]. Par ailleurs, la phosphorylation de ce site par une activité Cdk1 augmente grandement l'interaction de Plk1 avec Cdc25C et sa phosphorylation subséquente[183]. Plusieurs questions restent en suspens : tout d'abord à quel moment prend place cette interaction Plk1-Cdc25C mais également la phosphorylation de Cdc25C par Plk1, quel complexe Cycline-Cdk1 est responsable de la phosphorylation de ce site d'ancrage sur Cdc25C, mais également quelle est la contribution relative de ces éléments de phosphorylation pour l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée des cellules en mitose.

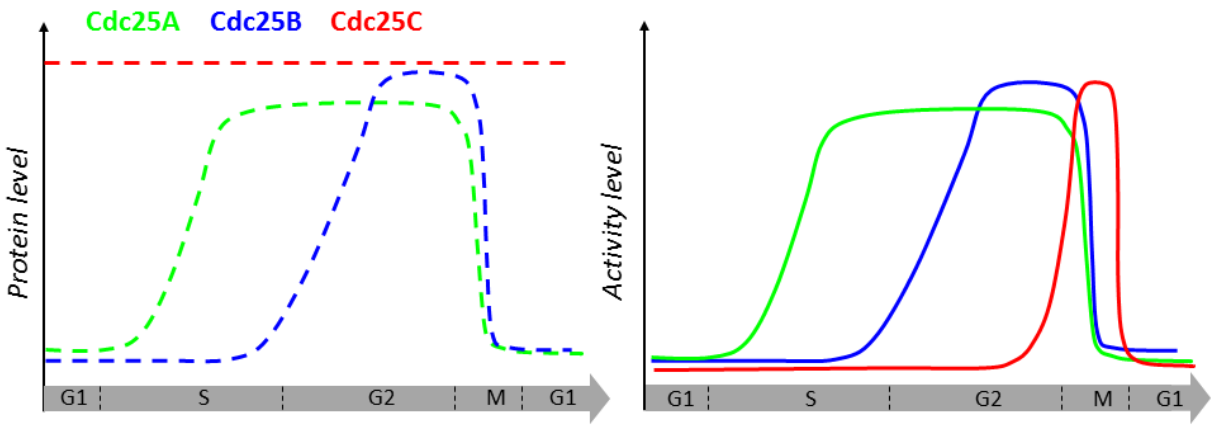


Figure 14 : Profil du niveau protéique et d'activité des cdc25s au cours du cycle cellulaire.

b) Régulation de l'activité de la kinase Wee1

La kinase Wee1 se compose d'une grande région NH_2-terminale régulatrice (200- 550 résidus) très divergente, et d'un domaine catalytique C-terminal (350 résidus) bien conservé entre les espèces[184] . Des analyses réalisées chez le Xénope ont révélé qu'une région de la partie N-terminale était importante pour inhiber l'activité de la kinase Wee1[185]. Cette région contient une courte séquence (appelé Wee-box), (Val) -Asn-Ile-Asn-ProPhe-Thr-Pro- (Asp), relativement bien conservé entre les divers homologues de la kinase Wee1[185]. L'activité enzymatique de la kinase Wee1 augmente progressivement au cours des phases S et G2, parallèlement à son niveau protéique [186,187]. Au cours d'un cycle normal, Wee1 semble être dégradé durant la transition G2-M[186–189], ce qui contribue à une augmentation rapide de l'activité du complexe Cycline B1-Cdk1[187,190]. Chez le Xénope, il a été observé que lorsque la réplication de l'ADN est achevée, Wee1 se trouve dans un état hyper phosphorylé au niveau de son domaine Wee-box ce qui déclenche sa dégradation ubiquitine dependante[191]. L'ubiquitylation de Wee1 est pris en charge par le complexe ubiquitine ligase SCFβ [-TRCP], mais également par l'ubiquitine ligase SCF [Tome-1 192,193]. Plk1 est capable de phosphoryler la kinase Wee1 permettant de favoriser l'interaction de Wee1 avec le complexe SCFβ-[TrCP 194]. Des sites consensus de phosphorylation par Cdk1 ont été identifiés dont deux sites conservés chez les vertébrés sont fonctionnellement importants pour inhiber l'activité de Wee1 [190,195]. Le site avec un effet plus fort pour l'inhibition de l'activité de Wee1 est le résidu T239 qui est phosphorylé peu de temps avant l'entrée en mitose. Par ailleurs, une mutation de ce site en forme non phosphorylable augmente l'inhibition de l'entrée en mitose[195]. Parmi les candidats

potentiels responsable de la phosphorylation de ces sites cdk et en particulier le résidu T239 figure le complexe Cycline A2-Cdk qui a été retrouvé interagissant avec la kinase Wee1[196,197].

c) Cycline A2-Cdk un activateur de l'entrée en mitose

Plusieurs travaux antérieurs ont montré que le complexe Cycline A2-Cdk, essentiel pour l'initiation de la réplication de l'ADN, joue également un rôle dans la régulation de l'entrée en mitose[198,199]. En effet, tandis que la micro-injection du complexe Cycline A2-Cdk2 purifiée et active, dans des cellules HeLa en phase G2, provoque une entrée prématurée des cellules en mitose [200], son inhibition par micro-injection d'anticorps dirigés contre Cycline A2, retarde l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée en mitose [201]. De manière intéressante, l'induction de l'expression d'un mutant dominant négatif de Cdk2 conduit également à un arrêt des cellules en phase S et G2 [202]. Par ailleurs, il a été montré que dans ces conditions, l'arrêt en phase G2 était associé à une réduction de l'expression de la Cycline B1 et d'une augmentation de la phosphorylation de Cdk1 sur son résidu Tyr15. L'idée que l'expression de la forme dominante négative de Cdk2 pourrait rentrer en compétition avec la formation du complexe Cycline B1-Cdk1 a été réfutée par les auteurs montrant que le dominant négatif de Cdk2 n'était pas capable de s'associer avec Cycline B1[202]. Confirmant ce résultat, une autre étude a montré que l'inactivation de Cycline A2-cdk via la déplétion de Cycline A2 par ARN interférence conduit également à l'arrêt des cellules en phase G2 associé à l'inactivation du complexe Cycline B1-Cdk1[203]. L'ensemble de ces études suggère que la kinase Cycline A2-Cdk est requise en amont pour l'initiation de l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1. Cependant le ou les mécanismes par lesquels Cycline A2-Cdk2 intervient pour permettre l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée des cellules en mitose restent à déterminer. Le niveau d'activité du complexe Cycline A2-Cdk, restreint et finement contrôlé en phase S, joue un rôle majeur dans le programme d'activation des origines de réplication. Son activité augmente ensuite progressivement en phase G2 et est associée à un changement de la sous-unité catalytique de Cdk2 vers Cdk1, dont l'importance biologique reste non élucidée[201]. Une hypothèse serait qu'une activité de Cycline A2-Cdk2 ou Cycline A2-Cdk1 dépassant un seuil en phase G2 pourrait permettre l'activation des régulateurs du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée en mitose. Plusieurs scénarios peuvent être proposés concernant son mécanisme d'action dans l'entrée en mitose. Cycline A2-Cdk pourrait contrôler l'entrée en mitose en modulant l'activité des kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 du complexe Cycline B1-Cdk1. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que le complexe

Cycline A2-Cdk2 s'associe avec la kinase Wee1, via la présence de quatre motifs RXL reconnus spécifiquement par Cycline A2, et la phosphoryle sur son résidu Thr239. Par ailleurs, une mutation de ce résidu Thr239 en une forme non phosphorylable, ou une mutation des motifs RXL de reconnaissance, entraine un arrêt des cellules en phase G2[196]. Ces observations suggèrent que le complexe Cycline A2-Cdk2 pourrait participer au contrôle de l'entrée en mitose en inhibant l'activité de Wee1. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'étudier d'une part à quel moment cette phosphorylation prend place au cours de la phase G2 et quelle est sa contribution pour l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 en fin de phase G2. Bien que Cycline A-Cdk ne semble pas capable d'activer directement Cdc25C[204], rien ne permet d'exclure que les cibles de ce complexe en phase G2 ne puissent être la phosphatase Cdc25A ou B.

De manière intéressante, alors que Cycline A2 est exclusivement localisée au noyau en phase S, elle s'accumule progressivement au cytoplasme au cours de la phase G2[205]. Cela laisse entrevoir la possibilité que l'accumulation du complexe Cycline A2-Cdk1/2 au cytoplasme où Cycline B1-Cdk1 est majoritairement localisée, puisse jouer un rôle important dans l'activation du MPF. Une analyse détaillée du processus conduisant à cette accumulation de la Cycline A2 au niveau du cytoplasme et son lien possible avec les régulateurs de Cycline B1-Cdk1 pourrait également apporter des pistes concernant le mécanisme d'action de Cycline A2 dans le contrôle de l'entrée en mitose.

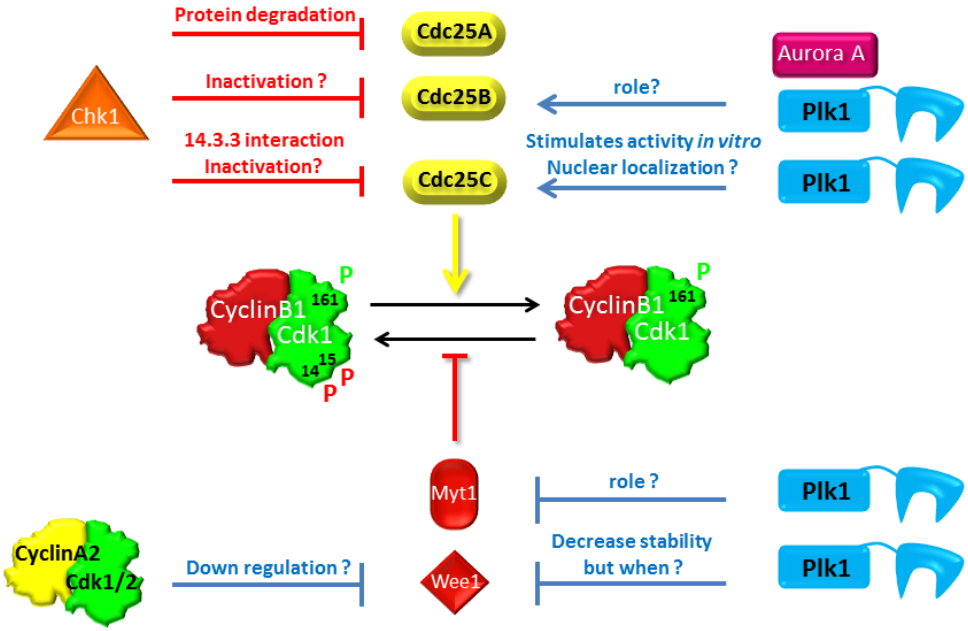


Figure 15 : Régulateurs potentiels en amont du complexes Cycline B1-Cdk1.

Partie II : Polo-like kinase 1 un régulateur potentiel de l'entrée en mitose

A. La famille des Polo-like kinases

1) Découverte de la kinase Polo

C'est grâce aux travaux de Sunkel et Glover chez *Drosophila melanogaster*, que la protéine Polo fut identifiée. Deux mutants du gène *polo* furent décrits *:* une mutation *polo*^{1} partiellement létale pour les larves et une deuxième mutation *polo*^{2} qui s'est avérée quant à elle létale. Au sein des larves portant la mutation partiellement létale, il fut décrit, dès les premiers stades de développement, des cellules présentant des caractéristiques mitotiques aberrantes, avec notamment des pôles et des fuseaux mitotiques branchés et multipolaires, une structure anormale des centrosomes ainsi qu'un arrangement circulaire des chromosomes (figure 16). Les auteurs observèrent également des défauts de ségrégations des chromosomes ainsi que des cellules polyploïdes, mettant ainsi en évidence le rôle essentiel de la kinase Polo pour la division cellulaire et la diploïdie des larves au cours du développement[206] (figure 16).

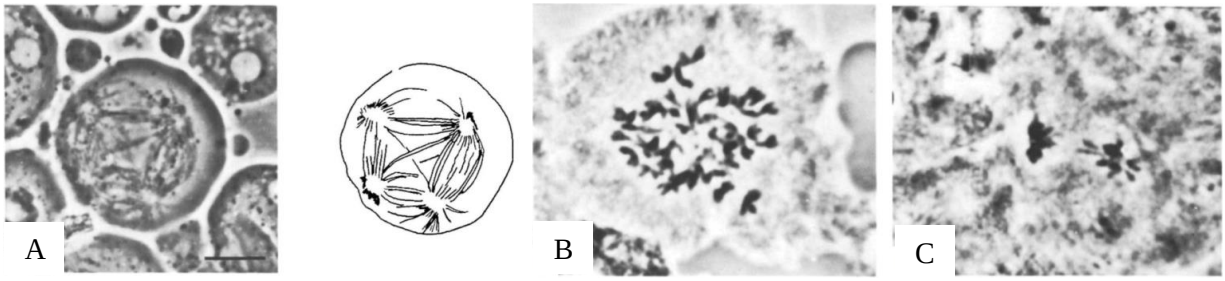


Figure 16 : Phénotypes *polo*$^{-1}$ décrits chez *Drosophila Melanogaster*. Images reproduites d'après[206].

A. Figure d'une cellule avec un fuseau mitotique branché et multipolaire. Panneau de droite: représentation graphique.
B. Figure d'une cellule polyploïde avec des chromosomes circulaires
C. Figure d'anaphase anormale

2) Une famille conservée au cours de l'évolution

Suite à la caractérisation du gène *polo*, les homologues dans toutes les espèces ont par la suite été identifiés. Ces organismes possèdent une ou plusieurs protéines paralogues de Polo ayant des rôles différents au cours du cycle cellulaire [207] (figure 17). Chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, les gènes *CDC5 et plo1* respectivement, présentent une forte similarité de séquence avec le gène *Polo*[208,209]. Tout comme chez la drosophile, les phénotypes majeurs décrit suite à une perte du gène *plo1*$^{+}$ ou dans mutants thermosensibles Cdc5 ^{ts} sont la présence de fuseaux monopolaires ainsi que des défauts en sortie de mitose [208,209]. Chez *Caenorhabditis elegans* et *Xenopus laevis*, trois protéines homologues de Polo ont été identifiées: Plc1/PLK-1, Plc2 et Plc3 [210,211] et Plx1, Plx2 et Plx3 [212] respectivement. Parmi ces membres, PLK-1 / Plx1 possède le plus haut degré d'identité avec la protéine unique des organismes unicellulaires. Plusieurs rôle de la kinase PLK-1 ont été mis en évidence dont notamment un rôle dans la coordination des évènements permettant la rupture de l'enveloppe nucléaire durant la maturation méiotique, dans le déclanchement au moment opportun de l'entrée des cellules en mitose, ainsi que durant la progression et la sortie de mitose [213–217]. Chez le Xénope, Plx1 a été identifiée comme une kinase régulatrice de Cdc25 à partir d'extraits d'ovocytes [218], puis Plx2 et Plx3 ont été découvertes à partir d'une banque d'ADNc à partir d'un criblage à faible stringence en utilisant un fragment d'ADNc de d'un homologue de la protéine humaine (Plk2) comme sonde [212]. Plx1 s'est révélée être impliquée dans différentes étapes de la division cellulaire, incluant la phosphorylation et la translocation nucléaire de Cycline B, l'activation de XCdc25C, la maturation des centrosomes, la formation du fuseau bipolaire, l'activation du complexe APC/C et la cytocinèse [219]. Enfin, chez les mammifères cinq membres de la famille polo-like kinase ont été décrit (Plk1, Plk2, Plk3, Plk4 et Plk5 (qui ne possède pas de domaine kinase)). Parmi ces membres, seul Plk1 et Plk4 sont essentielles au développement embryonnaire[220,221,222].

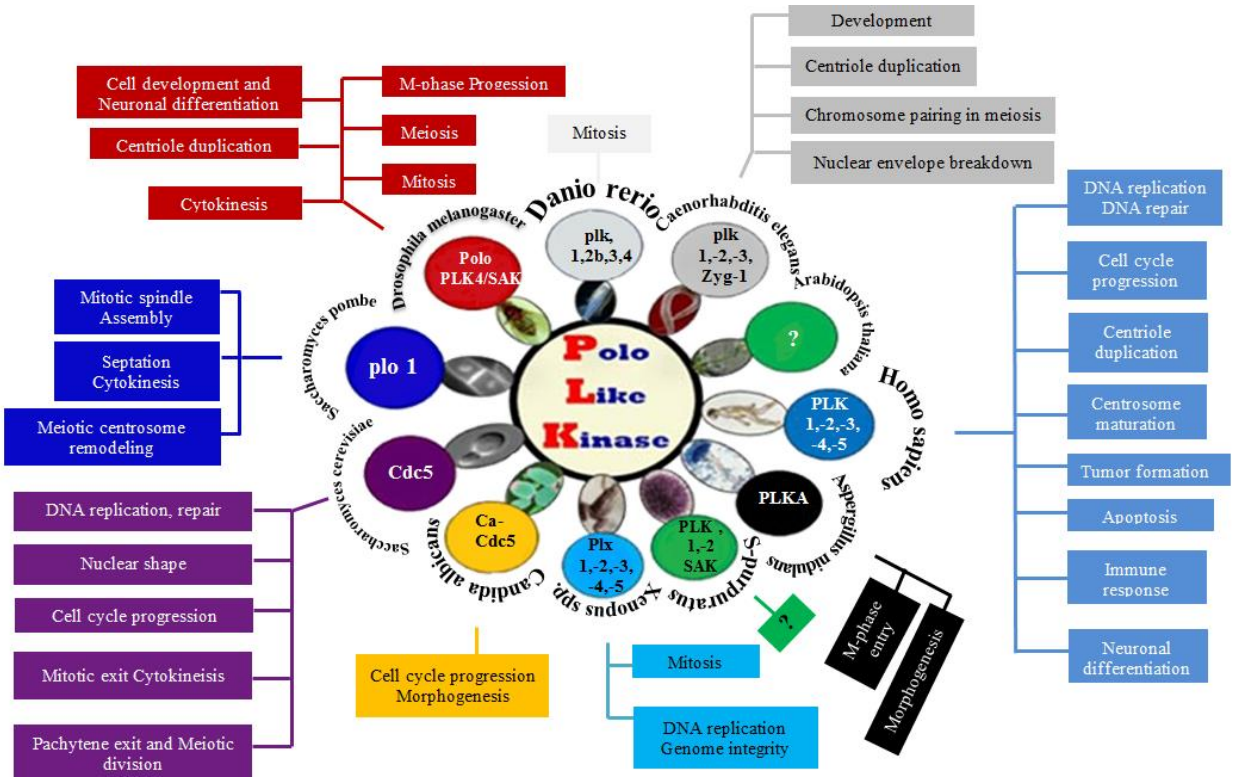


Figure 17 : Figure résumant les fonctions des protéines de type Polo de différentes espèces.

B. Polo-like kinase 1 : organisation structurelle

1) Le domaine catalytique

Plk1 est une serine/thréonine kinase qui possède comme toutes les protéines kinase un domaine catalytique au niveau de la région NH_2-terminale. Ce domaine permet la phosphorylation de résidus sérine et thréonine. Différentes analyses des substrats de Plk1 en mitose par des approches phospho-protéomique quantitatives ont permis d'identifier plus de 400 protéines cibles et de définir un ensemble de séquences consensus pour cette kinase [223,224]. En plus du motif D/E-X-S/T-Ψ-X-D/E, (où Ψ est un acide aminé hydrophobe) initialement décrit par Nakajima et collègues [225], plusieurs variations de ce motif ont été identifiées, avec soit une exigence absolue pour une asparagine en position -2 (N-X-[S/T] et L-N-X-[S/T]), soit une phénylalanine en position +1 ([S / T]- F) [224] (figure 18).

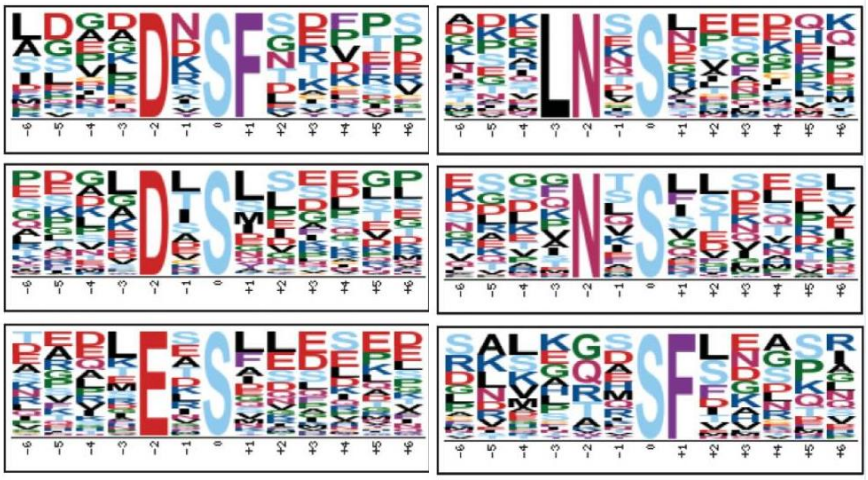


Figure 18 : Séquences consensus phosphorylées par Plk1 (adapté de [224])

Le domaine catalytique de Plk1 présente 11 sous-domaines caractéristiques et spécifiques des sérine/thréonine kinases [226,227] . Les motifs contenus dans les sous-domaines VI (résidus HRDLKLG) et VII (résidus GTPNYIVPE) sont fortement conservés au sein des protéines kinases [227]. Ces domaines forment la boucle d'activation (T-loop) essentielle pour l'activité catalytique de Plk1 [226]. Au niveau de la boucle d'activation, un résidu Thréonine (Thr210 pour la protéine Plk1 humaine), est responsable de l'activation de la protéine lorsqu'il est phosphorylé [228]. Le domaine catalytique possède également des motifs caractéristiques et spécifiques de la famille des Polo-like kinases notamment la région permettant la fixation de l'ATP (poche ATP) avec un motif GxxGGxAxC (résidus 60 à 67) à

la place de la séquence consensus CxGxxGxV présente chez les autres sérine/thréonine kinases [229]. Le site de liaison de l'ATP est situé dans une poche formée entre le lobe NH_2-terminal (résidus 37 à 131) et le lobe COOH-terminal (résidus 138 à 330) du domaine catalytique. Les deux lobes sont connectés par une région charnière sur laquelle repose les interactions avec les substrats [230].

2) Le Polo-box domain ou PBD

La particularité de la kinase Plk1 provient de son domaine carboxy-terminal appelé domaine Polo-box (PBD), identifié à partir d'un crible biochimique comme un domaine de liaison aux résidus phospho-sérine/thréonine [231,232]. Il est constitué de deux boîtes Polo (~80 acides aminés), PB1 (résidus 411 à 492) et PB2 (résidus 511 à 592) et d'une extension amino-terminale (résidus 372 à 410), appelée Polo-cap, qui se replie sur PB2 et stabilise la structure tridimensionnelle [231,233]. Ce domaine présente une forte sélectivité pour un résidu sérine en position -1 du site phosphorylé (pSer/pThr) et une sélectivité plus faible pour un résidu proline en position +1 [183]. La structure tridimensionnelle du domaine Polo-box de Plk1 lié à un peptide substrat (résolution 1.9 A) a permis de constater que les boites PB1&2 présentent un repliement dans l'espace identique malgré une différence notable entre leur séquence primaire (seulement 12 % d'identité) [233] (figure 19). Ces boîtes PB1&2 forment une "pince" représentées par deux moitiés symétriques d'un sillon dans lequel le phospho-peptide est pris en tenaille [231] (figure 19) .

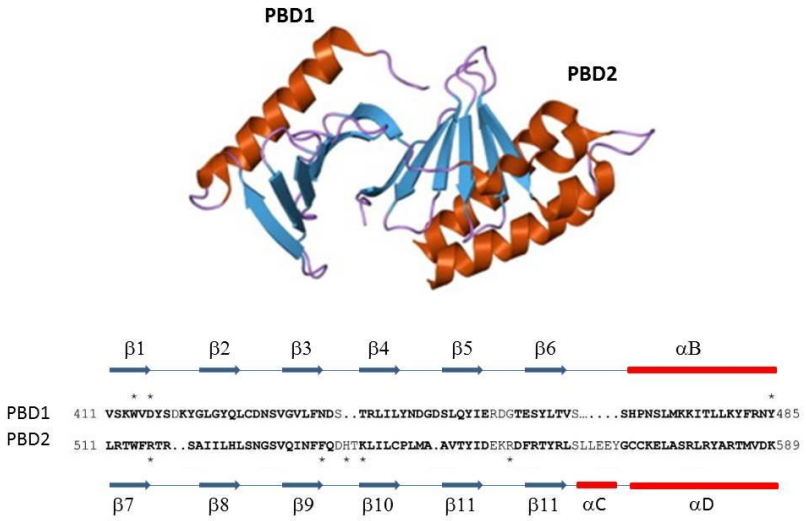


Figure 19 : Alignement de séquence et repliement dans l'espace des Polo-box 1 et 2 (adapté de [233]).

C. Mécanismes de régulation spatio-temporelle de l'activité de Plk1

1) Régulation spatio-temporelle

a) Localisation subcellulaire de Plk1

Pour réaliser ses fonctions biologiques, Plk1 est recrutée au niveau de nombreuses régions subcellulaires très spécifiques au cours du cycle cellulaire [245,246]. En phase G2, Plk1 est recrutée au niveau des centromères, notamment requise pour l'apposition de la protéine composante des centromères, CENP-A [247]. Lors de la transition G2/mitose, Plk1 est enrichie au niveau du centrosome et intervient dans sa maturation[248,249]. En prométaphase et métaphase, elle apparaît liée à la tubuline au niveau des pôles du fuseau mitotique ainsi qu'au niveau des centromères[250], puis sur le plan équatorial du fuseau mitotique en anaphase [251]. La kinase se maintient ensuite au niveau de la région équatoriale jusqu'à la télophase, puis elle va se concentrer au niveau de l'anneau contractile au cours de la cytodiérèse. Enfin, Plk1 se retrouve au niveau du pont post-mitotique reliant les deux cellules filles en fin de division [245,251] (figure 20).

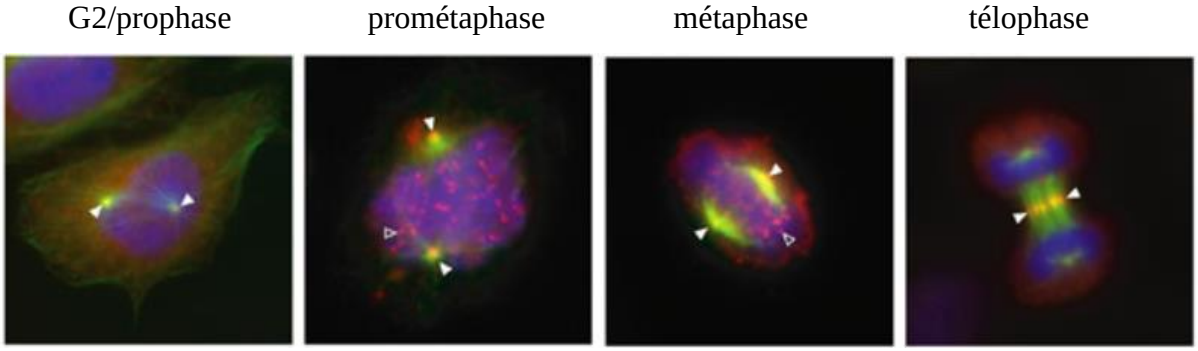


Figure 20 : Localisation subcellulaire de Plk1 au cours de la progression G2 mitose (en rouge Plk1 en bleu marquage ADN en vert marquage tubuline) (D'après [246]).

b) Régulation de la localisation par l'interaction de Plk1 avec ses substrats

La localisation de Plk1 est dépendante de ses interactions avec ses cibles. Par exemple, en phase G1 et S, Plk1 présent en faible quantité, interagit avec plusieurs facteurs constituant le complexe pré-RC tel que Orc2, Hbo1 (human histone acetyltransferase binding to Orc1) ainsi que des membres du complexe Mcm (minichromosome maintenance complex : Mcm2, Mcm3, Mcm7) ce qui contribue à la localisation de la kinase au niveau des origines de

réplication où elle y joue un rôle important [252–254]. Autre exemple, en prophase, Plk1 est recrutée au niveau des bras chromosomiques suite à son interaction avec la protéine Sororine, ce qui entraîne la dissociation des complexes de cohésion [255–257]. En anaphase, Plk1 se localise au niveau des kinétochores via son association avec la protéine centromérique CENPU (centromere protein U ou PBIPI) [258,259].

Une des avancées majeures dans l'identification des différents substrats de Plk1 dépend du travail de Lowery et collaborateurs qui ont recherché les protéines se liant au PBD de Plk1 [260]. Cette étude a permis d'identifier un site consensus d'interaction avec le PBD de Plk1 correspondant au motif minimum Ser-pSer/Thr-Pro/X[260]. Suite à des analyses des substrats de Plk1 en mitose, par des analyses quantitatives phospho-protéomique, plus de 600 protéines ont été identifiées pour leur interaction phosphorylation-dépendante avec Plk1 [260].

L'interaction entre Plk1 et ses cibles est modulée dans l'espace et le temps par l'activité de kinases spécifiques [183,231,233]. En effet, une grande partie des interactions Plk1-substrats actuellement caractérisées impliquent généralement un événement d'amorçage dépendant de la phosphorylation au préalable de ces substrats par une kinase qui phosphoryle la séquence consensus contenant une proline telle que Cdk1 ou les MAPK [183,231,233,261]. Cette étape permet une liaison dite « optimale » de Plk1 avec ses substrats. Par exemple son interaction avec la protéine Sororine dépend de la phosphorylation initiale par Cdk1[257].

Cependant, Plk1 peut également se lié à ses substrats par un mécanisme d'auto-amorçage. Dans ce cas, Plk1 phosphoryle son partenaire d'interaction, créant ainsi un phospho-épitope reconnu par son domaine PBD. Par exemple, Plk1 phosphoryle PRC1 (Protein Regulator of Cytokinesis 1) sur son résidu Thr602 au cours de l'anaphase créant un site d'interaction avec son PBD, lui permettant ainsi de se localiser au niveau du fuseau central [261,262]. De manière intéressante, Cdk1 phosphoryle également PRC1 sur différents sites (Thr470,Thr481)[261]. Cette phosphorylation, contrairement au modèle générale, ne contribue pas à la reconnaissance de PCR1 par le PDB de Plk1, mais à l'inverse, est suffisante pour empêcher une interaction prématurée avant le début de l'anaphase [261].

L' interaction de Plk1 avec ses substrats ne nécessite pas toujours la phosphorylation du motif consensus et peut également se fixer sur certains substrats de manière phosphorylation-indépendante [263]. C'est le cas par exemple pour la protéine associée aux microtubules Map205 chez la drosophile qui recrute Polo sur les microtubules [263]. De manière intéressante, la phosphorylation de Polo au niveau Ser283 par Cdk1 déstabilise le complexe Map205-Polo, rendant Polo disponible pour une localisation vers d'autres endroits.

Enfin, d'autres modifications post-traductionnelles sont également susceptibles d'avoir un rôle dans la localisation de Plk1. Par exemple, lorsque les attaches kinétochores-microtubules sont sous tension, l'ubiquitine ligase CUL3-KLHL22 mono-ubiquitine Plk1 au niveau du résidu Lys492 situé dans son domaine PBD ce qui conduit à la dissociation de Plk1 avec ses partenaires du spindle assembly checkpoint et sa délocalisation[264] (figure21).

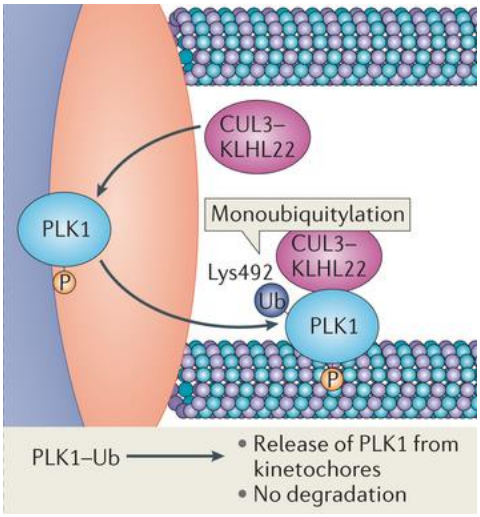


Figure 21 : la mono ubiquitinylation de Plk1 au niveau des kinétochores par l'ubiquitine ligase CUL3-KLHL22 conduit à sa délocalisation. (d'après [265]).

c) Trois résidus W414, H538 et K540, indispensable pour l'interaction de Plk1 avec ses substrats

Différentes études ont permis d'identifier la région du PDB jouant un rôle crucial dans l'interaction de Plk1 avec ses substrats [266,267]. Cette région a été initialement étudiée via l'utilisation du modèle de levure *S. cerevisiae* portant une mutation de *Cdc5*$^{-1}$ thermosensible. Au sein de ces cellules, il a été montré que l'expression de Plk1(humaine) portant une mutation sur le résidu W414F dans le polo-box 1 ne permettait pas de restaurer fonctionnellement les défauts associés à la mutation *Cdc5*$^{-1}$ [268]. Par ailleurs, les auteurs ont également observé que cette mutation était suffisante pour délocaliser Plk1 des pôles du fuseau mitotique et de l'anneau de cytocinèse en mitose, et ainsi perturber sa fonction à ces régions[268]. Des études réalisées dans d'autres organismes ont également confirmé l'importance des résidu His538 et Lys540 du domaine PBD pour la localisation et la fonction de la protéine [269,270]. En effet, il a été mis en évidence que l'expression du domaine PBD portant les mutations H538K et K540M ne parvient pas à se localiser correctement, suggérant

un rôle essentiel de cette région pour une localisation appropriée de Plk1 (figure 22) [266]. Cependant, les travaux de Garcia-Alvarez et collaborateurs ont montré que Plk1 portant les deux mutations H538K et K540M était toujours capable de se localiser au niveau des centrosomes [267,271]. Ces trois résidus sont présent dans la région la plus conservée du PBD et sont impliquées dans la spécificité de reconnaissance des cibles de Plk1 [183]. En effet, la mutation des résidus His538 et Lys540 en alanine inhibe l'interaction de Plk1 avec ses partenaires, confirmant ainsi leur importance dans le fonctionnement du PBD de Plk1 [183].

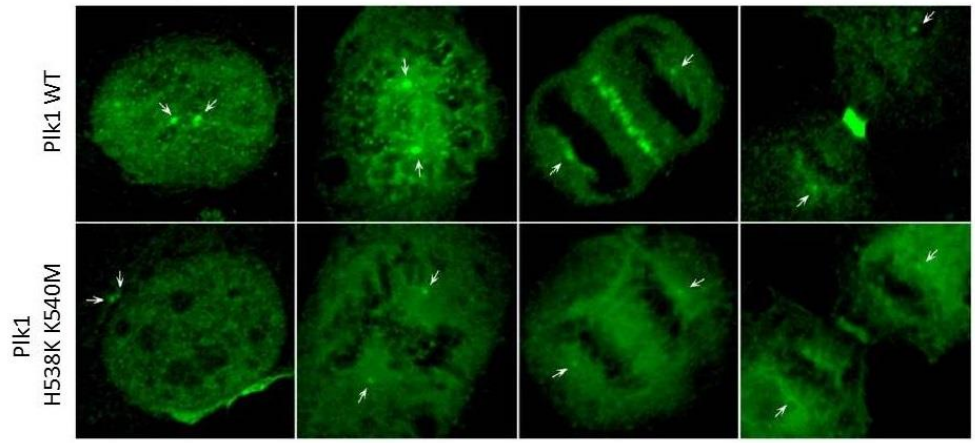


Figure 22 : Le PDB de Plk1 joue un rôle majeur dans la localisation de la protéine (d'après[267]).

d) Une séquence NLS contribue à la régulation de la localisation de Plk1

Plk1 se localise à la fois au cytoplasme mais également au noyau. Généralement les protéines dont la masse moléculaire est supérieure à 50 kDa ne peuvent pas traverser le pore nucléaire par diffusion passive. De ce fait, il a été montré que Plk1 possède deux groupes d'acides aminés basiques, les résidus 134-136 (RRR) et les résidus 143-146 (KRRK) alignés en tandem au niveau de son domaine catalytique qui constituent une séquence d'adressage de la protéine au noyau (NLS)[249]. Alors que cette séquence en tandem est fortement conservée chez Plx1 et Polo, Cdc5 et Plo1 ne possèdent pas le premier groupe d'acides aminés basiques mais contiennent le second [249]. Cette région en tandem est essentielle pour la localisation de Plk1 au noyau puisqu'une mutation de cette région conduit à une localisation de Plk1 exclusivement au cytoplasme. De manière intéressant, les cellules exprimant un mutant de Plk1 pour cette séquence s'arrêtent majoritairement en phase G2, suggérant ainsi que cette

localisation nucléaire de Plk1, dépendante de la séquence NLS, pourrait jouer un rôle dans son activité[249].

2) Régulation du niveau protéique au cours du cycle cellulaire

a) Régulation transcriptionnelle

L'expression de Plk1 est étroitement régulée à la fois à par les niveaux d'ARNm et protéique. Etant faible en phase G1, ils augmentent au cours de la phase S et atteignent leur maximum pendant les phases G2 et mitose pour revenir à un niveau basal en sortie de mitose [234,235]. L'expression du gène *PLK1* est sous le contrôle de divers répresseurs (en phase G1) et d'activateurs transcriptionnels (en phase G2). Au sein du promoteur de Plk1, un élément « core » constitué de deux séquences riche en GC, appelé également SP1, en position -93 à -75 et -65 à -35 ; et une boite « CCAAT » en position -45 à -33, permettent la stimulation de l'activité du promoteur [235]. En effet, une délétion ou une mutation de ces éléments entraine l'abolition de l'activité du promoteur [235]. Cependant, ces éléments ne sont pas impliqués dans le profil d'expression du gène au cours du cycle cellulaire. Le promoteur de PLK1 présente également des séquences CDE-CHR (cell cycle-dependent element et cycle genes homology region) au niveau du +1 de la transcription, qui sont impliquées dans la répression de la transcription. En effet, la fixation de facteurs de transcription comme par exemple CDF-1 (CDE-CHR binding factor-1) sur ces séquences favorisée par les protéines p21 et son activateur p53, bloque activement l'expression de l'ARNm de Plk1 en interférant avec les éléments transactivateurs [236,237]. De plus, chez l'homme et *D. melanogaster*, comme pour le promoteur de Cycline B1, le facteur E2F4 et les protéines de la famille pRB (p107 et p130) collaborent pour se fixer au niveau du site de liaison des protéines E2F1/2, inhibant également la transcription de *PLK1* [238]. Au cours de la progression G2 mitose, les éléments répresseurs CDE/CHR sont inoccupés permettant aux transactivateurs d'induire l'expression du gène. Par ailleurs, le facteur répressif E2F4 est remplacé par les facteurs activateurs E2F1 et E2F2 de la même famille [239]. De plus, chez les animaux et les levures, le complexe Myb-MuvB favorise la transcription de *PLK1* à travers le facteur de transcription de la famille FKH-TF (FoxM1) qui stimule la transcription [5,235]. L'activité du facteur FoxM1 est également stimulée par Plk1 en collaboration avec une activité Cdk1[11] (figure 23).

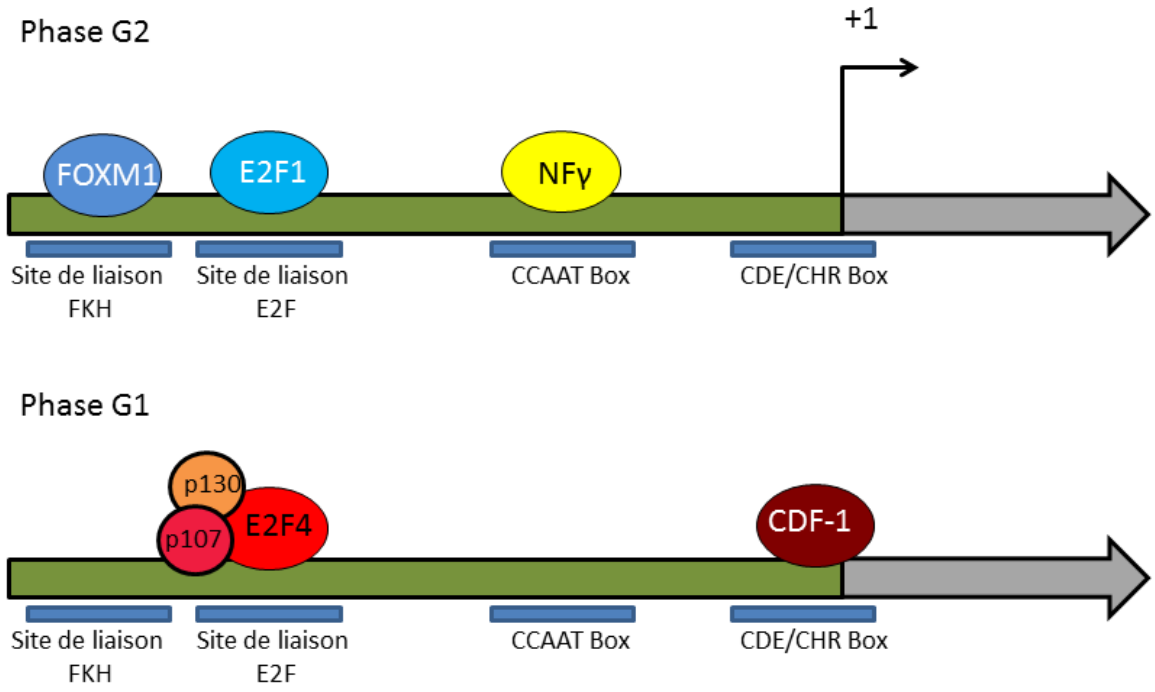


Figure 23 : Régulation de la transcription de Plk1 au cours des phases G1et G2.

b) Régulation de la stabilité protéique

Deux protéines chaperonnes, Hsp90 (90 kDa heat-shock protein), et CCT (chaperonin-containing TCP1 complex) assistent et stabilisent le repliement de la protéine Plk1 en agissant au niveau de son domaine COOH-terminal, lorsque la protéine est synthétisée [240,241]. Le rôle de ces chaperonnes est indispensable pour l'activité de Plk1 puisqu'un défaut de l'une de ces protéines conduit à un arrêt de la progression dans le cycle [241]. Cependant, Plk1 a une demi-vie intracellulaire assez courte[242]. En effet, la kinase est soumise à une protéolyse par le protéasome de manière ubiquitine-dépendante. Sa dégradation, qui prend place au cours de l'anaphase, est déclenchée par l'ubiquitine ligase E3 APC/C (complexe promoteur de l'anaphase) activée par son co-facteur CDH1[242] (Figure 21). CDH1 reconnaît une boîte de destruction (D-box) identifiée comme un motif RXXL D-box-like (Arg337 dans Plk1) [242]. La dégradation de Plk1 au moment opportun est cruciale pour redémarrer le cycle cellulaire. En effet, une mutation de ce motif de destruction (R337A et L340A) entraîne un défaut de reconnaissance de Plk1 conduisant à sa stabilisation et à un retard de la sortie de mitose [242]. Ce motif est conservé chez *X. laevis* (Plx1) et *D. melanogaster (*Polo), mais il est absent chez la levure à fission (Plo1)[243]. Par ailleurs, les niveaux de Plo1 restent stables pendant le cycle cellulaire, ce qui pourrait être lié à la durée relativement courte de la phase G1 dans cet organisme

unicellulaire[243]. De manière intéressante, bien que Plk1 soit dégradée en sortie mitose dans la plupart des espèces, paradoxalement, elle est nécessaire pour la cytocinèse[244], ce qui suggère que d'autres niveaux de régulation doivent exister (par exemple, une dégradation localisée, une activation localisée ou des affinités différentes pour différents substrats).

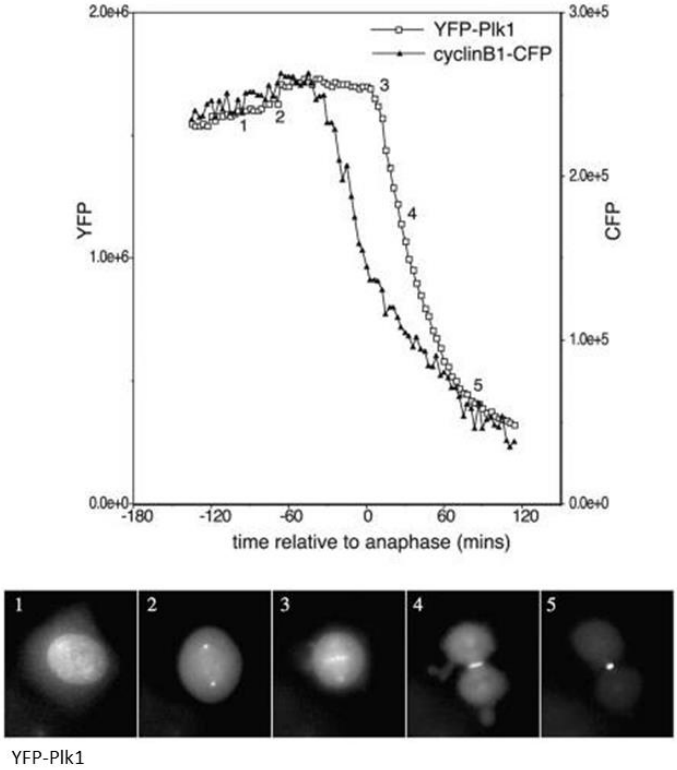


Figure 21 : Cinétique de dégradation de Plk1 en sortie de mitose.

3) Régulation de l'activité enzymatique

a) Régulation de l'activité catalytique via le PDB

Le PDB de Plk1 permet une régulation de l'activité catalytique de Plk1. En effet, des études mettent en évidence que l'expression du domaine PBD seul inhibe l'activité de la kinase Plk1 endogène[272]. Par ailleurs, la suppression du domaine PDB augmente considérablement l'activité kinase de Plk1 *in vitro* [268,273] . Des études de la structure de Plk1 lié à un motif de liaison au PDB de la protéine Map205 ont permis de révéler que la protéine se trouve dans un état auto-inhibé suite à l'interaction du PBD avec le domaine catalytique permettant une inhibition mutuelle de l'activité des deux domaines[274] . Cette même étude propose également que dans cet état auto-inhibé la boucle d'activation de Plk1 se retrouve

séquestrée par le linker reliant le domaine catalytique et le PBD. Enfin, il est suggéré que la liaison du PBD à protéine Map205 stabilise l'état auto-inhibé et empêche l'interaction de Plk1 avec d'autres partenaires[274].

b) Activation de Plk1 par phosphorylation de la boucle d'activation

Comme beaucoup de protéines kinases, Plk1 est activée par phosphorylation au niveau de sa boucle d'activation (T-loop). En effet, il a été proposé que la phosphorylation de Plk1 au niveau de sa boucle d'activation, permet de stabiliser cette région dans une conformation dans laquelle les résidus importants du site actif sont correctement positionnés favorisant ainsi l'activité catalytique de Plk1[207,229,272,275]. Il a également été proposé que cette phosphorylation bloque la protéine dans une conformation ouverte, où les deux domaines (catalytique et PDB) de Plk1 sont dissociés. Plusieurs travaux dans différentes espèces ont montré que la phosphorylation de la T-loop se produit au niveau d'un résidu fortement conservé de la levure à l'humain, et parmi les différentes Plks. Il s'agit du résidu Thr210 dans Plk1 et du résidu Thr201 dans Plx1[207,229,272,275,276] (figure 26).

Durant plusieurs années, l'identité de la kinase responsable de cette phosphorylation est restée élusive. Une première kinase agissant en amont a été identifiée (xPlkk1 chez *Xenopus laevis*; Ste20-like kinase chez les mammifères ; dPlkk chez la Drosophile) mais son importance biologique pour l'activation de Plk1 a été par la suite infirmée [277–280]. Une avancée majeure dans le mécanisme de régulation de Plk1 a été l'identification de la kinase Aurora-A, comme étant l'activateur direct de Plk1 avant l'entrée des cellules en mitose; à la fois au cours d'un cycle cellulaire non perturbé, mais également après la reprise du cycle cellulaire suite à l'activation du point de contrôle aux dommages à l'ADN en phase G2 [281,282]. Par ailleurs, la déplétion d'Aurora-A par ARN interférence ainsi que l'inhibition de son activité par l'ajout d'un inhibiteur, MLN-8054, inhibe la phosphorylation du résidu Thr210 de Plk1 *in vivo*, suggérant un rôle essentiel de la kinase Aurora-A dans l'activation de Plk1, mais également l'absence d'une autre kinase susceptible de phosphorylé ce site [281].

Dans ce mécanisme d'activation de Plk1 par Aurora A, à la fois dans les cellules humaines et chez *C. elegans* il a été montré que l'interaction de Plk1 avec son co-facteur hBora (SPAT-1 l'homologue chez *C. elegans*) est absolument essentielle pour la

phosphorylation du site T210 [282,283] (figure 25). En effet, la déplétion de hBora par ARN interférence conduit à une inhibition de la phosphorylation du résidu T210 par Aurora-A conduisant à un délai de l'entrée des cellules en mitose [282]. Ce co-facteur, dont l'expression augmente progressivement en phase G2 [284], s'associe avec les deux domaines PDB et catalytique de Plk1 conduisant à un changement de conformation de cette dernière, rendant accessible la boucle d'activation de Plk1, initialement masqué par le domaine PDB [282]. Tant dans les cellules humaines que dans les embryons de *C. elegans*, il a été observé que Plk1/ PLK-1 interagit avec la forme phosphorylé de hBora / SPAT-1 ce qui suggère que l'interaction entre hBora / SPAT -1 et Plk1 / PLK-1 pourraient être régulée par la phosphorylation de hBora / SPAT -1. En accord avec cette hypothèse, la forme phosphorylée de hBora s'accumule progressivement au cours de la transition G2-M[282]. Cependant, Seki et collaborateur ont montré que l'interaction hBora / Plk1 est résistant au traitement par des phosphatases, ce qui suggère que la phosphorylation de hBora est dispensable pour son interaction avec Plk1 ou du moins n'est pas nécessaire pour maintenir cette interaction [282]. Néanmoins d'autres études ont montré que cette interaction est grandement améliorée lorsque hBora est préalablement phosphorylée par une activité Cdk en de multiples sites, suggérant fortement que Cdk1 facilite tout de même la liaison de hBora à Plk1[283,285]. En effet, chez *C. elegans*, il a été constaté que la phosphorylation de SPAT-1 par un complexe Cycline (A ou B)-Cdk1 est strictement nécessaire pour déclencher son interaction avec PLK-1, et ainsi promouvoir la phosphorylation de PLK-1 au niveau de sa boucle d'activation [283,285]. Treize sites de phosphorylation de SPAT-1 par Cdk1 ont été identifié *in vitro*, parmi lesquels au moins 7 sont également phosphorylés *in vivo*. Suite à une cartographie des sites de phosphorylation critique pour l'activité de SPAT-1, il a été déterminé que les sites de phosphorylation situés dans la partie N-terminale (la plus conservée de la protéine) sont essentiels à la fonction de SPAT-1. La région N-terminale de SPAT-1 contient un site reconnu par le PDB de Plk1 (S251) suite à sa phosphorylation par une activité Cdk1 [283,285,286]. Cependant, il a été montré que la mutation de ce site n'empêche pas l'interaction de PLK-1 avec SPAT-1 sous sa forme phosphorylée par Cdk1, *in vitro*. En accord, il a été montré que l'expression d'un mutant de SPAT-1 S251A est suffisante pour restaurer l'activité de SPAT-1 suite à sa déplétion par ARN interférence. Par ailleurs, Seki et collaborateurs ont également montré que le site reconnu par le PDB de Plk1 n'est pas requis pour l'activation de Plk1 par hBora et Aurora A [282]. Ces observations suggèrent que le site reconnu par le PDB de Plk1 n'est pas essentiel pour l'interaction de hBora / SPAT-1 avec Plk1 / PLK-1 et l'activation subséquente de ce dernier. Plus récemment, 3 sites de phosphorylation conservés entre

espèces (S41, S112, and S137), situés dans la région N-terminale de hBora et SPAT-1 ont été identifiés comme étant essentiels pour l'activité de hBora et SPAT-1, à la fois *in vitro* et *in vivo*[285]. Par ailleurs, il a été montré que la mutation de ces résidus serine en alanine non-phosphorylable supprime la capacité de hBora et SPAT-1 à activer Plk1 *in vitro* et *in vivo*[285]. Néanmoins, il reste à déterminer quel complexe Cycline A2-Cdk1 ou Cycline B1-Cdk1 est responsable de cette phosphorylation et à quel moment prend place cette phosphorylation. Il ne fait aucun doute que l'interaction hBora-Plk1 constitue un élément de régulation essentiel de l'activité de Plk1, cependant il reste à étudier le(s) mécanisme(s) d'action par le(s)quel(s) cette interaction favorise la phosphorylation de Plk1 par Aurora A et de ce faite son activation. Plusieurs scénarios peuvent être envisagés : d'une part cette interaction permet la libération de la boucle d'activation de Plk1 la rendant accessible pour Aurora A, d'autre part elle pourrait favoriser un rapprochement des kinases Plk1 et Aurora A, mais également réguler l'activation de Plk1 au moment opportun.

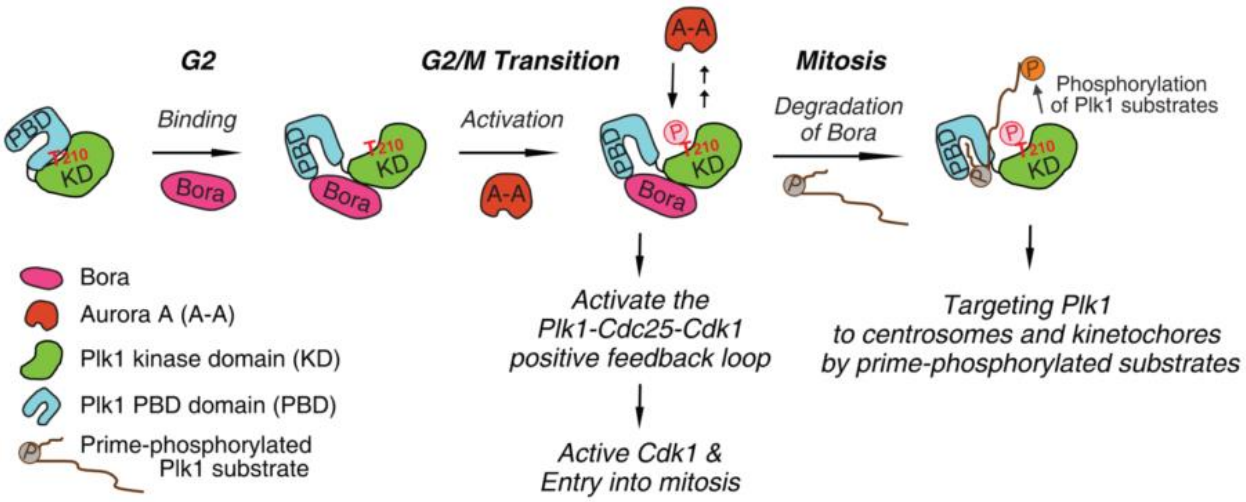


Figure 25 : Activation de Plk1 par le co-facteur hBora et la kinase Aurora-A. D'après[282]

Une fois en mitose, le complexe Bora-Plk1 actif est susceptible d'interférer avec l'interaction de Plk1 et ses substrats. Cet effet inhibiteur de Bora est contrebalancé par sa dégradation par le protéasome de manière ubiquitine dépendant [284]. Cette dégradation est dépendante de Plk1. En effet, lorsqu'elle devient active, Plk1 phosphoryle hBora sur un dégron DSpGXXSp, ce qui conduit à son ubiquitination par le complexe Skp1-Cullin-F box (SCF)-β-TrCP [284] et à sa dégradation partielle en mitose [287,288]. La dégradation de hBora en mitose va permettre de libérer Plk1 qui peut alors s'associer avec d'autres substrats lui

permettant d'assurer ses fonctions en mitose. Par ailleurs, l'expression d'une forme non-dégradable de hBora conduit à un retard de l'entrée en anaphase [287], suggérant un rôle important de la dégradation de hBora en mitose.

Un autre résidu, la Ser137, compris dans une séquence proche de celle au voisinage retrouvée de la Thr210, est phosphorylé *in vivo* [272,289]. De manière intéressante, les séquences d'acides aminés entourant les sites Ser137 et Thr210 sont très similaires, ce qui suggère que les deux sites pourraient être phosphorylés par la même kinase (figure 26). Par ailleurs, une mutation de ce résidu en Aspartate augmente l'activité de la kinase Plk1 d'un facteur 3 *in vitro* [272]. Cependant, l'expression d'un double mutant S137A (non phosphorylable) / T210D (mimant la phosphorylation du site) produit une activation complète de Plk1, remarquablement semblable à un mutant T210D [281]. De plus, il a été montré que cette phosphorylation prend place après la phosphorylation du résidu T210 et essentiellement en mitose[289]. Par ailleurs suite à l'analyse de la structure de Plk1, il a été proposé que cet élément de phosphorylation permet d'empêcher l'interaction des domaines PDB et catalytique de la kinase[274]. Ces observations suggèrent que la phosphorylation du résidu Ser137 n'est pas nécessaire pour l'activation initiale de Plk1, mais pourrait permettre d'augmenter et /ou stabiliser l'activité catalytique de la kinase en mitose. Enfin, il a également été proposé que la phosphorylation de ce résidu pourrait moduler la spécificité de Plk1, et conduire à la phosphorylation de cibles alternatives [290].

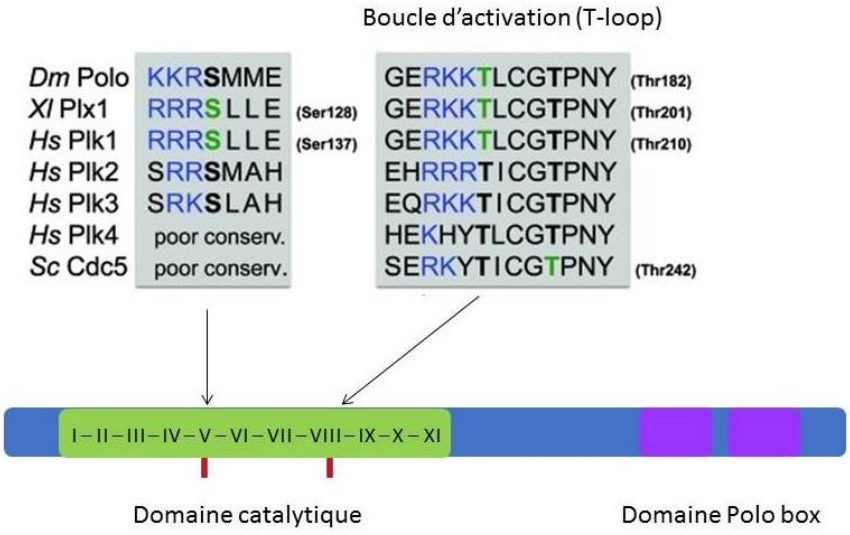


Figure 26 : Position et séquence consensus du résidu Ser137, et du résidu essentiel pour l'activation de Plk1 Thr210.

c) Les phosphatases opposées à l'activité Plk1

Initialement, le complexe phosphatase PP2A/B56 a été identifié comme s'opposant à l'activité de Plk1 en mitose, notamment au niveau des kinétochores pour empêcher la séparation précoce des chromatides [291]. Par ailleurs, la déplétion de la sous-unité B56 par ARN interférence entraîne une augmentation de la phosphorylation des substrats de Plk1 en prométaphase, au niveau des kinétochores, mais également une augmentation du recrutement de Plk1 [292].

Parallèlement, les travaux de Yamashiro et collaborateurs suggèrent également un rôle de la phosphatase PP1 dans la régulation de l'activité de Plk1 en mitose[293]. MYPT1 (Myosin phosphatase-targeting subunit 1) est une des sous-unités régulatrices de PP1 interagissant avec la sous unité catalytique PP1Cβ. MYPT1 est phosphorylée en mitose sur trois résidus cibles de Cdk1 et sa phosphorylation sur le résidu Ser473 permet l'ancrage du PDB de Plk1 *in vitro*. La déplétion de MYPT1 par ARN interférence *in vivo* entraîne une augmentation de la phosphorylation de Plk1 sur le résidu Thr210 [293]. Par conséquent, le complexe MYPT1-PP1C pourrait s'opposer à la phosphorylation du résidu Thr210 et au processus d'activation de Plk1 (figure 27). De manière plus surprenante, la déplétion de MYPT1 restaure l'arrêt en mitose provoqué par une déplétion partielle de Plk1 ainsi que la prolifération cellulaire. Ce résultat suggère donc que le complexe MYPT1-PP1C pourrait également s'opposer à la phosphorylation de cibles de Plk1 en mitose et pas seulement s'opposer à la phosphorylation du résidu Thr210 [294,295].

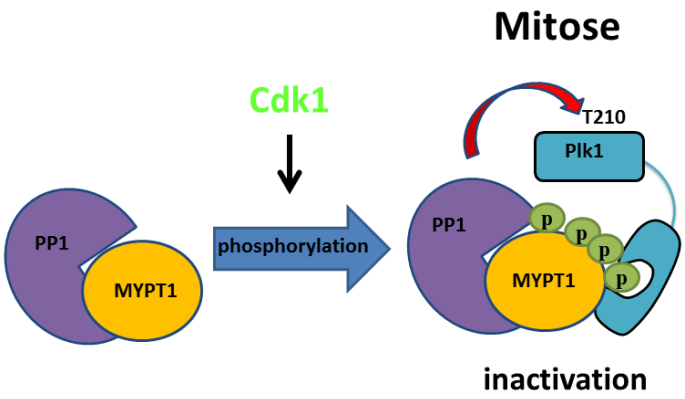


Figure 27 : Inactivation de Plk1 en mitose par le complexe MYPT1-PP1C.

4) Cinétique d'activation de Plk1

La régulation spatio-temporelle de l'activité de Plk1 au cours de la progression en phase G2 et mitose reste controversée. Initialement, il a été déterminé par des analyses biochimiques via le suivi de la phosphorylation du résidu T210, à partir de populations de cellules synchronisées, que l'activité de Plk1 présentait une augmentation rapide en fin de phase G2, très proche de la cinétique d'activation de Cycline B1-Cdk1 [296]. Plus récemment, un premier biosenseur FRET de l'activité de Plk1 a été développé [281]. Contrairement aux résultats obtenus par les analyses biochimiques, une augmentation linéaire de l'activité de Plk1 commençant ~ 6h avant l'entrée en mitose a été observée. Les analyses du suivi de la cinétique d'activation de Plk1, via l'utilisation de ce rapporteur FRET, suggèrent qu'une augmentation de l'activité de Plk1 prend initialement place au noyau, ce qui est en contradiction avec les résultats d'immunofluorescences (via l'utilisation de l'anticorps anti Plk1 Thr210P) qui détecte la forme active de Plk1 dans le cytoplasme, principalement au niveau des centrosomes [288,295]. Ces différences pourraient s'expliquer par le faite que Plk1 présente une activité basale nucléaire en interphase. Le site de phosphorylation utilisé pour la conception du rapporteur d'activité correspond à un site retrouvé dans la kinase Myt1. Il est intéressant de noter que ce site a été identifié dans les conditions où les cellules surexprimaient à la fois Myt1 et Plk1 de manière exogènes [297]. Par ailleurs, il a été montré que le rapporteur FRET utilisé est également phosphorylé, au moment de l'entrée en mitose, par une autre kinase mitotique Mps1 dont les sites consensus de phosphorylation sont relativement proches de ceux de Plk1[281]. Ainsi, l'étude de la cinétique d'activation de Plk1 au moment de l'entrée en mitose via l'utilisation de ce biosenseur est compromise par cette phosphorylation[281]. Par ailleurs, l'augmentation linéaire observée via l'utilisation du biosenseur pourrait refléter l'accumulation progressive de la protéine en phase G2. Une partie de mes travaux de thèse a été l'élaboration d'un biosenseur permettant spécifiquement un suivi de l'activité de Plk1 au cours de la transition G2-mitose.

D. Polo-like kinase 1 : activateur de l'entrée en mitose ?

Plk1 est une kinase multifonctionnelle, nécessaire pour une progression appropriée du cycle cellulaire [245,298,299] (figure 28). Des progrès récents dans le développement d'inhibiteurs de petites molécules ont permis de révéler de nombreux rôles essentiels de Plk1 au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Plk1 initialement décrite comme une kinase mitotique, assure de multiples fonctions telles que la maturation des centrosomes [300], la formation d'un fuseau mitotique bipolaire [301], la libération des cohésines au niveau des chromosomes[302], la ségrégation des chromosomes, l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C en sortie de mitose [303] et enfin au cours de la cytocinèse [245,246,304]. Plus récemment, suite à l'évolution des outils utilisés, de nouveaux rôles de Plk1 en dehors de la mitose ont été mis en évidence notamment au cours de la réplication de l'ADN, de la réparation des dommages à l'ADN [305] et la fragmentation du golgi [306,307]. Plusieurs régulateurs directs du complexe cycline B1 Cdk1 ont été retrouvés au moins in vitro phosphorylé par Plk1, ainsi l'une des questions abordée par de nombreuses études a été de déterminer si cette kinase joue également un rôle dans le déclanchement de l'entrée des cellules en mitose, à travers l'utilisation de différents modèles d'études. Ainsi, dans cette partie je vais aborder l'importance de Plk1 pour l'entrée des cellules en mitose par modèle d'étude utilisé.

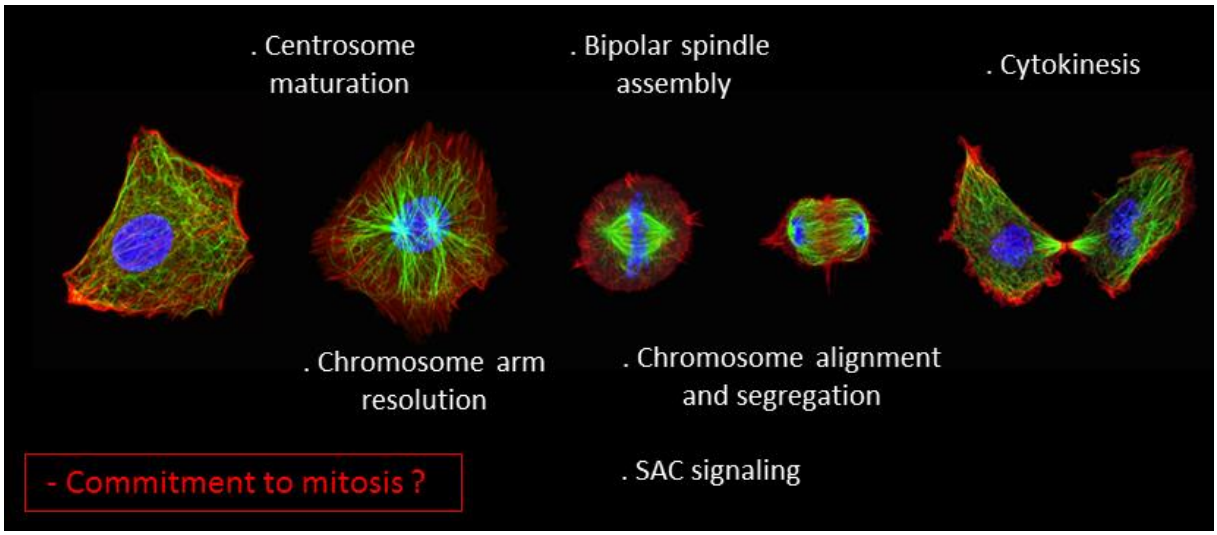


Figure 28 : Fonctions biologiques de Plk1 en mitose.

1) Cas chez le modèle d'étude *Xenopus laevis*

Les études de la régulation du cycle méiotique chez les ovocytes de Xénope font partie des premiers travaux à suggérer que la kinase Plk1 joue un rôle essentiel dans l'activation de Cdk1[280,308,309]. Plx1, l'homologue de Plk1 chez le Xénope, a été initialement découverte grâce aux travaux d'Izumi et Maller, recherchant les mécanismes responsables de l'activation de XCdc25C (*Xenopus laevis* Cdc25C). Les auteurs ont mis en évidence que Plx1 était capable de phosphoryler XCdc25C en absence de Cdk2 et Cdc2 [310]. Plx1 a été purifiée et identifiée comme un partenaire protéique de XCdc25C capable d'induire la phosphorylation et son activation de ce dernier[218]. Par la suite, il a été déterminé que la cinétique d'activation de Plx1 était très proche de celle de XCdc25C (formes hyperphosphorylées) et Cycline B1-Cdk1 (test H1 kinase) au cours de la maturation méiotique (+ progestérone) [308].

Plusieurs travaux ont montré que l'inhibition de Plx1 soit par l'injection d'anticorps anti-Plx1, soit par déplétion de Plx1, est associée à un retard de la phosphorylation de XCdc25C, et de l'activation de Cycline B-Cdk1 [276,308,311]. Pour exemple, Qian et collaborateurs ont montré que des blastomères injectés par l'anticorps anti-Plx1 cessent de se diviser une ou deux divisions après injection, tandis que les cellules témoins injectées par l'anticorps anti- IgG continuent à se diviser normalement [308] (Figure 29). Dans ces expériences, il a été estimé qu'environ 90 % de l'activité Plx1 (suivi de l'état de phosphorylation de Plx1) était inhibée [308]. De manière intéressante, dans ces conditions, l'injection de XCdc25C supprime les effets sur le retard de l'activation du MPF, suggérant que ce dernier agit en amont de XCdc25C et CyclinB1-Cdk1[308].

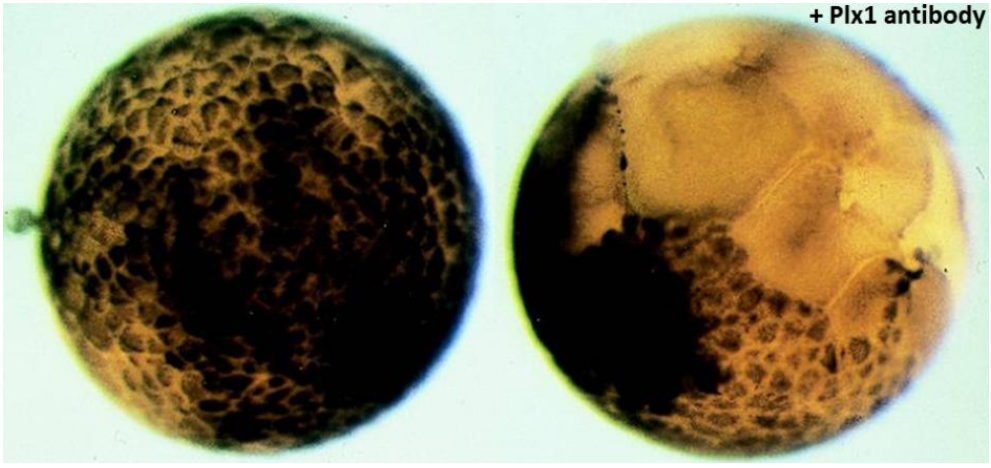


Figure 29 : L'anticorps ant-Plx1 ou l'IgG témoin ont été micro-injecté dans un blastomère d'un embryon à deux cellules, et le développement embryonnaire a été surveillé avec un microscope à dissection (d'après [308]).

Ultérieurement, des expériences similaires ont montrées qu'alors que l'inhibition partielle (90 % d'inbition) de Plx1 conduit à un retard de l'activation de XCdc25C et de Cycline B1-Cdk1, la déplétion complète aboli complètement l'activation de XCdc25C et Cycline B1-Cdk1 [309]. Ces résultats suggèrent qu'une activité résiduelle de Plx1 serait suffisante pour promouvoir l'activation de XCdc25C et de Cycline B1-Cdk1. D'autre part, l'injection de Plx1 WT dans des ovocytes (stade VI) stimulé par ajout de progestérone, accélère l'activation de XCdc25C et Cycline B1-Cdk1 d'une heure par rapport à l'ajout du buffer seul [308]. De plus, il a été montré que l'injection d'une forme constitutivement active de Plx1 (double mutant T201D, T128D) dans des ovocytes de stade VI non stimulé par la progestérone, est suffisante pour permettre l'activation de XCdc25C et de Cycline B1-Cdk1, suggèrant que Plx1 est une kinase initiatrice de l'entrée en mitose[276]. En complément, les travaux d'Abrieu et collègues ont montré que bien que la kinase Plx1 soit requise pour l'activation de Cycline B-Cdk1, l'addition du complexe Cycline B-Cdk1 purifié et actif, dans des extraits d'ovocytes de Xénopes arrêtés en phase G2 et dépourvus de Cyclines, provoque l'activation de Plx1, suggérant l'existence qu'une boucle de rétroaction positive entre Cycline B1-Cdk1et Plx1. Ensemble, ces travaux soutiennent un rôle essentiel de l'activité de Plx1 pour la régulation de la transition G2 / mitose chez le Xénope.

2) Cas chez le modèle d'étude levure *S.pombe* et *S.cerevisiae*

Les études menées chez la levure *S.pombe* et *S.cerevisiae* suggèrent plutôt que l'activité de Plk1 n'est pas absolument requise pour l'engagement mitotique, mais sa présence permet une augmentation rapide de l'activité de Cdk1. Chez la levure *S. cerevisiae*, Mortensen et collaborateurs, ont montré que Cdc28 (l'homologue de Cdk1) est nécessaire pour maintenir l'activité de Cdc5 (l'homologue de Plk1) *in vivo* [312]. En outre, les auteurs ont observé que Cdc28 purifiée et associée à la Cycline mitotique Clb2 (l'homologue de Cycline B) est suffisante pour activer Cdc5 *in vitro*. Un seul site de phosphorylation par Cdc28 localisé dans la boucle d'activation de Cdc5 (Thr242) a été déterminé comme nécessaire pour la fonction Cdc5 *in vivo* et pour l'activité kinase *in vitro*, tandis que quatre autres sites phosphorylés par Cdc28 sont dispensables. Ces résultats suggèrent que Cdc28 active Cdc5 via la phosphorylation du résidu Thr242 [312]. Chez la levure *S. pombe,* la kinase Plo1 (Plk1) a été montrée comme participant à la régulation du MPF pour initier le moment de l'engagement en mitose [313,314]. En effet, il a été observé qu'une activation locale du MPF au niveau de la structure équivalente au centrosome le « Spindle Pole Body » (ou SPB), initie l'activation de

Plo1 aux SPB bien avant que l'activation globale du MPF ne génère l'engagement mitotique[314]. Plo1 est recrutée au niveau du SPB ~30min avant la septation des cellules[314]. Une inhibition du recrutement de Plo1 aux SBP est associée à un retard de l'activation globale du MPF (suivi par la phosphorylation de l'histone H1) et l'entrée en mitose, alors que son recrutement prématuré promeut l'entrée en mitose des cellules[314].

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activation de Plk1 chez la levure est dépendante d'une activité Cdk1 en amont. Les études menées chez *S.pombe*, proposent qu'en phase G2, le recrutement de Plo1 au niveau du SPB est dépendant d'une activité locale du MPF, et constitue un évènement d'amorçage pour l'activation globale du MPF, initiant l'entrée en mitose (figure 30).

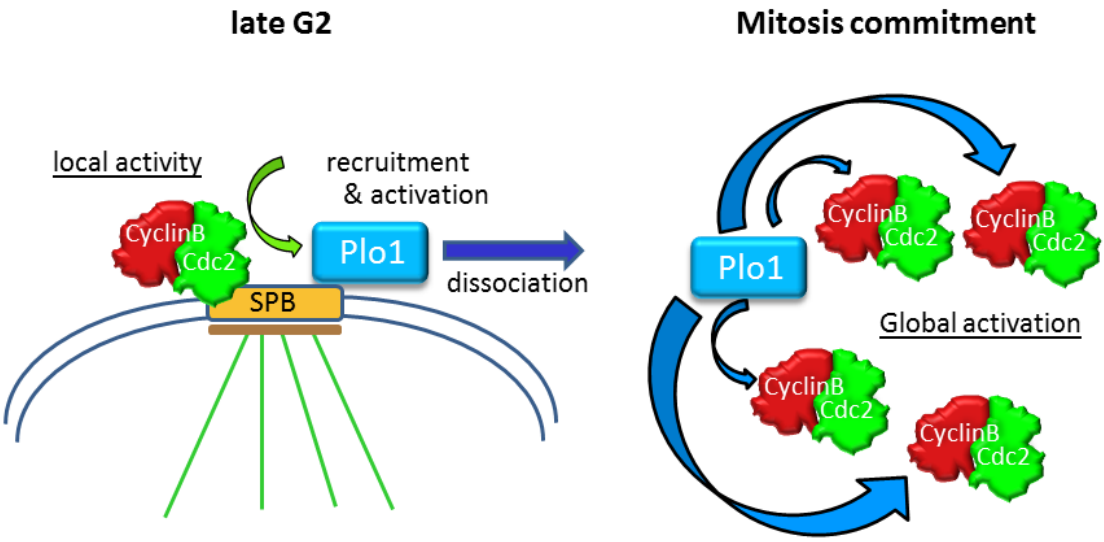


Figure 30 : Modèle concernant le rôle de Plo1 dans le processus d'activation de CyclineB-Cdc2 et l'entrée en mitose.

3) Cas chez le modèle d'étude de souris

Les fonctions physiologiques *in vivo* de la kinase Plk1 chez les mammifères ont été abordées suite à la génération de modèles de souris dont le gène *PLK1* a été inactivé. La première génération de souris hétérozygotes et homozygotes mutantes de Plk1 a été réalisée par Lu et collaborateurs [220]. L'absence complète de Plk1 conduit à une létalité embryonnaire précoce alors que les souris hétérozygotes $Plk1^{+/-}$ développent des tumeurs spontanées au niveau d'organes variés avec une fréquence trois fois plus élevée que leurs homologues WT ($Plk1^{+/+}$), ce qui pourrait suggérer que la protéine Plk1 est haplo-insuffisante pour la

ségrégation chromosomique en mitose et le maintien de la stabilité génétique [220]. Les auteurs ont mis en évidence que le développement des embryons homozygotes Plk1$^{-/-}$ s'arrêtent de manière très précoce au stade huit cellules en absence de figures mitotiques observables (marquages DAPI et phospho-histone H3), suggérant un rôle essentiel de Plk1 dans le processus d'entrée en mitose au moins au cours du développement embryonnaire [220] (figure 31).

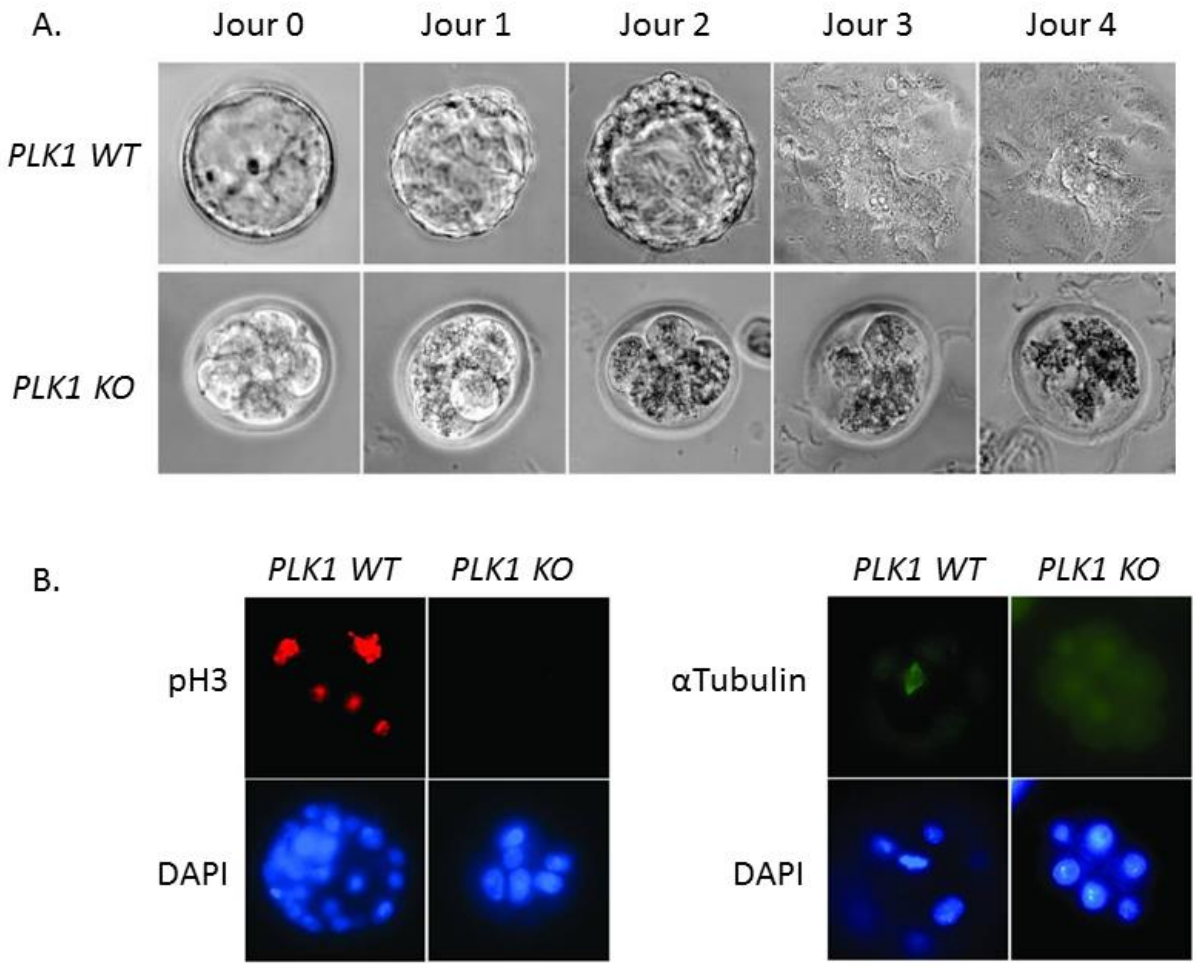


Figure 31 : Des embryons homozygotes Plk1$^{-/-}$ s'arrêtent de manière très précoce au stade huit cellules en absence de figures mitotiques.

Suivit du développement de l'embryon en contraste de phase (A) ou par immunofluorescence (B).

Plus récemment, une autre équipe a développé des souris dont le gène Plk1 a été inactivé, en utilisant une approche d'inactivation conditionnelle (Plk1$^{lox/lox}$) [315]. Les auteurs ont observé que l'inactivation de Plk1 (Plk1$^{-/-}$) conduit à un arrêt précoce du développement des embryons dont 42% des blastomères présentent des phénotypes mitotiques avec une

pénétrance variable (fuseaux mono- ou multipolaires, chromosomes non-alignés). D'autre part, en utilisant des fibroblastes embryonnaires (MEFs) dont le gène *PLK1* est inactivé de manière conditionnelle, seulement 10% des fibroblastes présentent un phénotype mitotique, ce qui pourrait suggérer que la majorité de ces cellules s'arrêtent avant l'entrée en mitose [315]. Pour conclure, les différences notables avec les travaux précédents concernant le développement précoce des embryons *PLK1* $^{-/-}$ pourraient être dues à la dilution du pool maternel d'ARNm de Plk1 et/ou à une différence du « fond génétique » des souris utilisées.

4) Cas chez le modèle d'étude de lignées de cellules de mammifères

a) Importance au cours d'un cycle non perturbé ?

Dans les cellules de mammifères en culture, les études concernant le rôle de Plk1 dans le contrôle de l'entrée en mitose, par des approches d'inhibition de son expression et/ou de son activité ont données des résultats contradictoires. Initialement, il a été montré que l'inhibition de l'activité Plk1, par injection d'anticorps, dans des cellules humaines non transformées conduit à un arrêt prononcé en phase G2 alors que l'inhibition de Plk1 dans des cellules cancéreuses (HeLa) entraîne un ralentissement de la progression G2/M suivi d'un arrêt en mitose [300]. De manière similaire, d'autres études réalisées à partir de lignées cellulaires humaines d'origine cancéreuse (HeLa, U2OS) montrent que la déplétion de Plk1 par ARN interférence, ou encore son inhibition via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques (BI2536), sont associées à un délai de la progression en phase G2, suivi par un arrêt prononcé en mitose [300,316,317].

La différence notable observée entre cellules cancéreuses et cellules non transformées suite à l'inhibition de Plk1 pourrait être liée à une surexpression et/ou suractivation de Plk1 dans les cellules tumorales, comme suggéré par différentes études (pour revue [318]). Il est ainsi possible que l'inhibition complète de l'activité Plk1 ne soit pas atteinte dans les cellules tumorales, qu'une faible activité soit suffisante pour initier le processus mitotique. En accord avec cette hypothèse, il a été observé dans l'ovocyte de Xénope qu'une activité résiduelle de Plx1 (~10% de l'activité totale) est suffisante pour promouvoir l'entrée en méiose. Alternativement, le fait que les cellules cancéreuses soient capables de rentrer en mitose dans des conditions ou l'activité Plk1 est inhibée pourrait suggérer la mise en place de mécanismes alternatifs indépendant de Plk1 permettant l'initiation du processus mitotique. Dans le cadre

un des mécanismes pourrait être la phosphorylation de la phosphatase Cdc25B par la kinase Aurora-A[171].

Ces précédents travaux m'ont ainsi amené à étudier l'importance de l'activité de la kinase Plk1 dans le contrôle de l'entrée en mitose dans des cellules non-transformées ou transformées au cours de cycles cellulaires non perturbés, et à étudier les mécanismes sous-jacents dépendants de Plk1.

b) Plk1 nécessaire au redémarrage du cycle après un arrêt en phase G2

Bien que les études divergent quant à l'importance de Plk1 dans la régulation de l'entrée en mitose au cours de divisions cellulaires non perturbées, il est acquis qu'après un arrêt en phase G2 induit par des dommages de l'ADN, Plk1 et ses activateurs en amont Aurora-A et Bora deviennent essentielles pour le retour dans le cycle cellulaire, en contribuant à l'activation de la Cycline-B1-Cdk1 [57,281]. L'activation de la signalisation en réponse à des dommages à l'ADN conduit à l'inhibition des activités kinases pro-mitotiques de Cdk1, Aurora-A et Plk1 [319], et provoque la dégradation de plusieurs protéines qui favorisent l'entrée mitotique, telles que Cdc25A et hBora [145,320,321]. La reprise du cycle cellulaire après l'arrêt induit par des cassures de l'ADN nécessite non seulement la réparation des lésions, mais aussi et surtout l'inactivation de la signalisation du point de contrôle pour permettre la progression du cycle cellulaire (figure 32).

Dans ce cadre, il a été montré que Plk1 favorise la réparation des dommages de l'ADN par recombinaison homologue [322]. Effet, Plk1 régule la réparation de l'ADN par l'intermédiaire de BRCA2 [323,324]. BRCA2 est impliquée dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Cette dernière régule l'oligomérisation de la protéine Rad51, une enzyme nécessaire à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. BRCA2 pourrait également avoir une activité de modification de la chromatine par l'intermédiaire d'une interaction avec P/CAF (p300/CBP-associated factor), une protéine à activité acétyltransférase des histones. Plk1 interagit avec BRCA2 et la phosphoryle [323,324]. Cette phosphorylation est accrue lors de la progression mitotique, et est inhibée lors de dommages à l'ADN, suggérant un rôle de Plk1 dans la coordination des processus biologiques liés à BRCA2.

Plk1 intervient également dans l'inactivation des signaux de la voie de réparation des cassures double brins (DDR). Dans ce mécanisme, il a été montré que Plk1 intervient via l'inactivation de Chk1&Chk2, 53BP1 ainsi que p53. En effet, il a été montré que Plk1 intervient dans l'inhibition et la dégradation de Chk1 en induisant la dégradation de son co-facteur Claspin [325–328]. En accord, l'utilisation d'un inhibiteur de Chk1 dans des cellules avec un défaut en Plk1 entraîne le redémarrage du cycle d'une partie des cellules, suggérant que l'inhibition de Chk1 pourrait se produire en aval de la voie linéaire de Plk1. Plk1 régule négativement 53BP1 et Chk2 pour inhiber les signaux négatifs en défaveur d'une entrée en mitose [329,330]. Plk1 pourrait également contribuer à l'inactivation de p53 par des mécanismes directs et indirects [331–333]. En effet, il a été proposé que Plk1 interagit avec p53, ce qui affecte la stabilité de cette dernière et inhibe son activité transcriptionnelle[334,335] .

Enfin, Plk1 promeut l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 en activant les phosphatases Cdc25 et en inactivant les kinases Wee1&Myt1 en stimulant leur dégradation[12,194,265,281].

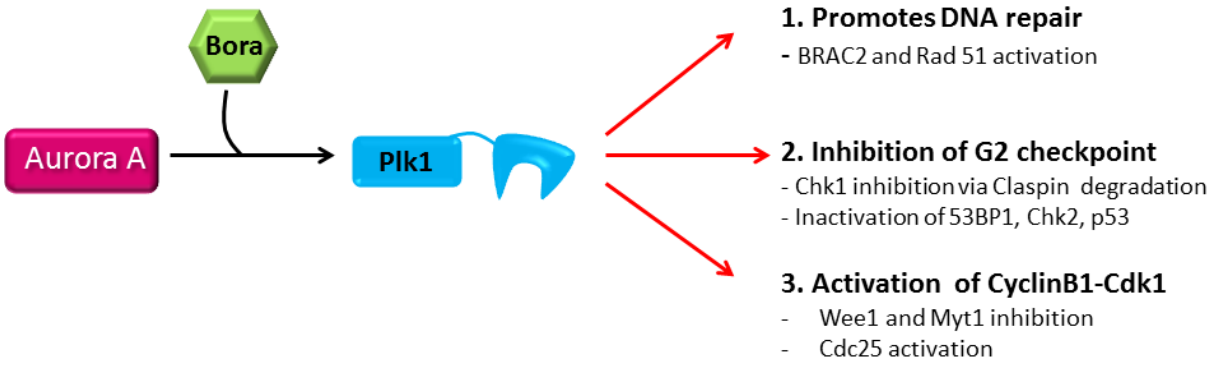


Figure 32 : Plk1 est un élément central pour le retour des cellules dans le cycle cellulaire après induction de dommages à l'ADN en phase G2.

E. Polo-like kinase1 : une cible thérapeutique majeure

Vu son rôle central dans la régulation de la division cellulaire, il n'est pas étonnant de retrouver Plk1 parmi les protéines en jeu dans les cancers. De nombreuses d'études ont révélé que Plk1 est surexprimée dans divers types de cancers solides humains d'origines multiples, en comparaison avec le tissu normal (pour revue [318]) (figure 33). Par ailleurs, les niveaux élevés de Plk1 ont été corrélés avec un mauvais pronostic de survie dans plusieurs cancers humains, tels que : le cancer du poumon [336], les cancers de la tête et du cou [337], le carcinome oesophagien [338], le mélanome [339,340], le carcinome oropharyngé [341], le cancer du sein [342], le cancer colorectal [343] et le carcinome endométrial [344]. L'expression élevée de Plk1 a également été démontrée comme étant associée à un grade plus élevé et à un stade plus avancé du cancer de l'ovaire [345]. Plk1 est considéré comme un proto-oncogène, sa surexpression pourrait permettre le contournement des points de contrôle du cycle cellulaire, favorisant la tumorigénèse [281,289,346].

Les cellules cancéreuses sont souvent dépendantes d'une activité élevée de Plk1 [347–349]. De manière intéressante, alors que l'inhibition de Plk1 conduit à l'arrêt mitotique et à la mort cellulaire par apoptose dans une large variété de cellules cancéreuses humaines, la réduction de Plk1 jusqu'à environ 80 % n'a pas d'effet significativement néfaste dans les cellules primaires humaines et divers organes de souris adultes [350]. De nombreuses études montrent que l'inhibition de Plk1 est particulièrement nuisible dans les cellules cancéreuses portant une mutation sur le gène suppresseur de tumeur TP53 conduisant à son inactivation [348,351–354]. Dans une autre étude, Plk1 a été identifiée comme l'un des régulateurs mitotiques dont la surexpression est sélectivement requise pour la viabilité des cellules cancéreuses ayant une activité de l'oncogène RAS élevée, contrairement aux cellules normales[347] . Par conséquent, il est donc possible de tuer sélectivement ces cellules cancéreuses tout en maintenant les cellules saines en vie, ouvrant ainsi une fenêtre thérapeutique.

Ces dernières années, Plk1 a suscité beaucoup d'intérêt comme cible potentielle de traitements anticancéreux [355]. Des essais de combinaison des inhibiteurs de Plk1 avec diverses molécules cytotoxiques classiques présentent des résultats intéressants sur plusieurs modèles de xénogreffes [356]. Ces combinaisons améliorent l'efficacité des agents classiques, et sont mieux tolérées par l'animal [356]. Par ailleurs, des études ont révélé que les thérapies ciblant Plk1 pourraient être une nouvelle approche pour augmenter la sensibilité des cellules

cancéreuses aux traitements par chimiothérapies. Par exemple, Jimeno et collaborateurs ont observé que Plk1 était à l'origine de la résistance à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques [357]; Tyagi et collègues ont signalé que l'inhibition de Plk1 pouvait améliorer la sensibilité au cisplatine dans les cellules de carcinome épidermique humain par une régulation positive de p73a (homologue de p53) [358] . Parallèlement, de nombreuses études suggèrent que Plk1 est potentiellement importante pour la sensibilité des cellules cancéreuses aux radiations. Par exemple, Rodel et collaborateurs ont montré que la déplétion de Plk1 pouvait augmenter la sensibilité du cancer du rectum aux radiothérapies [359]; et Harris et collègues ont trouvé que l'inhibition de Plk1 (traitement avec l'inhibiteur BI2536) pouvait améliorer la sensibilité des cellules de médulloblastome aux radiothérapies [360].

Cancer Type	Full Name	*P* Value	Fold Change*
LUSC	Lung squamous cell carcinoma	7.41E-157	20.8
BRCA	Breast invasive carcinoma	5.88E-126	11.3
LUAD	Lung adenocarcinoma	1.18E-63	9.7
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma	2.33E-55	6.1
HNSC	Head and neck squamous cell carcinoma	6.52E-50	4.2
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma	3.59E-40	11.7
UCEC	Uterine corpus endometrial carcinoma	1.96E-36	21.3
COAD	Colon adenocarcinoma	5.97E-33	2.5
STAD	Stomach adenocarcinoma	8.45E-27	4.8
ESCA	Esophageal carcinoma	9.52E-27	10.2
BLCA	Bladder urothelial carcinoma	4.96E-26	9.1
PRAD	Prostate adenocarcinoma	1.29E-22	3.3
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma	6.76E-22	4.7
CHOL	Cholangiocarcinoma	6.97E-14	24.3
GBM	Glioblastoma multiforme	5.63E-12	12.4
KICH	Kidney chromophobe	1.63E-06	3.3
READ	Rectum adenocarcinoma	1.06E-05	2.3
PAAD	Pancreatic adenocarcinoma	0.04	2.2

* Mean *PLK1* expression in cancers/mean *PLK1* expression in normal tissue.

Figure 33 : Comparaison de l'expression de Plk1 entre cellules humaines cancéreuses de différentes origines et tissu normal d'après [318].

Résultats

Partie I : Méthode de développement de biosenseurs FRET pour l'analyse spatio-temporelle de variations d'activités kinase.

Tout au long de la vie de la cellule des événements biochimiques se déroulent en réponse à des changements inter et intracellulaires. Ces réponses sont relayées par des cascades de signalisation impliquant un certain nombre de composants tels que les récepteurs, les ligands, les kinases, et les phosphatases, ce qui entraîne par la suite des réactions en aval régulant ainsi les processus cellulaires. Une régulation spatio-temporelle de ces voies de signalisation est essentielle pour un fonctionnement cellulaire approprié. La compréhension des signaux biochimiques distincts dans le temps et dans l'espace donne un aperçu des processus fondamentaux qui régulent le comportement cellulaire.

Les activités kinase sont particulièrement intéressantes, connues pour réguler des fonctions biologiques multiples et diverses, telles que le cycle cellulaire, la réponse immunitaire innée, le développement et la différenciation cellulaire [361]. Plus de 30% des protéines cellulaires sont phosphorylées sur au moins un résidu [362,363]. Pour remplir leur rôle complexe dans la transduction du signal, les protéines kinases sont soumises à de multiples niveaux de régulation, tels que la liaison au ligand, l'interaction protéine-protéine et la phosphorylation par d'autres kinases ou par elles-mêmes, compliquant l'élucidation des événements de signalisation. Par ailleurs, de nombreuses cascades de signalisation impliquant des protéines kinases nécessitent un contrôle dynamique et une compartimentation de l'activité kinase.

Les méthodes biochimiques classiques couramment utilisées telles que l'analyse par western blot, la spectrométrie de masse, et l'immunofluorescence permettent de révéler l'association de complexe de protéines, l'état de phosphorylation et la localisation, sous réserve de la disponibilité d'outils de haute sensibilité. Par ailleurs, ces méthodes sont limitées en information temporelle et entravent les mesures *in vivo*. De plus, les longues procédures de synchronisation aboutissant à un enrichissement des cellules en une phase du cycle cellulaire donnée, peuvent fournir des résultats intéressants, mais ont pour conséquences de perturber l'intégrité cellulaire. Bien que l'analyse par immunofluorescence, sur cellules fixées, suite au développement d'anticorps phospho-spécifiques, est particulièrement puissante pour détecter une phosphorylation locale lorsque la protéine correspondante est concentrée à un

emplacement subcellulaire particulier avec des repères morphologiques disponibles, l'étude des états de phosphorylation des protéines diffusibles par ce type de méthode est plus délicate.

La méthode d'analyse basée sur le développement de rapporteur d'activité FRET (Förster Resonance Energy Transfer) constitue une alternative attractive permettant d'étudier la régulation de la transduction du signal avec une résolution spatiale et temporelle sans précédent, car elle permet d'étudier spatialement les modifications d'activité en temps réel, sur cellule vivante. L'application de cette technologie innovante permet de détecter des changements d'état d'activation rapides, sensibles, quantifiables et locales *in vivo*, sans pour autant perturber les mécanismes cellulaires.

À ce jour, il existe trois types de rapporteurs d'activité kinases : des biosenseurs d'activation de kinase, des biosenseurs d'activité kinase et des biosenseurs à base de substrats. Un biosenseur d'activation de la kinase consiste généralement en une kinase prise en sandwich entre une paire de protéines fluorescentes, tandis qu'un biosenseur d'activité kinase surveille l'activité des protéines kinases en utilisant le biosenseur comme substrat de substitution. Le troisième groupe, les biosenseurs à base de substrat, utilisent une conception similaire de celle des biosenseurs de kinase, mais rapportent la phosphorylation d'un substrat spécifique par l'une des multiples kinases en amont. Dans le cadre de ma thèse, j'ai développé des biosenseurs spécifique rapportant les variations d'activités des kinases Aurora-A et Plk1, en me basant sur le modèle de biosenseurs à base de substrats.

Brièvement, les biosenseurs FRET, que j'ai développé, sont codés génétiquement sur un plasmide. Ils sont constitués d'un site de phosphorylation (domaine senseur) qui doit être spécifique de la kinase d'intérêt et d'un domaine protéique capable de reconnaitre ce site dans son état phosphorylé (phosphorylation-binding domain), tous deux pris en « sandwich » entre deux protéines fluorescentes (typiquement un variant des protéines CFP et YFP), compatibles pour un transfert d'énergie non-radiatif entrent-elles (FRET) sous certaines conditions. Lorsque la kinase est active, la phosphorylation du site spécifique et sa reconnaissance par le domaine protéique conduit à un changement de conformation du biosenseur susceptible de rapprocher ou d'éloigner le fluorochrome donneur (CFP) et accepteur (YFP) et ainsi de modifier l'efficacité de transfert d'énergie qui s'opère entre les deux. Cette variation d'efficacité FRET reflète l'équilibre à un instant t, entre le niveau d'activité de la kinase d'intérêt et celui de la phosphatase(s) opposée(s), et est analysée au cours du temps en quantifiant le ratio d'émission des protéines YFP et CFP sous une excitation CFP (figure 34).

Cette stratégie a été utilisée pour générer des biosenseurs pour l'activation de kinases telles que la protéine kinase C (PKC) [364], Akt [365] et la protéine kinase extracellulaire ERK[366].

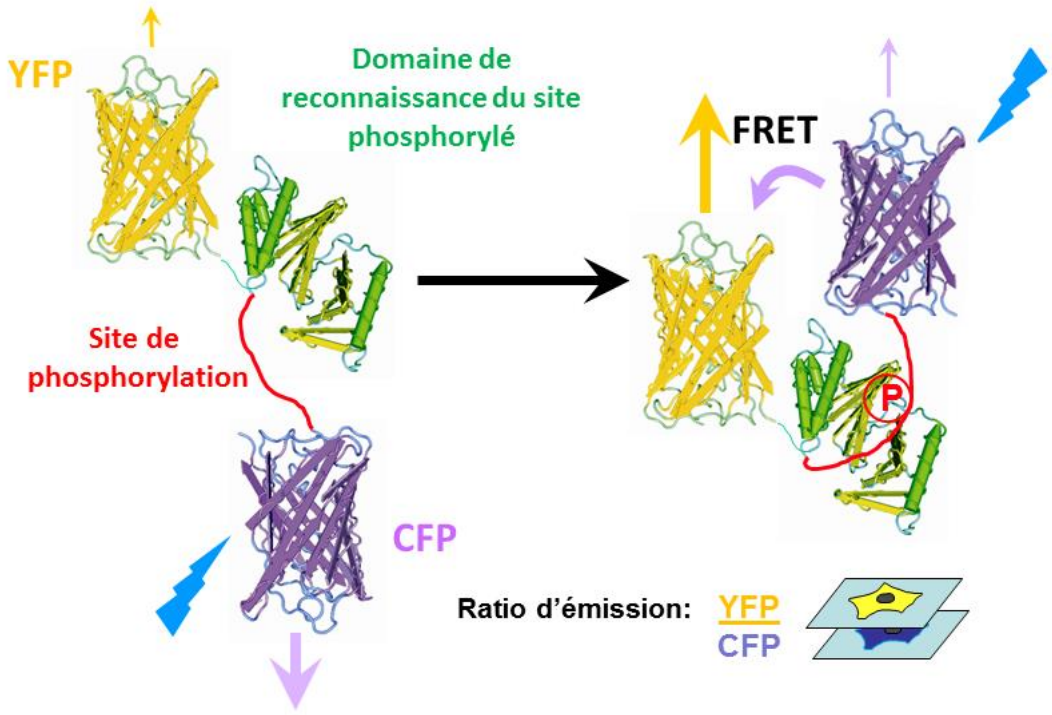


Figure 34 : Principe de fonctionnement d'un biosenseur FRET.

À l'état phosphorylé, le domaine senseur est reconnu par le « phosphorylation binding domain », induisant un changement de conformation du biosenseur qui modifie l'efficacité de transfert d'énergie entre les deux fluorochromes.

Nos biosenseurs FRET ont été construit selon plusieurs conditions. Tout d'abord, le choix du site de phosphorylation, l'élément clef pour l'obtention d'un biosenseur FRET spécifique de la kinase d'intérêt doit correspondre à un site de phosphorylation d'une protéine endogène, et non surexprimée. Sa phosphorylation est établie comme étant dépendante de la kinase d'intérêt. Sa cinétique de phosphorylation au cours du cycle cellulaire a été étudiée (Western blot, immunofluorescence) et correspond aux données disponibles de la cinétique d'activation de la kinase d'intérêt. Deuxièmement, la molécule doit subir un changement conformationnel suffisamment important pour altérer le signal FRET généré. Par ailleurs, il est souhaitable que les signaux fluorescents soient insensibles aux changements environnementaux tels que le pH, les ions, la température ou l'indice de réfraction. Enfin, le choix du domaine de reconnaissance (DR) a été basé sur l'affinité de celui-ci pour un peptide cible phosphorylé, sur la localisation des résidus nécessaire à la reconnaissance (en amont ou en aval du résidu phosphorylé), et d'autre part sur l'absence d'effets indésirables liés à sa

surexpression sur la prolifération cellulaire. Plusieurs DR tels que le domaine SH2 (Src homology 2), le domaine de liaison phospho-thréonine de la protéine 14-3-3, le domaine WW, ou le domaine FHA1/2 (phosphothreonine binding forkhead-associated) de la protéine Rad53 de *S. cerevisiae*, peuvent être choisis, chacun avec des critères de reconnaissance qui leur sont propres. Par exemple, le domaine FHA2 reconnaît spécifiquement un résidu Isoleucine en position +3[330], alors que le domaine WW reconnaît la phosphosérine / phosphothréonine avec une proline en position +1 [367]. Par conséquent, la séquence de substrat choisi pour étudier l'activité d'une kinase d'intérêt, devra peut-être être modifiée pour s'adapter à l'exigence de liaison du DR en incorporant des mutations ponctuelles appropriées. Cependant, il est important de s'assurer que même suite à ces modifications, la kinase peut encore reconnaître et phosphoryler spécifiquement le substrat muté. Dans la mesure où la spécificité des sites de phosphorylation reconnus par les kinases Plk1 et Aurora-A réside sur des résidus localisés en amont du résidu phosphorylé, j'ai utilisé le domaine FHA2, et introduit une Isoleucine en aval (position +3) des sites de phosphorylation sélectionnés en espérant préserver la spécificité pour Plk1 et/ou Aurora-A.

L'efficacité du transfert d'énergie est inversement proportionnelle à la sixième puissance de la distance entre le donneur et l'accepteur et dépend également de l'orientation relative des fluorophores. Les spectres d'émission de la protéine donneur et le spectre d'absorption de la protéine accepteur doivent être chevauchants. La distance dans l'espace entres les deux fluorochromes doit être inférieure à 10nm. Les protéines fluorescentes se comportent comme un dipôle électrique et doivent adopter une orientation relative dans l'espace permettant le transfert d'énergie non-radiatif.

Afin d'optimiser la dynamique d'activité FRET des biosenseurs générés, et de moduler les paramètres nécessaires pour un transfert d'énergie efficace, j'ai adopté une stratégie basée sur une approche « essai-erreur » en utilisant une banque de constructions plasmidiques disponible composé de 36 vecteurs différents (don de C. Schultz, [368]). Cet ensemble de construction plasmidique m'a permis d'évaluer essentiellement deux types de paramètres : une variabilité induite par l'orientation dans l'espace des protéines de fluorescences ; et une variabilité induite par la modulation de la distance entre les protéines fluorescentes. Cette banque comporte ainsi une protéine donneur mTurquoise et différentes protéines accepteurs Venus et des formes permutées de Venus (cpVenus). Le développement des formes cpVenus est basé sur le fait que les protéines fluorescentes dérivées de la GFP sont constituées de

feuillets β disposés sous la forme d'un tonneau (tonneau β, "β barrel") et reliés entre eux par des boucles peptidiques exclues de la structure en tonneau (figure 36). La séquence nucléotidique de Venus a été modifiée afin de fusionner les extrémités NH2 et COOH terminales et d'en créer de nouvelles au niveau des différentes boucles (figure 36). Les protéines résultantes conservent la même structure en tonneau, mais adoptent une orientation dans l'espace, afin de mettre les moments dipolaires donneurs et accepteurs dans une orientation favorable. Enfin, de courtes séquences en acides aminés de différentes tailles "linkers" de motif Ala-Gly localisées entre la séquence des protéines fluorescentes et celles des autres domaines du biosenseur, ont été ajoutées (figure 35).

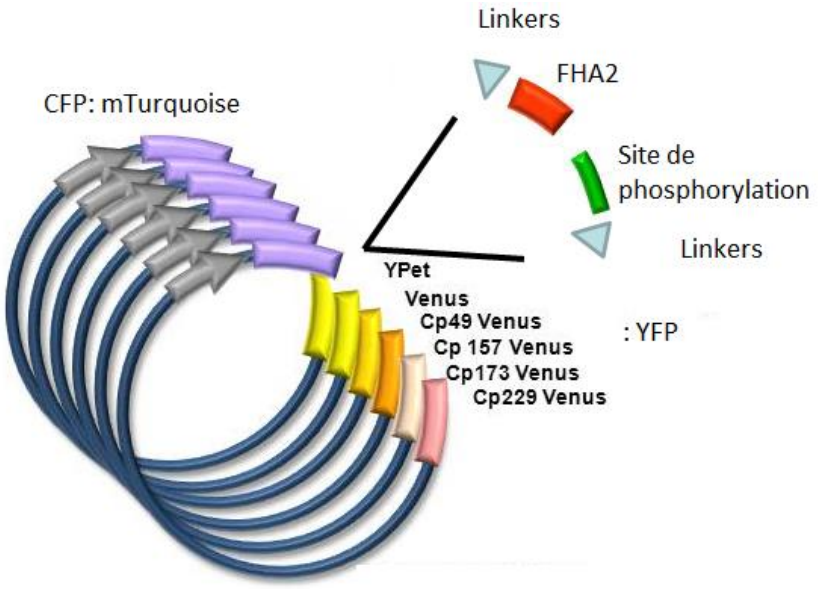


Figure 35 : Banque plasmidique dédiée au développement d'un biosenseur FRET.

Cette banque comprenant des constructions avec un variant CFP (mTurquoise) ainsi que six variants YFP et une combinaison de linkers de différentes tailles (2, 4 ou 8 acides aminés).

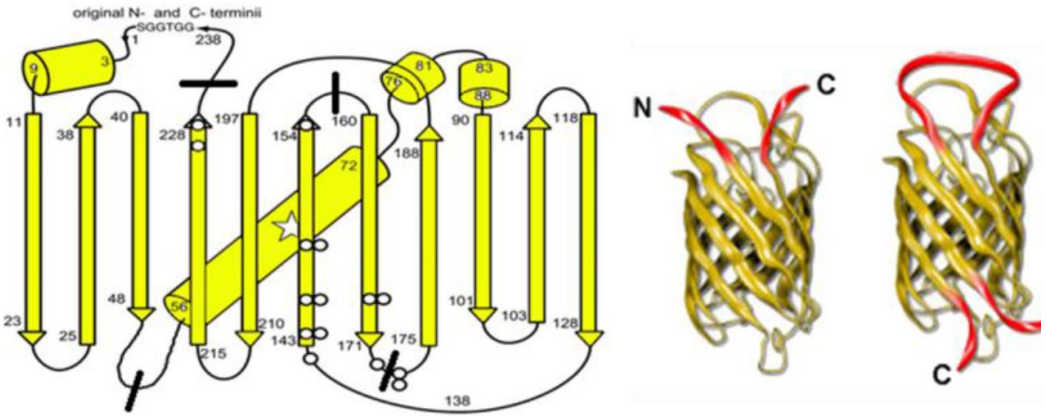


Figure 36: Schéma explicatif de la réalisation des différentes formes permutées de Venus.

La plupart des biosenseurs développés jusqu'à présent sont diffusibles librement dans le noyau et le cytoplasme, et donc, accessibles à la kinase d'intérêt. Si la kinase d'intérêt est concentrée à des emplacements spécifiques dans la cellule, des domaines de ciblage à des compartiments particuliers peuvent être ajoutés tels que des séquences NLS ou NES pour un ciblage exclusivement au noyau ou au cytoplasme respectivement. Le développement de biosenseurs est principalement limité par l'identification d'un site spécifique pour une kinase donnée qui repose sur les données biochimiques disponibles dans la littérature. Une nouvelle approche tente de pallier cette difficulté en se basant sur le changement de conformation de la kinase elle-même suite à son activation. Sur ce principe un biosenseur de la kinase Aurora-A a été développé récemment [369], dont la limitation majeure est le contrôle de l'expression du biosenseur qui ne doit pas affecter le comportement cellulaire. Actuellement, le développement de biosenseurs de protéines impliquées dans l'entrée et la progression en mitose est en pleine essor [370] , et sont des outils très prometteurs pour décrypter les voies de signalisation contrôlant la progression dans le cycle cellulaire, mais également pour la sélection et l'évaluation de nouveau inhibiteurs en essais clinique [371]. Sur la base de stratégies de conception de module hautement adaptables et généralisable, il est prévu qu'un nombre croissant de biosenseurs permettant l'analyse de l'activité d'enzymes clé de nombreuses voies de signalisation, se développent. Les données quantitatives d'imagerie par fluorescence obtenues pourront être incorporées dans des modèles mathématiques afin d'obtenir une meilleure compréhension des réseaux de signalisation.

Revue 1 : Spatiotemporal Investigation of Phosphorylation Events During Cell Cycle Progression.

Partie II : Développement d'un biosenseur FRET spécifique pour l'étude des variations d'activité des kinases Aurora-A et Plk1 au cours de la transition G2/mitose.

L'entrée en mitose des cellules somatiques de mammifères est sous le contrôle d'un ensemble de régulateurs du complexe Cycline B1-Cdk1, formant le "Mitotic Entry Network" [372]. Une activation prématurée du complexe Cycline B1-Cdk1 alors que la réplication et/ ou la réparation de l'ADN n'ait pas été achevée, conduit à des défauts de la ségrégation de la chromatine en mitose qui pourrait être à l'origine d'une instabilité chromosomique et le développement de tumeur [200,373]. Une succession d'évènements moléculaire prend place en phase G2 responsable du déclenchement au moment opportun de l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1. Afin de déterminer précisément comment ces différents régulateurs travaillent dans un ensemble cohérent pour le contrôle strict de l'engagement en mitose, et ceci de manière coordonnée avec l'achèvement de la réplication de l'ADN, j'ai entrepris d'étudier la régulation spatio-temporelle des kinases Aurora-A et Plk1 au cours d'un cycle non perturbé.

Pour mieux comprendre l'implication des kinases Aurora-A et Plk1 dans les mécanismes qui contrôlent l'entrée en mitose, une partie de mon travail de master 2 et de thèse a été consacré au développement de biosenseurs FRET spécifiques de Plk1 et Aurora-A. L'objectif a été de déterminer précisément au cours de la progression G2/mitose à quel moment prend place l'activation de chacune des kinases en temps réel, de visualiser directement l'effet d'inhibiteurs de l'une ou l'autre kinase, et d'étudier les conséquences d'une telle inhibition sur la régulation de l'entrée en mitose. Enfin, ces outils ont également été très utiles pour élucider les mécanismes moléculaires en amont responsables de leur activation.

Dans cette partie, je propose de présenter les résultats concernant la sélection d'un biosenseur de la kinase Aurora-A qui ne sont pas publiés, les résultats obtenus pour un des biosenseurs de la kinase Plk1 (basé sur le résidu Ser75 de Cdc25C) étant rapportés dans la revue et l'article[374,375].

A. Développement et évaluation d'un biosenseur FRET de la kinase Aurora-A.

Parmi les cibles d'Aurora-A répondant aux critères de sélection présentés dans la partie I, j'ai choisi d'utiliser deux site de phosphorylation appelé A et B. L'expression des biosenseurs contenant le site B s'est révélée nocive pour la cellule ainsi, seul les biosenseurs avec le site A ont été évalués. En guise de domaine de reconnaissance du site A dans son état phosphorylé, j'ai utilisé le domaine FHA2 de faible affinité pour un peptide cible (constante de dissociation 530nM), permettant une étude fine des variations de phosphorylation et déphosphorylation du site A. L'utilisation de domaine de forte affinité tel que le domaine 14.3.3 (constante de dissociation 56nM) pourrait protéger le site phosphorylé de l'action des phosphatases opposées.

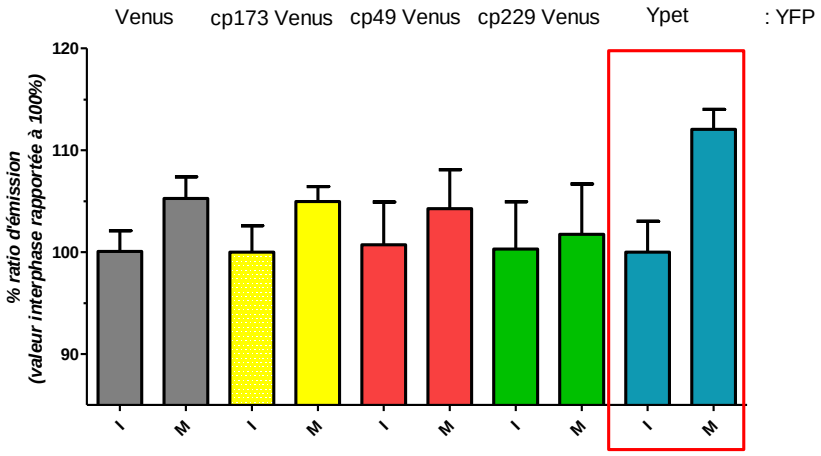
Afin de sélectionner le ou les biosenseurs ayant la meilleure dynamique de signal FRET, les différentes constructions générées à partir de la banque plasmidique décrite en partie I, ont été exprimées de manière transitoire dans des cellules HeLa en culture. Les signaux d'émission CFP et YFP sous une excitation CFP ont été enregistrés par microscopie de fluorescence et le ratio CFP/YFP a été calculé pour chaque cellule analysée. Dans un premier temps, la dynamique du signal FRET pour chaque construction a été déterminée par comparaison du ratio d'émission entre des cellules en interphase et arrêtées en mitose (+ Nocodazole). En effet, les données biochimiques disponibles montrent une augmentation très significative de l'activité de la kinase Aurora-A au cours de la progression interphase/mitose [296,376].

Les variations du ratio d'émission se sont avérées relativement faibles, de l'ordre de 2 à 6% pour les biosenseurs exprimant les différentes formes de la protéine Venus : cpVenus (circularly permutated). Cependant, la combinaison mTurquoise/YPet a permis d'obtenir une dynamique du ratio d'émission entre l'interphase et la mitose relativement plus élevée, de l'ordre de 12% (figure 37A). Cette variation correspond à des biosenseurs précédemment développés ayant une dynamique relativement faible mais néanmoins suffisante pour un suivi en temps réel d'une activité kinase au cours de la prolifération cellulaire. L'ajout de motif Ala-Gly résidus glycines entre la protéine mTurquoise et FHA2 et entre YPet et le site de phosphorylation (2aa - 2aa → 4aa - 8 aa) entraine une augmentation de la dynamique du signal FRET entre interphase et mitose d'environ 4% (figure 37B).

Ainsi, cette étape d'optimisation nous a permis d'augmenter légèrement la dynamique du signal FRET enregistré. Mes résultats suggèrent que la stratégie la plus rapide et la plus efficace pour l'optimisation de la dynamique du signal FRET est l'évaluation de différents couples CFP/YFP possédants des propriétés photo-physiques, rendement quantique (capacité à réémettre sous forme de lumière l'énergie absorbée) et coefficient d'extinction molaire (quantité de lumière absorbée par mole de fluorophore) différents [377,378].

A.

Biosenseurs Aurora A : mTurquoise - linker1 Site A FHA2 - linker2 - YFP

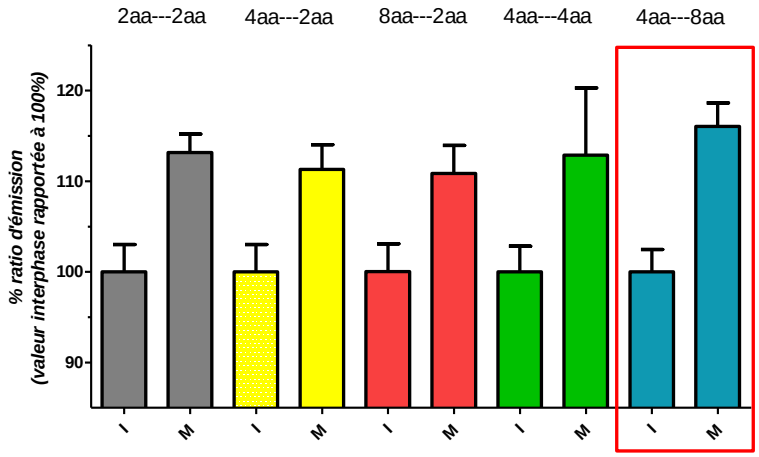


I: interphase ; M: mitose

Venus	cp173 Venus	cp49 Venus	cp229 Venus	Ypet	: YFP
5.7%	4.8%	3.3%	2.5%	12.6%	Différence I/M

B.

Biosenseurs Aurora A : mTurquoise - linker1 Site A FHA2 - linker2 - Ypet



I: interphase ; M: mitose

2aa---2aa	4aa---2aa	8aa---2aa	4aa---4aa	4aa---8aa	linkers
12.6%	11.9%	11.3%	15.4%	16.6%	Différence I/M

Figure 37 : Comparaison du signal FRET pour chaque construction sur cellule en interphase et en mitose.

L'acquisition du ratio d'émission CFP/YFP sous excitation CFP a été enregistrée sur cellules transfectées par les différentes constructions, soit en interphase après synchronisation à la transition G1/S par un traitement thymidine puis relachées (7h), soit arrêtées en mitose après traitement au nocodazole.

B. Test de la spécificité des constructions pour l'activité Aurora-A

Dans un premier temps, pour étudier la spécificité de la construction mTurquoise-Ypet (4aa-8aa) vis-à-vis de l'activité kinase d'Aurora-A, j'ai vérifié que les variations du signal FRET enregistrées entre l'interphase et la mitose étaient bien liées à un changement de l'état de phosphorylation du site utilisé et non pas une conséquence des changements morphologiques de la cellule (perte d'adhésion) au cours de l'entrée en mitose. Pour cela, le résidu phosphorylé du site A a été remplacé par un résidu non phosphorylable (alanine). Aucune variation du signal FRET entre cellules en interphase et en mitose exprimant la construction non phosphorylable n'a été observée, en comparaison avec la construction contenant le résidu phosphorylable (figure 38).

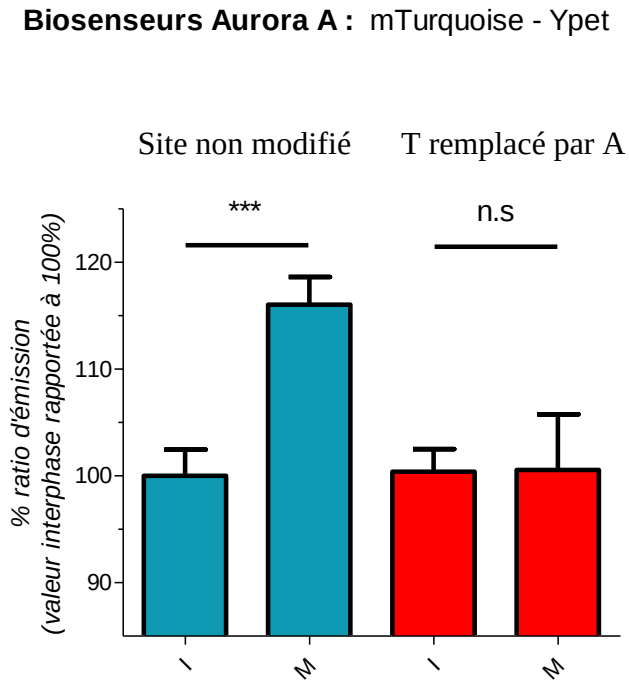


Figure 38 : Les variations du signal FRET détectées entre l'interphase et la mitose sont dépendantes de l'état de phosphorylation du site A.

Les cellules ont été transfectées par les constructions avec le site A et le site sous l'état non phosphorylable. Le signal FRET moyen obtenu dans une quinzaine de cellules exprimant les constructions FRET en interphase a été calculé, normalisé à 100%, et comparé à la valeur moyenne obtenue dans une quinzaine de cellules en mitose. Test statistique utilisé :t-test, *** p>0.001

Dans un second temps, j'ai analysé si les variations du signal FRET détectées entre cellules en interphase et en mitose étaient bien dépendantes de l'activité enzymatique de la kinase Aurora-A. Pour cela, des cellules transfectées et synchronisées en mitose ont été suivies par vidéo-microscopie avant et après ajout d'un inhibiteur de la kinase Aurora-A (MLN8054) (40 fois plus sélectif pour la kinase Aurora-A versus Aurora-B[379]), et l'évolution du signal FRET a été quantifiée. De manière intéressante, l'ajout de l'inhibiteur d'Aurora-A (1µM) s'accompagne d'une diminution du signal FRET de l'ordre de 13%, mais avec une cinétique de réponse relativement lente (>5min par rapport à 1min pour le rapporteur FRET de Plk1 après l'ajout de l'inhibiteur de Plk1) ce qui pourrait être dû soit à une perméabilité cellulaire moindre à cet inhibiteur soit à une affinité de FHA2 plus forte pour le site A en comparaison avec le site Cdc25C S75 pour le biosenseur de Plk1 protégeant ainsi la déphosphorylation du site. Une autre possibilité serait que les deux sites soient déphosphorylés par des phosphatases différentes, soit par la même phosphatase même avec une affinité plus élevé pour le site S75. L'ajout d'un inhibiteur de la kinase Aurora-B (ZM447439 5µM) dans les mêmes conditions ne modifie pas significativement le signal FRET enregistré. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que le biosenseur généré est sensible à des variations d'activité d'Aurora-A, et non pas à des variations d'activité d'Aurora-B, en mitose.

Il a été montré précédemment que l'activité d'Aurora-A, en mitose est contrebalancée par l'activité des phosphatases PP1 et PP2A et PP6 [380–384]. Afin de tester si ces phosphatases agissent sur l'état de phosphorylation du biosenseur, j'ai analysé l'effet de l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique (acide okadaïque, 250nM) sur le signal FRET mesuré en mitose (+ Nocodazole). Une réponse immédiate du biosenseur avec une augmentation du signal FRET de l'ordre de 30% (reflétant une augmentation de son état de phosphorylation) a été observée (figure 39). Il semble donc que le biosenseur d'Aurora-A soit sensible à un équilibre entre les activités d'Aurora-A et d'une phosphatase opposée en mitose. Il reste à déterminer l'identité du complexe phosphatase impliqué, et si cette phosphatase présente une activité différentielle entre l'interphase et la mitose, ce qui pourrait influencer, au moins partiellement, la cinétique d'activation et d'inactivation apparente d'Aurora-A détectée via l'utilisation du biosenseur.

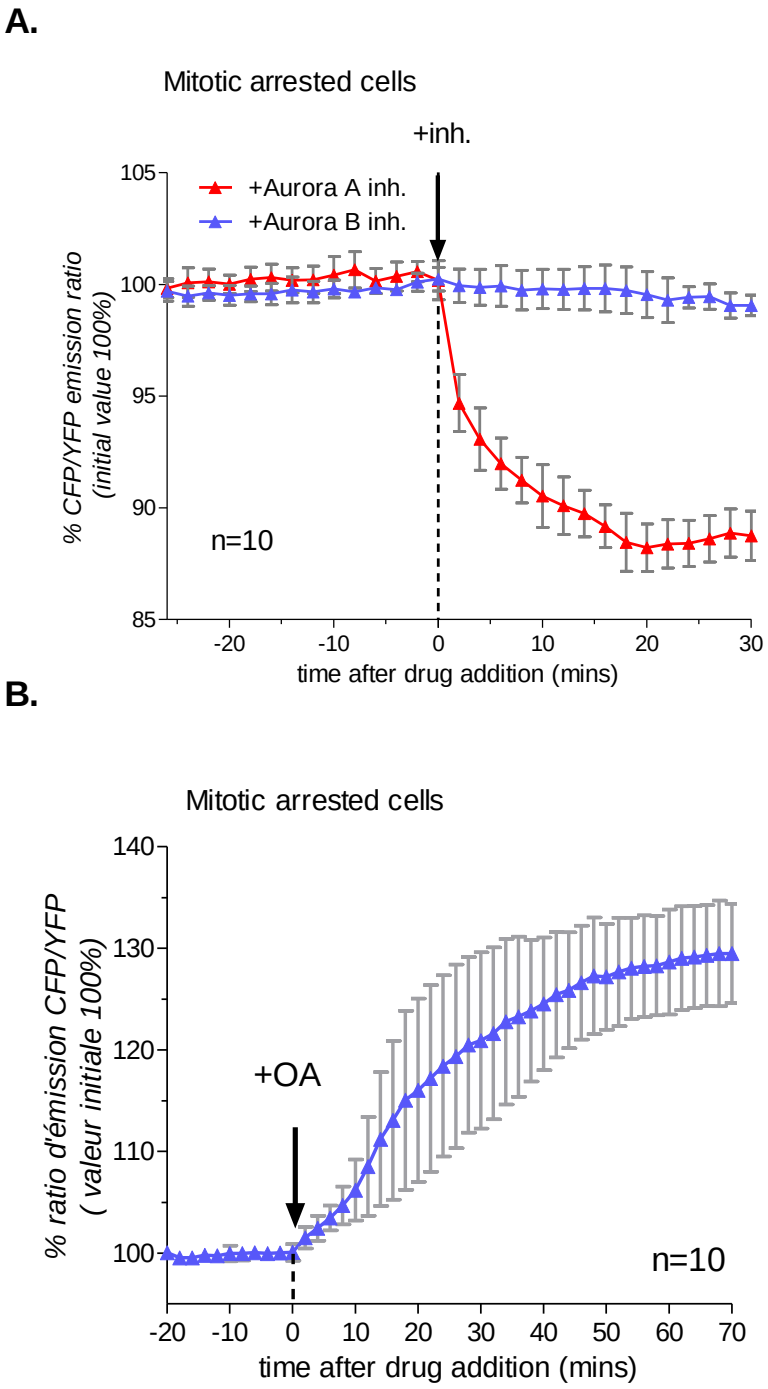


Figure 39: Le signal FRET mesuré en mitose est dépendant de l'activité d'Aurora-A et des phosphatases opposées PP1 et/ou PP2A.

A) L'évolution du signal FRET a été suivie avant et après ajout d'un inhibiteur d'Aurora-A (MLN8054 1µM) ou Aurora-B (ZM 447439 5µM) sur cellules mitotiques. (**1** image/2min) ; B) avant et après ajout d'acide okadaique (OA 250nM). (1 image / 2mins).

C. Étude de la cinétique d'activation d'Aurora-A au cours de la progression G2-mitose

Les résultats précédents suggèrent que le biosenseur généré devrait permettre de suivre la cinétique d'activation/inactivation de la kinase Aurora-A au cours du cycle cellulaire. Les résultats préliminaires que j'ai obtenus mettent en évidence une augmentation du signal FRET initiée en toute fin de phase G2, environ 25 minutes avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, atteignant un maximum en pro métaphase, et diminuant progressivement en sortie de mitose (figure 40). Ces résultats sont en accord avec les données biochimiques mettant en évidence que la protéine Aurora-A s'accumule au cours de la progression S-G2 mais s'active approximativement au moment de l'entrée des cellules en mitose [282,376]. Il sera intéressant par la suite de comparer les cinétiques d'activation d' Aurora-A, Plk1 et Cycline B1-Cdk1dans les mêmes conditions expérimentales afin de mieux comprendre la succession des évènements moléculaires qui initie l'entrée en mitose. D'autre part, le biosenseur d'Aurora-A devrait être très utile pour décrypter les mécanismes moléculaires responsables de son activation en fin de phase G2 et qui restent à ce jour inconnus. Différents co-facteurs mitotiques de la kinase Aurora-A ont été identifiés parmi lesquels figurent TPX2 (Targeting protein for Xklp2), Bora, Adjuba, ainsi que des protéines associées au centrosome : HEF1, CEP192, et Nucleophosmin/B53 [385–388]. L'utilisation du biosenseur combiné à la déplétion de chacun de ces co-facteurs par des approches d'interférence ARN pourrait permettre d'étudier si l'un de ces co-facteurs intervient dans son processus d'activation d'Aurora-A en fin de phase G2. Enfin, il a été montré que l'activité d'Aurora-A (suivie par des approches biochimiques) était sensible à l'ajout d'un inhibiteur de Cdk sur des cellules synchronisées en G2 [376,389]. Dans ce cadre, il sera également très intéressant d'étudier quel complexe Cycline-Cdk, incluant Cycline A2- Cdk2, Cycline A2- Cdk1 ou Cycline B1-Cdk1, module l'activation d'Aurora-A en G2 et par quels mécanismes sous-jacents.

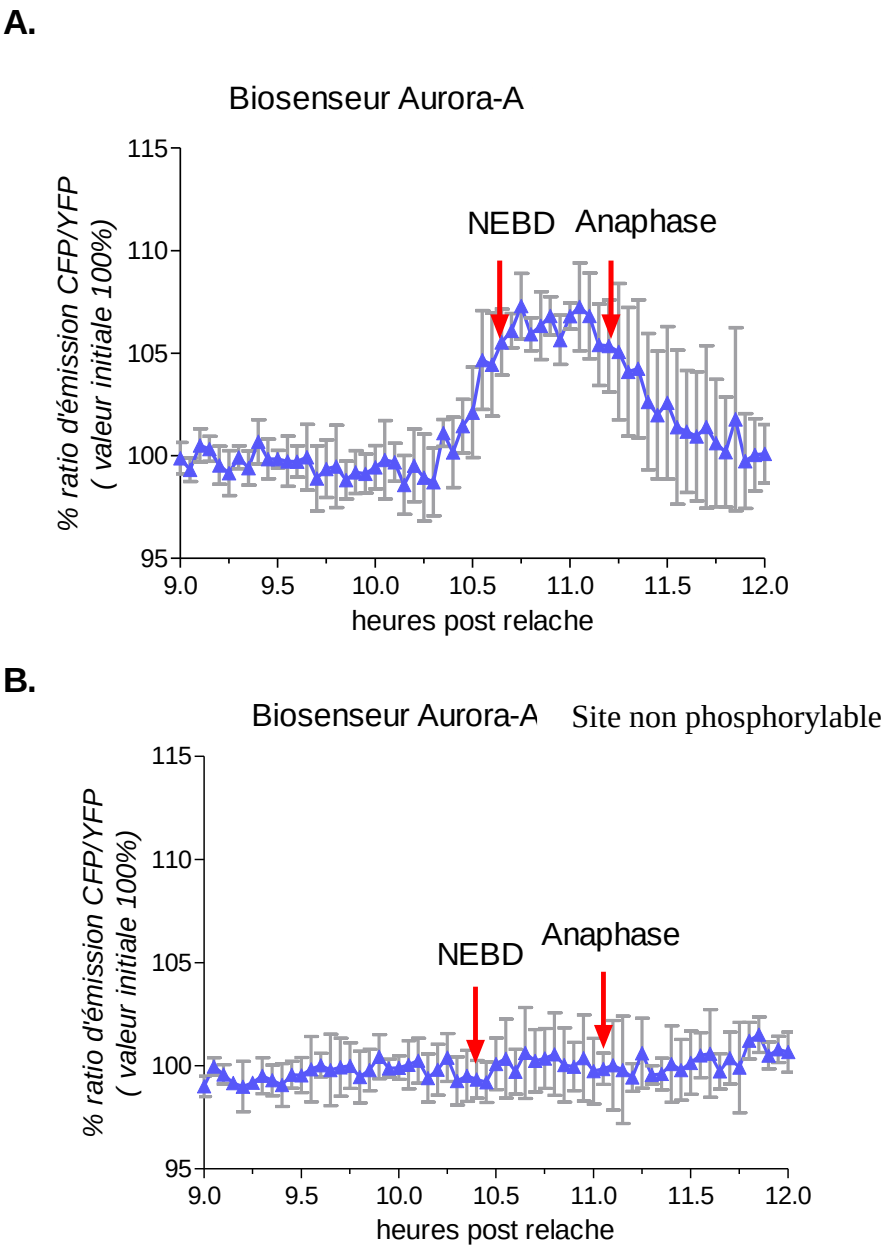


Figure 40 : Suivi de la cinétique d'activation de la kinase Aurora-A au cours de la progression G2-mitose.

Partie III : L'activation de Plk1 en fin de phase G2 déclenche l'entrée des cellules en mitose

De la levure à l'homme, l'activation de la Cycline B-Cdk1, ou MPF ("Mitosis Promoting Factor") est responsable de l'entrée des cellules en mitose. Chez les mammifères, son activation est étroitement régulée par un réseau complexe d'inhibiteurs (les kinases Myt1 et Wee1) et d'activateurs (les phosphatases Cdc25 A, B et C). Le développement d'un biosenseur FRET (Förster Resonance Energy Transfer) spécifique de Cycline B1-Cdk1 a montré que dans des cellules humaines l'initiation de son activation a lieu ~20min avant la rupture de l'enveloppe nucléaire suggérant une modification rapide de l'équilibre entre les activités opposées des kinases inhibitrices et des phosphatases activatrices en fin de phase G2 [142,375]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette activation soudaine de Cycline B1-Cdk1 restent inconnus.

L'objectif principal de cette thèse a été d'élucider la succession des évènements moléculaires qui interviennent en phase G2 contribuant au contrôle précis de l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 et ainsi du processus d'entrée des cellules en mitose. Mes travaux se sont focalisés sur le rôle potentiel de la kinase Polo-like kinase 1 (Plk1) dans le contrôle de l'entrée en mitose. Plk1 est une kinase essentielle à la division cellulaire et intervient dans la maturation des centrosomes, la cohésion des chromatides sœurs, l'attachement correct aux kinétochores au fuseau, et dans la cytocinèse [245,298,299]. Cette kinase est surexprimée dans de très nombreux cancers humains (carcinome pulmonaire et colorectaux, cancer du sein et de l'ovaire, gliome, mélanomes) et constitue une cible thérapeutique majeure. Alors que ses rôles en mitose sont bien élucidés, sa contribution dans le contrôle de l'entrée en mitose est controversée. Cependant, plusieurs régulateurs directs du complexe Cycline B1-Cdk1, Cdc25B, Cdc25C, Wee1 et Myt1, sont phosphorylés, au moins *in vitro* par Plk1, des mécanismes par lesquels celle-ci pourrait contrôler l'entrée en mitose. Néanmoins, il reste à déterminer si ces évènements de phosphorylations prennent place *in vivo*, s'ils sont initiés avant l'entrée en mitose, et à identifier leur contribution relative dans la régulation de l'activation initiale du complexe Cycline B1-Cdk1 et de l'entrée en mitose.

En résumé, mes travaux mettent en évidence le caractère essentiel de Plk1 dans le processus d'entrée des cellules en mitose. Mécanistiquement, Plk1 interagit avec la phosphophatase Cdc25C au cours de la phase G2 et promeut son activation via la phosphorylation de multiples sites identifiés, constituant un des mécanismes suffisant pour induire l'entrée des cellules en mitose. L'utilisation d'un biosenseur FRET spécifique de l'activité de Plk1 a permis d'étudier la régulation spatio temporelle de l'activité de Plk1 au sein de cellule suivies individuellement. J'ai montré que l'activé de Plk1 augmente rapidement en fin de phase G2 ~20 min avant l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1. Par ailleurs, j'ai apporté des preuves montrant que l'activation initiale de Plk1 n'était pas dépendante du complexe Cycline B1-Cdk1 comme le propose certaines études chez la levure et les cellules de mammifères [314,372]. En revanche, l'activation rapide de Plk1 observée en fin de phase G2 est dépendante à la fois de son activateur direct Aurora-A et du co-facteur hBora [282,283], mais également de l'activité du complexe Cycline A2-Cdk1/2 par des mécanismes qui restent à élucider. Mes résultats suggèrent que le complexe Cycline A2-Cdk1/2 pourrait être un élément permettant la coordination entre le processus de réplication de l'ADN en phase S et l'entrée des cellules en mitose, via la régulation de l'activation de Plk1, afin de préserver l'intégrité de l'information génétique transmise aux cellules filles (figure 41).

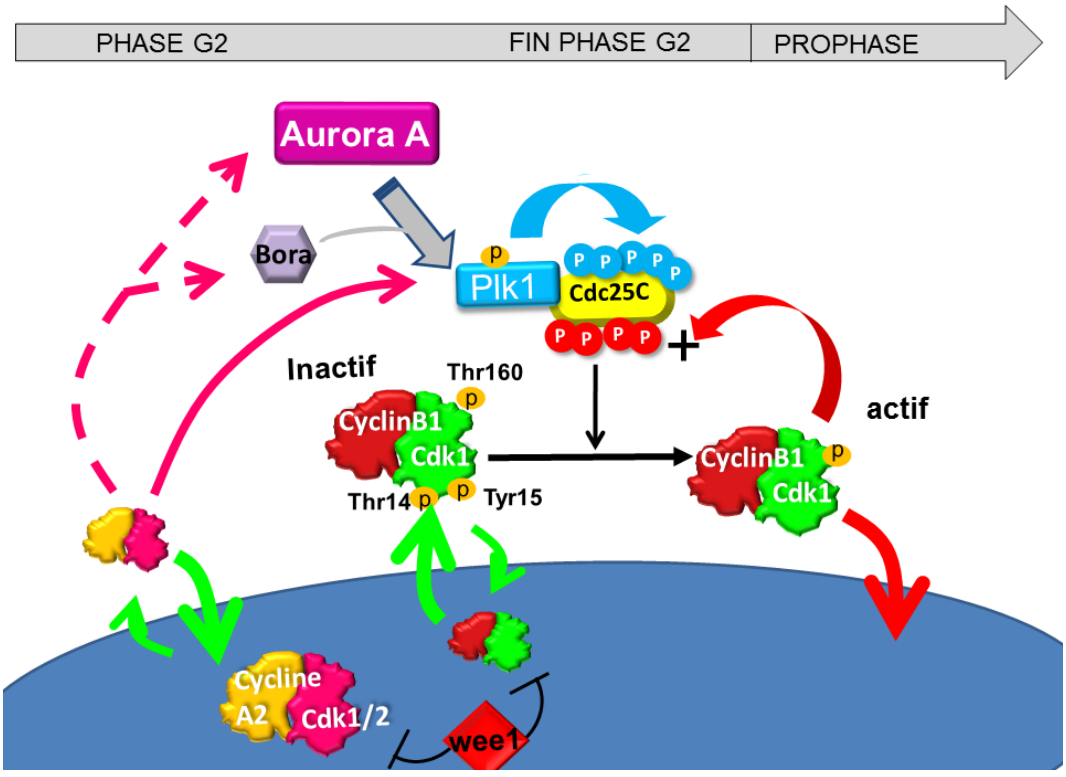


Figure 41 : modèle de mécanismes moléculaires contrôlant l'entrée en division.

Article : Plk1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis

Lilia Gheghiani, Damarys Loew,Berangere Lombard, Jorg Mansfeld, Olivier Gavet

Discussion

A. L'inhibition de l'activité de Plk1 conduit à un arrêt des cellules en mitose

Différentes études appuient l'hypothèse que la kinase Plk1 chez les vertébrés est nécessaire à la transition G2/mitose en agissant sur les régulateurs directs du complexe Cycline B1-Cdk1, tandis que d'autres travaux suggèrent que Plk1 n'est pas essentiel pour le déclenchement de l'entrée en mitose. Les études de la régulation du cycle méiotique d'ovocytes de Xénope font partie des premiers travaux à suggérer que la kinase Plk1 joue un rôle essentiel dans l'activation de Cdk1 [280,308,309]. En revanche, des études menées chez la levure ou chez la drosophile suggèrent plutôt que l'activité de Plk1 n'est pas requise pour l'engagement mitotique en soi, mais sa présence contribue à l'activation du MPF par un mécanisme de rétrocontrôle positif [314]. Par ailleurs, bien que plusieurs régulateurs directs du complexes Cyclines B1-Cdk1 ont été rapportés comme étant phosphorylés au moins in *vitro* par Plk1, son rôle dans le contrôle de l'entrée au sein des cellules de mammifères dans les conditions non perturbées est controversé. En effet, plusieurs travaux rapportent que l'inhibition de l'activité de Plk1 au sein de cellules cancéreuses est associée à un délai des cellules en phase G2 suivi d'un arrêt prononcé des cellules en mitose [300,316,317], alors que son inhibition au sein de cellules immortalisées conduit à un arrêt prononcé des cellules en phase G2 [300,390]. Ces différences notables parmi les organismes modèles pourraient être le reflet du degré, de chaque organisme, à tolérer l'absence de la kinase Plk1, mais aussi de la difficulté à complètement inhiber la kinase soit par l'ajout d'inhibiteur spécifique, soit par déplétion partielle de la kinase. Afin, de clarifier l'importance de Plk1 dans le contrôle de l'entrée en mitose, j'ai étudié l'effet de l'inhibition de Plk1 par différentes techniques au sein d'une lignée de cellules humaines cancéreuses HeLa et des cellules épithéliales non transformées hTERT RPE-1.

1) Étude de l'importance de Plk1 dans le contrôle de l'entrée en mitose des cellules cancéreuses HeLa et non transformées hTERT RPE1

Jusqu'à présent, l'effet de l'inhibition de Plk1 sur l'entrée des cellules de mammifères en mitose avait été principalement abordé par des techniques d'immunofluorescence sur cellules fixées, après 18, 24 ou 48 heures après avoir affecté l'activité de Plk1, et un décompte de l'index mitotique ; ou soit par des techniques de cytométrie en flux, qui ne permettent pas de discriminer les phases G2 de la mitose. Bien que plus ou moins informatives, ces études ne permettent pas de suivre en temps réel la cinétique de l'entrée des cellules en mitose, ou d'étudier l'hétérogénéité qui pourrait s'opérer au sein d'une population.

Ainsi au cours de mes travaux, j'ai étudié l'effet de l'inhibition de l'activité de la kinase Plk1 sur des cellules asynchrones suivies individuellement par des approches de vidéo microscopie en contraste de phase. L'entrée des cellules en mitose a été déterminée par l'arrondissement des cellules et la rupture de l'enveloppe nucléaire. Différents inhibiteurs pharmacologiques bien caractérisés de Plk1 ont été utilisés pour affecter l'activité de Plk1 en un temps précis (BI2536 [317], GSK461364 [391] 1,000 fois plus sélectifs pour Plk1 que Plk2&Plk3 *in vitro*). En utilisant ces composés, j'ai dans un premier temps observé que l'entrée des cellules hTERT-RPE1 était affectée de manière dose dépendante. En effet, à de faibles concentrations d'inhibiteur (20 à 40 nM), la plupart des cellules sont arrêtées en mitose avec pratiquement aucun effet sur le moment de l'entrée mitose (figure 42). À l'inverse, à des concentrations plus élevées (50 à 200 nM), les cellules s'arrêtent en phase G2 ne pouvant plus entrer en mitose au bout ~40min après traitement (figure 42). Ainsi, une inhibition partielle de Plk1 n'est pas suffisante pour inhiber la fonction de Plk1 dans le processus d'entrée en mitose, mais est suffisante pour permettre un arrêt des cellules en mitose dû au maintien du checkpoint en mitose. À l'inverse une inhibition (presque) complète de l'activité de Plk1 conduit à un arrêt des cellules en phase G2. Les résultats ont été obtenus au sein de cellules non perturbées asynchrones ce qui exclut le fait que Plk1 pourrait être nécessaire uniquement pour la récupération du cycle cellulaire après des dommages potentiels à l'ADN, induits par des procédures de synchronisation. Par ailleurs, dans les conditions de fortes concentrations de l'inhibiteur BI2536 ou GSK461364, l'inhibition des kinases effectrices du point de contrôle en phase G2, Chk1 et Chk2, ne résorbe pas, l'arrêt des cellules en phase G2 (figure 50). En parallèle, aucune augmentation des marques g-H2AX , 53BP1 ou de l'activation des voies de stress dépendante de p38 MAPK et SAPK / JNK ou encore l'accumulation des protéines p53 et p21 n'a été observée, dans les cellules en phase G2, en

présence des inhibiteurs de Plk1. Ensemble, ces observations permettent d'exclure l'hypothèse que l'arrêt des cellules observé en phase G2, suite à l'ajout des inhibiteurs de Plk1 à fortes concentrations, soit associé à une activation des voies de stress en réponse aux dommages à l'ADN, induites de manière aspécifique.

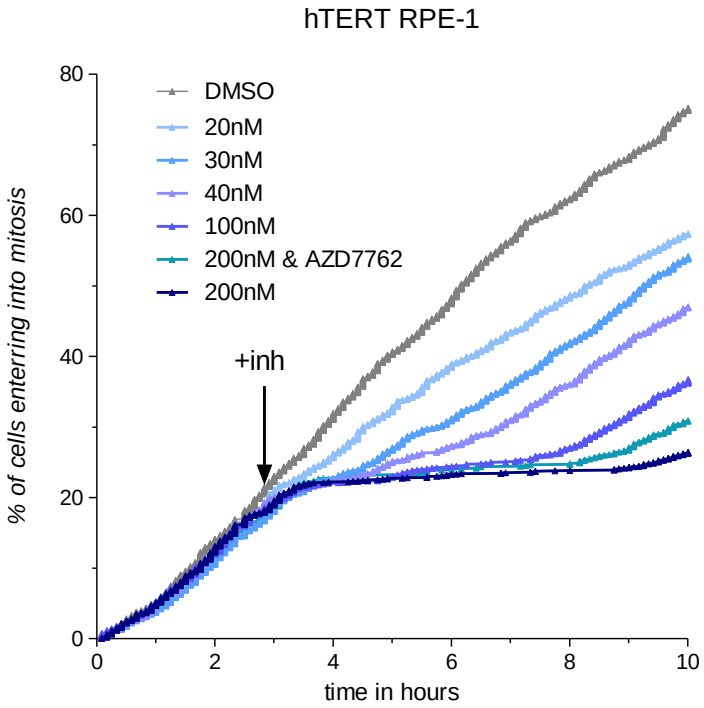


Figure 42 : Effet de l'inhibition de Plk1, à différentes doses, sur la cinétique d'entrée des cellules hTERT RPE-1.

L'entrée en mitose des cellules hTERT RPE-1 asynchrones, a été enregistrée par vidéo-microscopie en contraste de phase toutes les 1 image/5mins avant et après l'addition de l'inhibiteur de Plk1 BI2536 à différentes doses.

J'ai par la suite comparé l'effet de l'inhibition de Plk1 sur la cinétique d'entrée en mitose entre les cellules cancéreuses (HeLa) et non transformées (hTERT RPE1). Pour les deux types cellulaires, l'entrée des cellules en mitose après l'ajout soit de l'inhibiteur BI2536, soit l'inhibiteur GSK461364, à forte concentration, est inhibée. Cependant, à même concentration d'inhibiteur ajouté, les cellules cancéreuses se sont avérées moins sensibles que les cellules immortalisées (figure 43). En effet, même avec la dose la plus élevée, utilisée pour inhiber Plk1 (BI2536 200nM), certaines cellules sont toujours capables de rentrer en mitose. En vue de ce résultat, deux hypothèses peuvent être proposées : soit les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à l'inhibition de Plk1 et ont développé un mécanisme alternatif leur permettant de rentrer en mitose indépendamment de l'activité de Plk1, soit la dose de 200nM de Bi2536 n'est pas suffisante pour inhiber complétement l'activité de Plk1 dans ces cellules

qui surexpriment Plk1. L'utilisation d'un rapporteur FRET d'activité de Plk1 (site c-jun) dans les conditions où l'activité de Plk1 était inhibée (+200nM de Bi2536), m'a permis de déterminer que les cellules cancéreuses capables de rentrer en mitose, avaient une activité de Plk1 résiduelle (~25% de l'activité totale : passage d'une dynamique FRET maximale de 20% à 5% avec l'inhibiteur de Plk1) susceptible de promouvoir l'entrée des cellules en mitose.

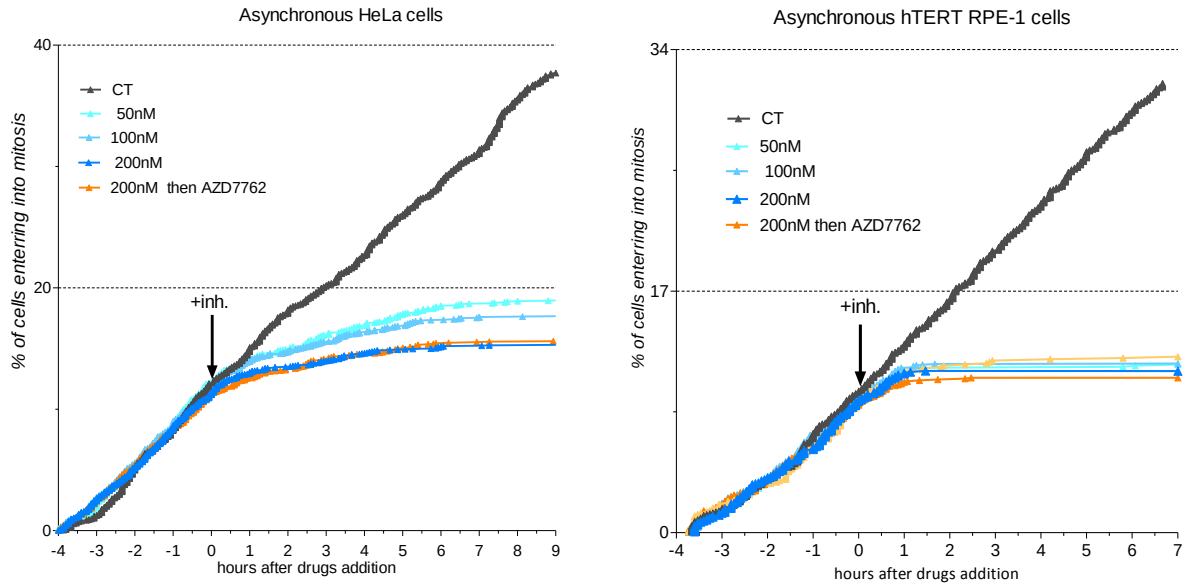


Figure 43 : Comparaison de l'effet de l'inhibition de Plk1, à différentes doses, sur la cinétique d'entrée en mitose des cellules HeLa et hTERT RPE-1.

L'entrée en mitose des cellules HeLa et hTERT RPE-1 asynchrones, a été enregistrée par vidéo-microscopie en contraste de phase toutes les 1 image/5mins avant et après l'addition de l'inhibiteur de Plk1 BI2536 à différentes doses.

2) Étude de l'effet de l'inhibition de Plk1 à long terme

Burkard et ses collaborateurs ont élaboré un modèle de cellules épithéliales immortalisées (hTERT-RPE1), dont les deux copies du locus du gène de Plk1 ont été supprimées par recombinaison homologue[392]. L'activité de Plk1 est reconstituée soit par l'expression d'une protéine de fusion GFP-Plk1 de type sauvage (GFP-Plk1^{wt}), soit par l'expression d'une forme mutée au niveau de la poche catalytique de Plk1 (Plk1^{as}) [392]. Cette mutation (C67V/L130G) élargie, le site catalytique de la forme Plk1^{as} spécifiquement inhibée par l'ajout d'analogue de l'ATP[392]. Ainsi ce modèle permet d'étudier les rôles de Plk1 dans l'entrée en mitose en ciblant spécifiquement Plk1 d'une part, et d'autre part procure un

témoin rapportant les effets aspécifiques du composé chimique utilisé (les cellules Plk1 ^{wt} pour l'analogue de l'ATP et Plk1^{as} pour l'inhibiteur BI2536).

Un suivi cinétique du nombre de cellules hTERT RPE1 *PLK1* $^{-/-}$ Plk1 ^{as} et Plk1^{wt} en mitose, après l'ajout soit de l'analogue de l'ATP, soit de l'inhibiteur BI2536 a été réalisé sur cellules fixées, à différents temps[392]. Burkard et collaborateurs ont observé que 18h après l'ajout de l'analogue de l'ATP, 30 % des cellules Plk1^{as} étaient arrêtées en mitose [392]. Ce résultat suggère qu'au bout d'un certain temps les cellules pourraient s'adapter à l'inhibition de Plk1 et mettre en place un mécanisme permettant de rentrer en mitose indépendamment de l'activité de Plk1. Une autre hypothèse serait que les cellules arrêtées en phase G2 pourraient continuer à accumuler les activateurs de l'entrée en mitose (Cdc25A, B&C, Aurora-A Cycline B1) et qu'au bout d'un certain seuil, elles puissent déclencher l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée en mitose. Enfin, une troisième hypothèse serait qu'à long terme, les inhibiteurs perdent leur efficacité conduisant à une persistance de l'activité de Plk1 suffisante pour permettre aux cellules de rentrer en mitose.

Afin de tester ces hypothèses, j'ai réalisé un suivi à long terme de l'entrée en mitose des cellules immortalisées hTERT-RPE1 *PLK1* $^{-/-}$ +GFP-Plk1^{WT} et GFP-Plk1^{AS} après l'ajout d'un inhibiteur de Plk1 BI2536 ou un analogue de l'ATP. Tout comme les cellules hTERT RPE1 l'inhibition de Plk1 conduit un arrêt des cellules en phase G2 pendant les 10 premières heures. Cependant, de manière intéressante, au bout de 10h, certaines cellules sont capables de reprendre leur cycle cellulaire et entrer en mitose. Dans la recherche d'une explication à ce phénomène, j'ai, d'une part, mis en évidence que l'efficacité de l'analogue de l'ATP était affectée au cours du temps (figure 44A). En effet, la pré-incubation de l'analogue de l'ATP à 37°C avant traitement sur les cellules réduit son efficacité à induire un arrêt des cellules en phase G2. D'autre part, j'ai observé que les cellules arrêtées en phase G2 continuent à accumuler Plk1 (suivi du niveau GFP-Plk1^{AS} et -Plk1^{WT} par vidéo-microscopie), et entrent avec un niveau protéique supérieur aux conditions normales (figure 44B). Enfin, j'ai mis en évidence que l'entrée des cellules était toujours dépendante de l'activité de Plk1, puisqu'un second traitement des cellules avec l'inhibiteur de Plk1 ou l'analogue de l'ATP, dix heures après le premier traitement, conduit à une réduction du nombre de cellules capables de rentrer en mitose (figure 44A).

A B

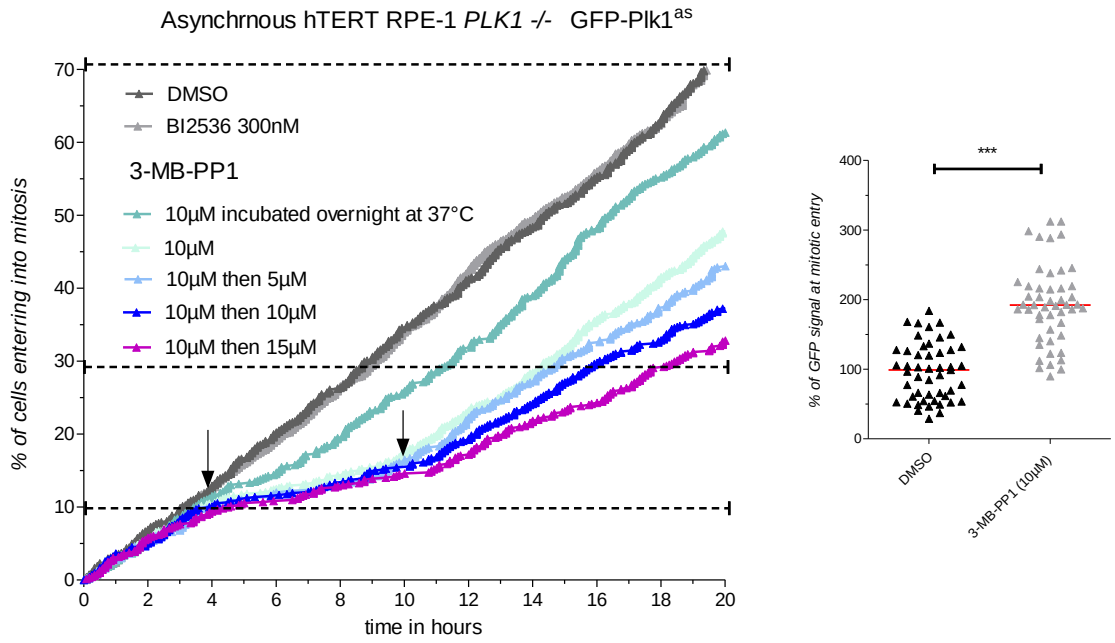


Figure 44 : Effet de l'inhibition de Plk^{as} à long terme sur la cinétique d'entrée sur les cellules hTERT RPE-1 *PLK1*$^{-/-}$ GFP-Plk1^{as}.

A. L'entrée des cellules asynchrones en mitose, a été enregistré par vidéo-microscopie en contraste de phase toutes les 1 image/5mins avant et après une première addition de l'inhibiteur de Plk1 BI2536 ou de l'analogue de l'ATP, puis un deuxième traitement avec différentes doses de l'analogue de l'ATP.
B. Comparaison du niveau protéique Plk1^{as}, dans les cellules hTERT RPE-1 *PLK1*$^{-/-}$ GFP-Plk1^{as} qui entrent en mitose, dix heures après traitement avec 10µM de l'analogue de l'ATP ou DMSO. Quantification du niveau de fluorescence GFP. Test statistique utilisé : t-test, *** p>0.001

B. Suivi de l'activité de Plk1 au cours de la progression G2-mitose

Précédemment, des analyses biochimiques ont montré que la protéine Plk1 s'accumule à partir de l'entrée des cellules en phase G2, alors que la forme active de Plk1, phosphorylée sur le résidu Thr210, n'est détectable qu'en fin de G2 [4,282]. D'autre part, des tests d'activité enzymatique *in vitro*, réalisés à partir de populations de cellules synchronisées, ont montré que les cinétiques d'activation de Plk1 et du complexe Cycline B1-Cdk1 semblent très proches, compatibles avec une activation tardive de Plk1 en G2 [296] . De manière inattendue, le développement d'un premier biosenseur de Plk1, basé sur un site de phosphorylation identifié sur la kinase Myt1 dans des cellules surexprimant Plk1, a révélé une augmentation linéaire de

l'activité de Plk1 pendant environ 5h avant l'entrée en mitose ; une cinétique très similaire à l'accumulation de la protéine elle-même [281,288]. Par ailleurs, il a été rapporté que ce biosenseur n'était pas spécifique de l'activité de Plk1, étant également phosphorylé au moment de l'entrée en mitose par la kinase Mps1, dont les sites consensus de phosphorylation sont très proches de ceux reconnus par Plk1. De plus, ce biosenseur est principalement phosphorylé dans le compartiment nucléaire jusqu'à la dernière heure avant la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'entrée en prophase. Cette phosphorylation nucléaire pourrait, au moins en partie, être une conséquence du recrutement ou de l'activation locale de Plk1 au niveau des centromères en phase G2 [4,247]. D'autre part, comme les biosenseurs utilisés enregistrent un équilibre entre des activités kinases et phosphatases opposées, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation linéaire de la phosphorylation de ce biosenseur dans le noyau en phase G2 pourrait refléter d'une part l'accumulation progressive de la protéine Plk1 possédant une activité enzymatique minimale et d'autre part l'absence d'activité phosphatase antagoniste dans le noyau, Myt1 étant une protéine exclusivement cytoplasmique[295]. De manière intéressante, il a récemment été montré que la localisation de Plk1 exclusivement nucléaire est inefficace pour déclencher l'entrée des cellules en mitose[393]. De manière surprenante, la synchronisation des cellules à la transition G1/S par traitement à la thymidine augmente la pente de la cinétique de phosphorylation du biosenseur au cours de la progression en phase G2, probablement en raison de niveaux d'expression de Plk1 plus élevés. En complément, j'ai analysé le comportement de la cinétique de phosphorylation du biosenseur après l'ajout d'un inhibiteur de la synthèse protéique une heure avant l'entrée en mitose. L'addition d'un tel inhibiteur induit un ralentissement immédiat de sa cinétique de phosphorylation, suivi par sa déphosphorylation progressive pour atteindre la valeur initiale au bout d'une heure. Ces observations suggèrent que ce biosenseur est relativement sensible à l'accumulation de la protéine au cours de la phase G2. Par ailleurs, l'inhibition de Plk1en phase G2 ou en mitose, conduit à une déphosphorylation lente du biosenseur (45-60min), suggérant que ce biosenseur n'est pas idéal pour suivre des variations rapides de l'activité de Plk1. Par ailleurs, le site Myt1 utilisé (ser426) a été retrouvé phosphorylé dans des cellules surexprimant Plk1, alors que sa phosphorylation dans des conditions physiologiques reste à déterminer [394]. Ainsi, la phosphorylation du biosenseur par les kinases Plk1 et Mps1 au cours de la dernière heure avant la mitose ne permet pas d'évaluer la régulation de l'activité Plk1 et sa contribution au contrôle de l'entrée dans la mitose.

Une seconde version améliorée de ce biosenseur FRET contenant un site de phosphorylation sur c-Jun élaborée par le laboratoire du Dr. M. Lampson (auteur de la première génération) a été utilisé pour étudier la cinétique d'activation de Plk1. Contrairement au biosenseur site Myt1, le biosenseur site c-Jun a une grande sensibilité pour les variations de l'activité de Plk1, et n'est pas reconnu par la kinase Mps1 [374,395]. Suite à la caractérisation de la spécificité du biosenseur site c-Jun pour les variations d'activité de Plk1, j'ai déterminé la cinétique d'activation de Plk1 sur cellules asynchrones suivies individuellement. J'ai observé que l'activité de la kinase Plk1 augmente rapidement en fin de phase G2, environ 40 min avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, atteint un niveau maximal en mitose et diminue à partir de l'entrée en anaphase, suite à la dégradation de la kinase. L'utilisation d'une lignée stable exprimant de manière constitutive la protéine de fusion Cycline B1-mCherry et le biosenseur de Plk1 a permis de comparer la cinétique d'accumulation de la Cycline B1 au noyau, utilisée comme rapporteur de l'activation du complexe Cycline B1-Cdk1 [142,144] , et l'activation de Plk1 respectivement. J'ai ainsi mis en évidence que l'activation de Plk1 précède d'environ 20 minutes celle de Cycline B1-Cdk1, initiant l'entrée des cellules en mitose (figure 45).

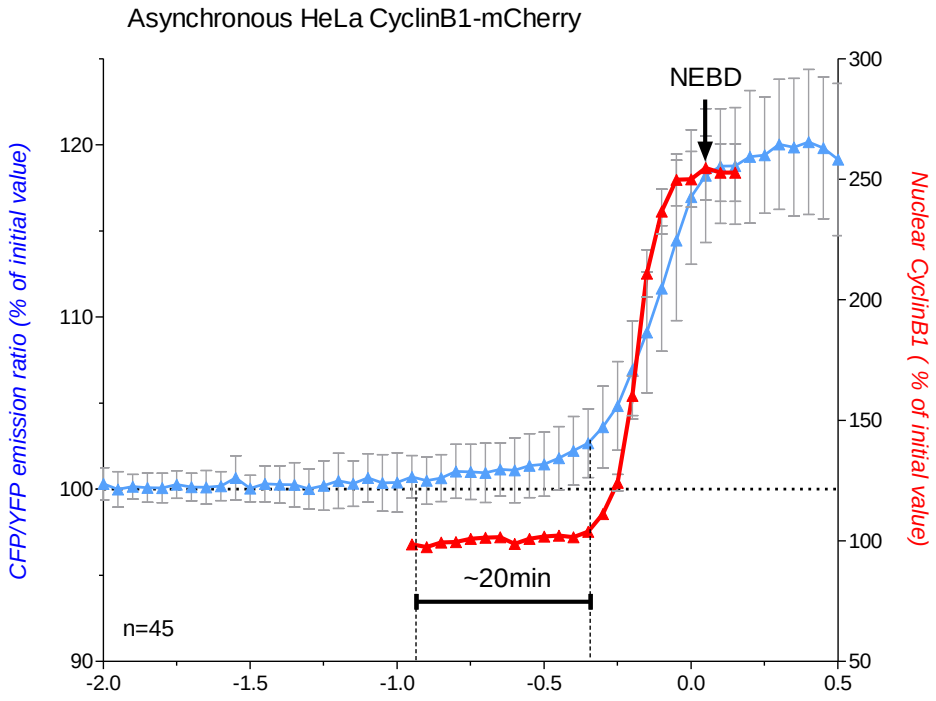


Figure 45 : Comparaison de la cinétique d'activation des kinases Plk1 et Cycline B1Cdk1 au cours de la progression G2-mitose.

Des cellules HeLa mcherry-Cycline B1 asynchrones, ont été transfectées avec le biosenseur de Plk1 (site c-jun), l'activité de Plk1 et Cycline B1-Cdk1 ont été enregistrées par suivi du ratio d'emission CFP/YFP et l'import nucléaire de Cycline B1 respectivement.

C. Les mécanismes moléculaires par lesquelles Plk1 contrôle l'entrée en mitose

Cdc25C a été identifié comme la cible principale de Plk1 au cours de la transition G2-mitose. Nos résultats montrent que Plk1 interagit progressivement avec Cdc25C au cours de la phase G2 et la phosphoryle sur de multiples sites identifiés. Bien que la contribution relative de Cdc25C dans le contrôle de l'entrée en mitose est assez nuancée de par le fait que l'inhibition plus ou moins partielle de Cdc25C par ARN interférence n'a aucun effet sur la cinétique d'entrée des cellules en mitose, j'ai montré que l'expression des formes mimant la phosphorylation de Cdc25C par Plk1 est suffisante pour promouvoir l'entrée des cellules en division. Par ailleurs, l'expression de la forme non phosphorylée conduit également à une entrée prématurée en mitose bien que plus limitée que l'expression des formes phospho-mimétiques. De manière intéressante, l'expression de la forme non phosphorylée, dans les conditions où l'activité de Plk1 est affectée, n'est plus en mesure de promouvoir l'entrée en division. En revanche, l'expression de la forme phospho-mimétique avec les cinq sites phosphorylés par Plk1, conservés chez les mammifères, est suffisante pour restaurer l'entrée des cellules en mitose lorsque Plk1 est inhibée. Ceci suggère que Cdc25C a un rôle dans l'entrée en division seulement lorsque la phosphatase est phosphorylée par Plk1. La localisation exclusivement cytoplasmique de Cdc25C et des formes Cdc25C phospho-mimétiques, jusqu'à la rupture de l'enveloppe nucléaire est cohérente avec le modèle actuel selon lequel l'activation de Cycline B1-Cdk1 est initiée au cytoplasme [141,142,396]. Cependant, les souris dont le gène de *Cdc25C* a été invalidé ainsi que les souris avec la double invalidation *Cdc25C&B* sont viables, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs compensatoires [397]. Un des mécanismes alternatifs pourrait être la régulation de la kinase Wee1 par Plk1. En effet, Plk1 est capable de phosphoryler Wee1 *in vivo*, et cette phosphorylation favorise sa dégradation subséquente qui pourrait conduire à l'entrée des cellules en mitose[194]. Une analyse de la cinétique de phosphorylation de Wee1 par Plk1 ainsi que le suivi en temps réel de sa dégradation au cours de la progression G2 mitose permettrait de déterminer si ces évènements participent à l'activation initiale du complexe Cycline B1-Cdk1 et l'entrée en mitose.

D. Cycline A2-Cdk, un candidat pour coordonner la réplication du génome et l'entrée en mitose via la régulation de l'activité de Plk1.

Mes résultats suggèrent que le complexe Cycline A2-Cdk2 régule l'activité enzymatique de Plk1 et probablement également de la kinase Aurora-A en amont. En accord avec cette hypothèse, plusieurs études proposent qu'une activité Cdk en amont serait responsable de l'activation de l'une et l'autre kinase[282,283,376,381,398]. Dans ce cadre, j'ai entrepris d'étudier si l'augmentation de l'activité de Cycline A2-Cdk en phase G2 peut initier le processus d'activation de Plk1. Une limitation majeure dans l'étude du rôle de Cycline A2-Cdk1/2 dans le processus d'entrée des cellules en mitose est l'absence d'inhibiteurs spécifiques par rapport aux complexes Cycline E-Cdk2 et Cycline B1-Cdk1. Néanmoins, des travaux précédents ont montré que contrairement au complexe Cycline B1-Cdk1 qui est régulé à la fois par les kinases Myt1 et Wee1, le complexe Cycline A2-Cdk2 est majoritairement régulé par la kinase Wee1 via la phosphorylation du résidu Tyr15, son activité étant peu affectée par Myt1[107,108,399]. J'ai pris avantage du développement d'un inhibiteur de la kinase Wee1 (dont la sélectivité a été testée sur 223 kinases, incluant Myt1)[400], pour stimuler prématurément l'activité du complexe Cycline A2-Cdk2 en début de phase G2 et étudier les conséquences potentielles sur la cinétique d'activation de Plk1. L'ajout de cet inhibiteur sur des cellules synchronisées en début de phase G2 conduit en quelques minutes à la déphosphorylation du résidu Tyr15 de Cdk2 et/ou Cdk1 complexées avec Cycline A2 ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation du site d'autophosphorylation (résidu S154 [401]) localisé sur la Cycline A2. Dans ces conditions, j'ai mis en évidence, par immunoblot et via l'utilisation du biosenseur de Plk1, une activation prématurée de Plk1 en début de phase G2 (environ 30 min après l'ajout de l'inhibiteur), précédant comme observée dans des conditions normales l'activation de Cycline B1-Cdk1 et l'entrée prématurée des cellules en mitose. Parallèlement, en utilisant une lignée Knock-In CyclineA2-Venus/+, j'ai mis en évidence, par immunoprécipitation, une interaction entre CyclineA2 et Plk1 endogènes, qui prend place en phase G2. Cette interaction est corrélée à l'activité du complexe CyclineA2-Cdk et augmente après stimulation de son activité. Mes résultats montrent donc que l'activation de Plk1, essentielle pour l'entrée en mitose, est dépendante du niveau d'activité CyclinA2-Cdk. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à déterminer.

Cycline A2-Cdk1/2 pourrait réguler l'activité de Plk1 en phase G2 de manière directe ou indirectement en modulant l'activité d'Aurora –A. En faveur d'une régulation directe sur

Plk1, plusieurs analyses phosphoprotéomiques ont identifié un deuxième site de phosphorylation au niveau de la boucle d'activation de Plk1 sur le résidu Thr214 dont la séquence flanquante correspond au motif consensus reconnu par une Cdk[402–404]. En effet, cette séquence possède une proline en position +1 qui est conservée à travers les espèces [275] . Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été montré que Cdc28, l'homologue de Cdk1 phosphoryle Cdc5, au niveau résidu homologue qui est essentiel pour l'activité de Cdc5 [312]. Chez le xénope ce même site contribue à une augmentation significatif de l'activité de Plx1[311]. Des études réalisées sur cellule humaines ont montré que la mutation de ce site est létale [275]. Par ailleurs, l'expression d'un mutant non phosphorylable pour ce site (Thr214Val) conduit à des défauts dans la progression en mitose, ainsi que dans le processus de prolifération cellulaire, bien qu'aucune preuve ne démontre que cette mutation n'interfère pas sur la conformation du domaine T-loop ou avec la liaison à l'ATP [275]. Il serait intéressant d'analyser la cinétique de phosphorylation de ce site au cours de la progression G2 mitose et d'identifier si cette phosphorylation est bien prise en charge par le complexe Cycline A2-Cdk1/2.

Cycline A2-Cdk1/2 pourrait également réguler l'activité de Plk1 indirectement soit par l'intermédiaire du co-facteur hBora soit en modulant l'activité de la kinase Aurora-A. En effet, il a été montré que le cofacteur hBora est retrouvé phosphorylé en de multiples sites par une activité cdk1[282,285]. Par ailleurs, il a été montré que ces éléments de phosphorylations favorisent l'interaction de hBora et Plk1 ce qui est nécessaire pour la phosphorylation de Plk1 par Aurora A et ainsi son activation. Notamment trois sites présents au niveau de la région N-terminale de hBora se sont révélés indispensable pour la fonction de hBora et son interaction avec Plk1 *in vitro* mais également *in vivo*[285]. Assurément, l'interaction Bora-Plk1 constitue un élément de régulation essentielle de l'activité de Plk1 cependant il reste à étudier le mécanisme d'action par lequel cette interaction favorise la phosphorylation de Plk1 par Aurora A et de ce fait son activation. Plusieurs scénarios peuvent être envisagés : d'une part cette interaction permet la libération de la boucle d'activation de Plk1 la rendant accessible pour Aurora A, d'autre part elle pourrait favoriser un rapprochement des kinases Plk1 et Aurora A, mais également réguler l'activation de Plk1 au moment opportun. Dans ce cas de figure, une proposition serait que l'augmentation progressive de l'activité du complexe Cycline A2-Cdk permettrait une augmentation de la phosphorylation de hBora jusqu'à un seuil conduisant à son interaction avec Plk1 et l'activation de la kinase. L'activation de la kinase Aurora-A est dépendante de son auto-phosphorylation sur son résidu Thr288 situé au niveau de sa boucle d'activation[405,406]. Trois phosphatases PP1 et PP2A et PP6 sont connues

pour réguler l'activité d'Aurora-A. Aurora-A s'associe avec la protéine phosphatase 1 (PP1) qui va conduire à la déphosphorylation des résidus indispensables à l'activité de la kinase notamment son site d'autophosphorylation [381]. L'association d'Aurora-A à la phosphatase PP2A, permet à PP2A d'induire la dégradation de la kinase en déphosphorylant le résidu Ser54 de la kinase[382]. L'activité de ces deux phosphastases est négativement régulée par Cdk1[407,408]. Ainsi, Cycline A2-Cdk1/2 pourrait réguler l'activité d'Aurora-A de manière indirecte en inactivant les phosphatases qui contrôlent négativement son activité.

Annexe

Bibliographie

1. Howard, A. & Pelc, S. R. Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs. *Exp. Cell Res.* **2,** 178–187 (1951).
2. Howard, A. & Pelc, S. R. Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity (Edinb).* **6,** 261–273 (1953).
3. Chagin, V. O. *et al.* 4D Visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replicons. *Nat. Commun.* **7,** (2016).
4. Akopyan, K. *et al.* Molecular Cell Resource Assessing Kinetics from Fixed Cells Reveals Activation of the Mitotic Entry Network at the S/G2 Transition. (2014).
5. Laoukili, J. *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* **7,** (2005).
6. Pines, J. & Hunter, T. solation of a Human Cyclin cDNA: Evidence for Cyclin mRNA and Protein Regulation in the Cell Cycle and for Interaction with p34 cdc2. (1989).
7. Giulia Piaggio, Andrea Farina, Danilo Perrotti, Isabella Manni, Paola Fuschi, Ada Sacchi, C. G. Structure and Growth-Dependent Regulation of the Human Cyclin B1 Promoter. *Exp. Cell Res.* **216,** 396–402 (1995).
8. Tanaka, M. *et al.* Cell-cycle-dependent Regulation of Human aurora A Transcription Is Mediated by Periodic Repression of E4TF1. (2002). doi:10.1074/jbc.M108252200
9. Wasner, M. *et al.* Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter. (2003).
10. Zhu, W., Giangrande, P. H. & Nevins, J. R. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J.* **23,** 4615–4626 (2004).
11. Fu, Z. *et al.* Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* **10,** 1076–1082 (2008).
12. Anja M. Duursma & Karlene A. Cimprich. Checkpoint recovery after DNA damage: a rolling stop for CDKs. *EMBO Rep.* **11,** (2010).

13. Laoukili, J. *et al.* Activation of FoxM1 during G 2 Requires Cyclin A/Cdk-Dependent Relief of Autorepression by the FoxM1 N-Terminal Domain. *Mol. Cell. Biol.* **28,** 3076–3087 (2008).

14. Goldstone, S., Pavey, S., Forrest, a, Sinnamon, J. & Gabrielli, B. Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* **20,** 921–932 (2001).

15. Bergoglio, V. *et al.* DNA synthesis by Pol n promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *jcb* (2013).

16. Crasta, K. *et al.* DNA breaks and chromosome pulverization from erros in mitosis. **482,** 53–58 (2012).

17. Letessier, A. *et al.* Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470,** 120–123 (2011).

18. Handt, O., Sutherland, G. R. & Richards, R. I. Fragile Sites and Minisatellite Repeat Instability. (2000). doi:10.1006/mgme.2000.2996

19. Hewett, D. R. *et al.* FRA10B Structure Reveals Common Elements in Repeat Expansion and Chromosomal Fragile Site Genesis. *Mol. Cell* **1,** 773–781 (1998).

20. Samadashwily, G., Raca, G. & Mirkin, S. M. trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. (1997).

21. Eitan Zlotorynski *et al.* Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile. (2003).

22. Le Beau, M. M. *et al.* Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum. Mol. Genet.* **7,** 755–761 (1998).

23. Heit, R., Rattner, J. B., Chan, G. K. T. & Hendzel, M. J. G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. (2009).

24. Monier, K., Mouradian, S. & Sullivan, K. F. DNA methylation promotes Aurora-B-driven phosphorylation of histone H3 in chromosomal subdomains. (2006).

25. Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B.-H. & Peters, J.-M. Histone H3 serine?10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438,** 1176–1180 (2005).

26. Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1?chromatin binding by histone H3 methylation and

phosphorylation. *Nature* **438,** 1116–1122 (2005).

27. Mikhailov, A., Shinohara, M. & Rieder, C. L. Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *J. Cell Biol.* **166,** 517–526 (2004).

28. Chin, C. F. & Yeong, F. M. Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **30,** 22–32 (2010).

29. Matsusaka, T. & Pines, J. Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **166,** 507–16 (2004).

30. Prendergast, L. *et al.* Premitotic Assembly of Human CENPs -T and -W Switches Centromeric Chromatin to a Mitotic State. *PLoS Biol* **9,** (2011).

31. Hayashi-Takanaka, Y., Yamagata, K., Nozaki, N. & Kimura, H. Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J. Cell Biol* **187,** 781–790 (2009).

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

33. Miake-Lye, R., Newport, J. & Kirschner, M. Maturation-promoting Factor Induces Nuclear Envelope Breakdown in Cycloheximide-arrested Embryos of Xenopus laevis. (1983).

34. Gautier, J. *et al.* Cyclin Is a Component of Maturation-Promoting Factor from Xenopus. *Cell* **60,** 487–494 (1990).

35. Lehner, C. F. & O 'farrell, P. H. The Roles of Drosophila Cyclins A and B in Mitotic Control. (1990).

36. Hartwell, L. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Exp. Cell Res.* **69,** 265–276 (1971).

37. Hartwell, L. H., Culotti, J. & Reidt, B. Genetic Control of the Cell-Division Cycle in Yeast, I. Detection of Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **66,** 352–359 (1970).

38. Hartwell, L. H. Three Additional Genes Required for Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **115,** 966–974 (1973).

39. Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R. & Reid, B. J. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast. *Source Sci. New Ser. Geophys. Sp. Phys. Phys. Chem. Sp.*

183, 46–51 (1974).

40. Hereford, L. M. & Hartwell, L. H. Sequential gene function in the initiation of Saccharomyces cerevisiae DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **84,** (1974).

41. Nurse, P. & Thuriaux, P. REGULATORY GENES CONTROLLlNG MITOSIS I N THE FISSION YEAST SCHZZOSACCHAROMYCES POMBE. (1980).

42. Lohka, M. J., Hayest, M. K. & Maller, J. L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events (cell cycle/mitosis/protein phosphorylation). *Cell Biol.* **85,** 3009–3013 (1988).

43. Labbe, J.-C. *et al.* MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* **8,** 3053–3058 (1989).

44. Meijer, L. *et al.* Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J.* **8,** 2275–2282 (1989).

45. Dorée Marcel & Hunt Tim. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? (2002).

46. Brown, N. R. *et al.* features of the essential cell cycle CDK. *Nat. Commun.* **6,** 1–12 (2015).

47. De Bondt HL1 *et al.* Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. (1993).

48. Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, M. W. Cyclin Activation of p34cdc2. *Cell* **63,** 1013–1024 (1990).

49. Pavletich, N. P. Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. (1999).

50. Jeffrey, P. D. *et al.* Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376,** 313–320 (1995).

51. Gunbin, K. V, Suslov, V. V, Turnaev, I. I., Afonnikov, D. A. & Kolchanov, N. A. Molecular evolution of cyclin proteins in animals and fungi. *BMC Evol. Biol.* **11,** 224 (2011).

52. Brandeis, M. *et al.* Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Cell Biol.* **95,** 4344–4349 (1998).

53. Tschöp, K., Müller, G. A., Grosche, J. & Engeland, K. Human cyclin B3: mRNA

expression during the cell cycle and identification of three novel nonclassical nuclear localization signals. *FEBS J.* **273,** 1681–1695 (2006).

54. Nguyen, T. B. *et al.* Characterization and Expression of Mammalian Cyclin B3, a Prepachytene Meiotic Cyclin*. *Publ. JBC Pap. Press* (2002). doi:10.1074/jbc.M203951200

55. Murray, A. & Kirschner, M. Dominoes and Clocks: The Union of Two Views of the C. (1989).

56. Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, M. W. Cyclin Activation of p34cdc2. *Cell* **63,** 1013–1024 (1990).

57. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. & Medema, R. H. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* **185,** 193–202 (2009).

58. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt ', T. The Discovery of Cyclins Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division. *Cell* **156,** 389–396 (1983).

59. Brandeis, M. & Hunt1, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* **15,** 5280–5289 (1996).

60. Hwang, A., Maity, A., Mckenna, W. G. & Muschel, R. J. Cell Cycle-dependent Regulation of the Cyclin B1 Promoter*. (1995).

61. Wasner, M. *et al.* Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism. (2003).

62. Zhu, W., Giangrande, P. H. & Nevins, J. R. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J.* **23,** 4615–4626 (2004).

63. Müller, G. A. & Engeland, K. The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle-dependent gene transcription. *FEBS J.* **277,** 877–893 (2010).

64. Wasner, M. *et al.* Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism. (2003).

65. Chae, H.-D., Yun, J., Bang, Y.-J. & Shin, D. Y. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. (2004).

66. Bolognese, F. *et al.* The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. (1999).

67. Sciortino, S. *et al.* The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells. *EMBO Rep.* **2,** 1018–1023 (2001).

68. Clute, P. & Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. **1,** (1999).

69. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. (1991).

70. Peters, J. M. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9,** 931–943 (2002).

71. Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V, Mann, M. & Peters, J. M. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* **11,** 1555–69 (2000).

72. Rudner, A. D. & Murray, A. W. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J. Cell Biol.* **149,** 1377–1390 (2000).

73. Jaspersen, S. L., Charles, J. F. & Morgan, D. O. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* **9,** 227–236 (1999).

74. Visintin, R. *et al.* The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Mol. Cell* **2,** 709–718 (1998).

75. Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16,** 335–342 (2005).

76. Sivakumar, S. & Gorbsky, G. J. HHS Public Access. **16,** 82–94 (2015).

77. Draetta, G. & Beach, D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: Cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* **54,** 17–26 (1988).

78. Draetta, G. *et al.* Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* **336,** 738–744 (1988).

79. Gould, K. L. & Nurse, P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342,** 189–92 (1989).

80. Krek, W. & Nigg, E. A. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10,** 305–16 (1991).

81. Solomon, M. J., Lee, T. & Kirschner, M. W. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell* **3,** 13–27 (1992).

82. Lolli, G. & Johnson, L. N. CAK-Cyclin-Dependent Activating Kinase: A key kinase in cell cycle control and a target for Drugs? *Cell Cycle* **4,** 572–577 (2005).

83. Holmes, J. K. & Solomon, M. J. The role of Thr160 phosphorylation of Cdk2 in substrate recognition. *Eur. J. Biochem.* **268,** 4647–4652 (2001).

84. Welburn, J. P. I. *et al.* How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J. Biol. Chem.* **282,** 3173–3181 (2007).

85. Merrick, K. a *et al.* Distinct activation pathways confer cyclin binding specificity on Cdk1and Cdk2 in human cells. *Mol. Cell* **32,** 662–672 (2008).

86. Kaldis, P. The cdk-activating kinase (CAK): From yeast to mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **55,** 284–296 (1999).

87. Fisher, R. P. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J. Cell Sci.* **118,** 5171–5180 (2005).

88. Cheng, A., Kaldis, P. & Solomon, M. J. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C?? and ??2 isoforms. *J. Biol. Chem.* **275,** 34744–34749 (2000).

89. De Smedt, V. *et al.* Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2: Regulation by protein phosphatase 2C in xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* **277,** 28592–28600 (2002).

90. Atherton-Fessler, S., Parker, L. L., Geahlen, R. L. & Piwnica-Worms, H. Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol. Cell. Biol.* **13,** 1675–85 (1993).

91. Marcote, M. J. *et al.* A three-dimensional model of the Cdc2 protein kinase: localization of cyclin- and Suc1-binding regions and phosphorylation sites. *Mol. Cell. Biol.* **13,** 5122–31 (1993).

92. Endkott, J. A., Nurse, P. & Njohnson, L. Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. **7,** 243–247 (1994).

93. Thuriaux, P., Nurse, P. & Carter, B. Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Mol. Gen.*

Genet. **161,** 215–220 (1978).

94. Lundgren, K. *et al.* Mik1 and Wee1 Cooperate in the Inhibitory Tyrosine Phosphorylation of Cdc2. *Cell* **64,** 1111–1122 (1991).

95. Norbury, C., Blow, J. & Nurse, P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* **10,** 3321–9 (1991).

96. Morla, A. 0, Draetta, G., Beach, D. & Wang ', J. Y. J. Reversible Tyrosine Phosphorylation of cdc2: Dephosphorylation Accompanies Activation during Entry into Mitosis. *Cell* **58,** 193–203 (1989).

97. Krek, W. & Nigg, E. A. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* **10,** 3331–41 (1991).

98. Pomerening, J. R., Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. Rapid Cycling and Precocious Termination of G1 Phase in Cells Expressing CDK1AF. *Mol. Biol. Cell* **19,** 3426–3441 (2008).

99. Lorca, T. *et al.* Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. *J. Cell Sci.* **123,** 2281–2291 (2010).

100. Igarashi, Nagata, Jinno, Suto & Okayama. Wee1(+)-like gene in human cells. (1991).

101. Watanabe, N., Broome, M. & Hunter, T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* **14,** 1878–1891 (1995).

102. Mcgowan, C. H. & Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12,** 75–85 (1993).

103. Parker, L. L., Sylvestret, P. J., Illt, M. J. B., Liut, F. & Piwnica-Wormst, H. Identification of a 95-kDa WEE l-like tyrosine kinase in HeLa cells. **92,** 9638–9642 (1995).

104. McGowan, C. H. & Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12,** 75–85 (1993).

105. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Piwnica-Worms, H. The Human Myt1 Kinase Preferentially Phosphorylates Cdc2 on Threonine 14 and Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex. **17,** 571–583 (1997).

106. Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., Newport, J. & Yamamoto, K. R. Membrane

Localization of the Kinase Which Phosphorylates p34cdC2 on Threonine 14. *Mol. Biol. Cell* **5,** 273–282 (1994).

107. Booher, R. N., Holman, P. S. & Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.* **272,** 22300–22306 (1997).

108. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Piwnica-Worms, H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* **17,** 571–83 (1997).

109. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Myti: A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Both Threonine-1 4 and Tyrosine-1 5. (1995).

110. Coulonval, K., Kooken, H. & Roger, P. P. Coupling of T161 and T14 phosphorylations protects cyclin B–CDK1 from premature activation. (2011). doi:10.1091/mbc.E11-02-0136

111. N.J. Wells, N., Watanabe, T., Tokusumi, W. J., Verdecia, M. A. & Hunter, T. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. (1999).

112. Booher, R., Holman, P. & Fattaey, A. Human Myt1 Is a Cell Cycle-regulated Kinase That Inhibits Cdc2 but Not Cdk2 Activity*. (1997).

113. Russell, P. & Nurse, P. Cdc25+ Functions As an Inducer in the Mitotic Control of Fission Yeast. *Cell* **45,** 145–153 (1986).

114. Ducommun, B., Draetta, G., Young, P. & Beach, D. FISSION YEAST CDC25 IS A CELL-CYCLE REGULATED PROTEIN. **167,** (1990).

115. Edgar, B. A. & O'Farrell, P. H. Genetic Control of Cell Division Patterns in the Drosophila Embryo. **27,** 590–609 (1989).

116. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. The cdc25 Protein Controls Tyrosine Dephosphorylation of the cdc2 Protein in a CelLFre6 System. *Cell* **64,** 903–914 (1991).

117. Jessus, C. & Beach, D. Oscillation of MPF Is Accompanied by Periodic Association between cdc25 and cdc2-Cyclin B. (1991).

118. Millar, J. B. A., Mcgowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R. & Russell, P. p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission

yeast. *EMBO J.* **1013,** 4301–4309 (1991).

119. Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. & Kirschner, M. W. cdc25 Is a Specific Tyrosine Phosphatase That Directly Activates p34cdc2. *Cell* **67,** 197–211 (1991).

120. Lee, M. S. *et al.* cdc25+ Encodes a Protein Phosphatase that Dephosphorylates p34cdC2. *Mol. Biol. Cell* **3,** 73–84 (1992).

121. Strausfeld *et al.* Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Trends Cell Biol.* **1,** 45 (1991).

122. Millar, J. B. A. & Russell, P. The cdc25 M-Phase Inducer: An Unconventional Protein Phosphatase. *Cell* **68,** 407–410 (1992).

123. Dunphy, W. G. & Kumagai, A. The cdc25 Protein Contains an Intrinsic Phosphatase Activity. *Cell* **67,** 189–196 (1991).

124. Sebastian, B., Kakizukat, A. & Hunter, T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Biochemistry* **90,** 3521–3524 (1993).

125. Boutros, Lobjois & Ducommun. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? (2007). doi:10.1038/nrc2169

126. Sadhu, K., Reed, S. 1, Richardson, H. & Russell, P. Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2 (cell cycle/mitotic control/mitosis/HeLa). *Genetics* **87,** 5139–5143 (1990).

127. Galaktionov, K. & Beach, D. Specific Activation of cdc25 Tyrosine Phosphatases by B-Type Cyclins: Evidence for Multiple Roles of Mitotic Cyclins. *Cell* **67,** 1161–1194 (1991).

128. Bertero, T. *et al.* CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND–CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell Death Differ.* **20,** 800–811 (2013).

129. Ferguson, A. M., White, L. S., Donovan, P. J. & Piwnica-Worms, H. Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 2853–2860 (2005).

130. Lincoln, A. J. *et al.* Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. (2002).

131. Chen, M.-S., Hurov, J., White, L. S., Woodford-Thomas, T. & Piwnica-Worms, H.

Absence of Apparent Phenotype in Mice Lacking Cdc25C Protein Phosphatase. **12,** 3853–3861 (2001).

132. Lee, G., White, L. S., Hurov, K. E., Stappenbeck, T. S. & Piwnica-Worms, H. Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. (2009).

133. Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M. & Pines, J. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* **17,** 4127–4138 (1998).

134. Yang, J. *et al.* Control of Cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. (1998).

135. Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M. & Nishida, E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G 2 checkpoint. *EMBO J.* **17,** 2728–2735 (1998).

136. Gavet, O. & Pines, J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* **189,** 247–259 (2010).

137. Pines, J. & Hunter, T. Human Cyclins A and Bl Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport. (1991).

138. Takizawa, C. G. & Morgan, D. O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1–Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12,** 658–665 (2000).

139. Moore, J. D., Yang, J., Truant, R. & Kornbluth, S. Nuclear Import of Cdk/Cyclin Complexes: Identification of Distinct Mechanisms for Import of Cdk2/Cyclin E and Cdc2/Cyclin B1. *J. Cell Biol.* **144,** 213–224 (1999).

140. Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya Nobuko, Iwamatsu, A. & Nishida, E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. (2001).

141. Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A. & Pines, J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5,** 143–148 (2003).

142. Gavet, O. & Pines, J. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* **189,** 247–259 (2010).

143. Potapova, T. A., Sivakumar, S., Flynn, J. N., Li, R. & Gorbsky, G. J. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. **22,** (2011).

144. Gavet, O. & Pines, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. **18,** 533–543 (2010).

145. Krenning, L., Feringa, F. M., Shaltiel, I. A., Van Den Berg, J. & Medema, R. H. Transient Activation of p53 in G2 Phase Is Sufficient to Induce Senescence. *Mol. Cell* **55,** 59–72 (2014).

146. Krenning, Feringa, Shaltiel, VandenBerg & Medem. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol. Cell* **55,** 59–72 (2014).

147. Kallstrom, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A. & Karlsson Rosenthal, C. dc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. (2005).

148. Arne Lindqvist, Helena Källström & Christina Karlsson Rosenthal. Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress. (2004).

149. Lie Davezac, N. *et al.* Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene* **19,** 2179–2185 (2000).

150. Gabrielli, B. G. *et al.* Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. (1996).

151. Pines, J. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. CELL Biol. cellbio.nature.com* **1,** (1999).

152. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. (1999).

153. Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L. & Piwnica-Worms, H. Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *2001*

154. Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F. & Draetta, G. F. Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep.* **1,** 71–79 (2000).

155. Gabrielli, B. G., Clark, J. M., McCormack, A. K. & Ellem, K. A. Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* **272,** 28607–14 (1997).

156. Peng, C. Y. *et al.* Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277,** 1501–5 (1997).

157. Jinno ', S. *et al.* Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13,** 1549–1556 (1994).

158. Galaktionov K1, Chen X & Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. (1996).

159. ELENA VIGO *et al.* CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase. (1999).

160. Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G. F. & Donzelli, M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* **23,** 2050–2056 (2004).

161. Zhao, H., Watkins, J. L. & Piwnica-Worms, H. Disruption of the checkpoint kinase 1c̄ell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation- induced S and G 2 checkpoints.

162. Busino, L. *et al.* Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426,** 87–91 (2003).

163. Kanemori, Y., Uto, K. & Sagata, N. Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 6279–84 (2005).

164. Storgaard Sørensen, C. *et al.* Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A.

165. Donzelli, M. *et al.* Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J.* **21,** 4875–84 (2002).

166. Mailand, N. *et al.* Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* **21,** 5911–20 (2002).

167. Korner, K., Jerome, V., Schmidt, T. & Muller, R. Cell Cycle Regulation of the Murine cdc25B Promoter ESSENTIAL ROLE FOR NUCLEAR FACTOR-Y AND A PROXIMAL REPRESSOR ELEMENT* Kathrin Kö rner, Valé rie Jé rô me. (2001). doi:10.1074/jbc.M008696200

168. Lammer, C. *et al.* The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 16),** 2445–53 (1998).

169. Lindqvist, A., K?llstr?m, H., Lundgren, A., Barsoum, E. & Rosenthal, C. K. Cdc25B

cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1?Cdk1 at the centrosome. *J. Cell Biol.* **171,** 35–45 (2005).

170. Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M. & Ducommun, B. Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* **272,** 32731–4 (1997).

171. Dutertre, S. *et al.* Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J. Cell Sci.* **117,** 2523–31 (2004).

172. Theis-Febvre, N. *et al.* Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* **22,** 220–232 (2003).

173. Lobjois, V., Jullien, D., Bouch?, J.-P. & Ducommun, B. The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793,** 462–468 (2009).

174. Girard, F. *et al.* cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J. Cell Biol.* **118,** 785–94 (1992).

175. Haugwitz, U. *et al.* A single cell cycle genes homology region (CHR) controls cell cycle-dependent transcription of the cdc25C phosphatase gene and is able to cooperate with E2F or Sp1/3 sites. *Nucleic Acids Res.* **30,** (2002).

176. Jessus, C. & Beach, D. Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* **68,** 323–32 (1992).

177. Strausfeld, U. *et al.* Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* **269,** 5989–6000 (1994).

178. Peng, C. Y. *et al.* C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.* **9,** 197–208 (1998).

179. Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282,** 1893–7 (1998).

180. Sanchez, Y. *et al.* Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277,** 1497–501 (1997).

181. Roshak, A. K. *et al.* The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell. Signal.* **12,** 405–11 (2000).

182. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science* **273,** 1377–80 (1996).

183. Elia, A. E. H., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. Proteomic Screen Finds pSer/pThr-Binding Domain Localizing Plk1 to Mitotic Substrates. **214,** 93–94 (2003).

184. Squire, C. J., Dickson, J. M., Ivanovic, I. & Baker, E. N. Structure and Inhibition of the Human Cell Cycle Checkpoint Kinase, Wee1A Kinase. *Structure* **13,** 541–550 (2005).

185. Okamoto, K. & Sagata, N. Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase.

186. Watanabe, N., Broome, M. & Hunter, T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* **14,** 1878–91 (1995).

187. McGowan, C. H. & Russell, P. Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* **14,** 2166–75 (1995).

188. Aligue, R., Wu, L. & Russell, P. Regulation of Schizosaccharomyces pombe Wee1 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **272,** 13320–5 (1997).

189. Sia, R. A., Bardes, E. S. & Lew, D. J. Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *EMBO J.* **17,** 6678–88 (1998).

190. Harvey, S. L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S. P. & Kellogg, D. R. Cdk1-Dependent Regulation of the Mitotic Inhibitor Wee1. *Cell* **122,** 407–420 (2005).

191. Michael, W. M. & Newport, J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* **282,** 1886–9 (1998).

192. Ayad, N. G. *et al.* Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* **113,** 101–13 (2003).

193. Smith, A., Simanski, S., Fallahi, M. & Ayad, N. G. Redundant Ubiquitin Ligase Activities Regulate Wee1 Degradation and Mitotic Entry. *Cell Cycle* **6,** 2795–2799 (2007).

194. Watanabe, N. *et al.* Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 11663–8 (2005).

195. Kim, S. Y., Song, E. J., Lee, K.-J. & Ferrell, J. E. Multisite M-Phase Phosphorylation of Xenopus Wee1A. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 10580–10590 (2005).

196. Li, C., Andrake, M., Dunbrack, R. & Enders, G. H. A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* **30,** 116–30 (2010).

197. Enders, G. H. Gauchos and ochos: a Wee1-Cdk tango regulating mitotic entry. *Cell Div.* **5,** 12 (2010).

198. Coverley, D., Laman, H. & Laskey, R. A. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* **4,** (2002).

199. Chibazakura, T. *et al.* Cyclin A Promotes S-Phase Entry via Interaction with the Replication Licensing Factor Mcm7. *Mol. Cell. Biol.* **31,** 248–255 (2011).

200. Furuno, N., Den Elzen, N. & Pines, J. Human Cyclin A Is Required for Mitosis until Mid Prophase. *J. Cell Biol.* **147,** 295–306 (1999).

201. Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11,** 961–971 (1992).

202. Hu, B., Mitra, J., Heuvel, S. & Enders, G. H. S and G 2 Phase Roles for Cdk2 Revealed by Inducible Expression of a Dominant-Negative Mutant in Human Cells. **21,** 2755–2766 (2001).

203. Mitra, J. & Enders, G. H. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. (2004).

204. Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E. & Draetta, G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12,** 53–63 (1993).

205. Zerjatke, T. *et al.* Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep.* **19,** 1953–1966 (2017).

206. Sunkel, C. E. & Glover, D. M. polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* **89 (Pt 1),** 25–38 (1988).

207. Archambault, V. & Glover, D. M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 265–275 (2009).

208. Kitada, K., Johnson, a L., Johnston, L. H. & 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.* **13,** 4445–4457 (1993).

209. Ohkura, H., Hagan, I. M. & Glover, D. M. 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.* **9,** 1059–1073 (1995).

210. Ouyang, B., Wang, Y. & Dai, W. *Caenorhabditis Elegans* Contains Structural Homologs of Human *prk* and *plk*. *DNA Seq.* **10,** 109–113 (1999).

211. Chase, D., Golden, A., Heidecker, G. & Ferris, D. K. Caenorhabditis elegans contains a third polo-like kinase gene. *DNA Seq* **11,** 327–334 (2000).

212. Duncan, P. I., Pollet, N., Niehrs, C. & Nigg, E. A. Cloning and Characterization of Plx2 and Plx3, Two Additional Polo-like Kinases from Xenopus laevis. *Exp. Cell Res.* **270,** 78–87 (2001).

213. Chase, D. *et al.* The Polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in Caenorhabditis elegans. *Genesis* **26,** 26–41 (2000).

214. Rahman, M. M. *et al.* Caenorhabditis elegans polo-like kinase PLK-1 is required for merging parental genomes into a single nucleus. *Mol. Biol. Cell* **26,** 4718–35 (2015).

215. Tavernier, N. *et al.* Cdk1 phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* **208,** 661–669 (2015).

216. Noatynska, A., Tavernier, N., Gotta, M. & Pintard, L. Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open Biol.* **3,** 130083 (2013).

217. Budirahardja, Y. & Gönczy, P. PLK-1 asymmetry contributes to asynchronous cell division of C. elegans embryos. *Development* **135,** (2008).

218. A. Kumagai and G. Dunphy. Purification and Molecular Cloning of Plx1 , a Cdc25-Regulatory Kinase from Xenopus Egg Extracts. **273,** 1377–1380 (1996).

219. Liu, J. & Maller, J. L. Xenopus Polo-like kinase Plx1: a multifunctional mitotic kinase. *Oncogene* **24,** 238–247 (2005).

220. Lu, L.-Y. *et al.* Polo-Like Kinase 1 Is Essential for Early Embryonic Development and Tumor Suppression. *Mol. Cell. Biol.* **28,** 6870–6876 (2008).

221. Fode, C., Motro, B., Yousefi, S., Heffernan, M. & Dennis, J. W. 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.* **91,** 6388–92 (1994).

222. Li, J. *et al.* SAK, A New Polo-Like Kinase, Is Transcriptionally Repressed by p53 and

Induces Apoptosis upon RNAi Silencing. *Neoplasia* **7,** 312–323 (2005).

223. Grosstessner-Hain, K. *et al.* Quantitative Phospho-proteomics to Investigate the Polo-like Kinase 1-Dependent Phospho-proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **10,** M111.008540-M111.008540 (2011).

224. Kettenbach, A. N. *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells. *NIH Public Access* **4,** (2013).

225. Nakojima, 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.* **278,** 25277–25280 (2003).

226. Clay, F. J., McEwen, S. J., Bertoncello, I., Wilks, A. F. & Dunn, A. R. 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.* **90,** 4882–4886 (1993).

227. Hanks, S. K. *et al.* Domains Linked references are available on JSTOR for this article : The Protein Kinase Family : Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. **241,** 42–52 (1988).

228. Archambault, V. & Carmena, M. Polo-like kinase-activating kinases. Aurora-A, Aurora-B and what else? *Cell Cycle* **118,** 1490–1495 (2012).

229. Kothe, M. *et al.* Structure of the Catalytic Domain of Human Polo-like Kinase 1. 5960–5971 (2007). doi:10.1021/BI602474J

230. Kothe, M. *et al.* Selectivity-determining residues in Plk1. *Chem. Biol. Drug Des.* **70,** 540–546 (2007).

231. Elia, A. E. H. *et al.* The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115,** 83–95 (2003).

232. Liu, Z., Sun, Q. & Wang, X. PLK1, A potential target for cancer therapy. *Transl. Oncol.* **10,** 22–32 (2017).

233. Cheng, K., Lowe, E. D., Sinclair, J., Nigg, E. A. & Johnson, L. N. The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. **22,** 5757–5768 (2003).

234. Smith, M. R. *et al.* Malignant Transformation of Mammalian Cells Initiated by Constitutive Expression of thePolo-like Kinase1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

234, 397–405 (1997).

235. Uchiumi, T., Longo, D. & Ferris, D. Cell Cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK). *J Biol Chem* **272,** 9166–74 (1997).

236. Zhu, H., Chang, B. & Uchiumi, T. Identification of Promoter Elements Responsible for Transcriptional Inhibition of Polo-like Kinase 1 and Topoisomerase IIα Genes by p21. *Cell Cycle* **1,** 59–66 (2002).

237. Martin, B. T. & Strebhardt, K. Polo-like kinase 1: Target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle* **5,** 2881–2885 (2006).

238. Gunawardena, R. W. *et al.* Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J. Biol. Chem.* **279,** 29278–29285 (2004).

239. Tategu, M. *et al.* Transcriptional regulation of human polo-like kinases and early mitotic inhibitor. *J. Genet. Genomics* **35,** 215–224 (2008).

240. De Cárcer, G. Heat shock protein 90 regulates the metaphase-anaphase transition in a polo-like kinase-dependent manner. *Cancer Res.* **64,** 5106–5112 (2004).

241. Liu, X. *et al.* CCT Chaperonin Complex Is Required for the Biogenesis of Functional Plk1. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 4993–5010 (2005).

242. Lindon, C. & Pines, J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* **164,** 233–241 (2004).

243. Mulvihill, D. P., Petersen, J., Ohkura, H., Glover, D. M. & Hagan, I. M. Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in Schizosaccharomyces pombe. *Mol. Biol. Cell* **10,** 2771–85 (1999).

244. Lera, R. F. & Burkard, M. E. High mitotic activity of polo-like kinase 1 is required for chromosome segregation and genomic integrity in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **287,** 42812–42825 (2012).

245. Van De Weerdt, B. C. M. & Medema, R. H. Polo-like kinases: A team in control of the division. *Cell Cycle* **5,** 853–864 (2006).

246. Barr, F. A., Silljé, H. H. W. & Nigg, E. A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5,** 429–441 (2004).

247. McKinley, K. L. & Cheeseman, I. M. Polo-like kinase 1 licenses CENP-A deposition at centromeres Kara. *NIH Public Access* **23,** 1–7 (2014).

248. Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, a M. & Nigg, E. a. Cell-Cycle Regulation of the Activity and Subcellular-Localization of Plk1, A Human Protein-Kinase Implicated in Mitotic Spindle Function. *J. Cell Biol.* **129,** 1617–1628 (1995).

249. Taniguchi, E., Toyoshima-Morimoto, F. & Nishida, E. Nuclear translocation of Plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **277,** 48884–48888 (2002).

250. Arnaud, L., Pines, J. & Nigg, E. A. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* **107,** 424–429 (1998).

251. Glover, D. M., Hagan, I. M. & Tavares, Á. A. M. Polo-like kinases: A team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* **12,** 3777–3787 (1998).

252. Tsvetkov, L. & Stern, D. F. Interaction of Chromatin-associated Plk1 and Mcm7. *J. Biol. Chem.* **280,** 11943–11947 (2005).

253. Stuermer, A. *et al.* Mouse pre-replicative complex proteins colocalise and interact with the centrosome. *Eur. J. Cell Biol.* **86,** 37–50 (2007).

254. Wu, Z.-Q. & Liu, X. Role for Plk1 phosphorylation of Hbo1 in regulation of replication licensing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105,** 1919–1924 (2008).

255. Sumara, I. *et al.* The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* **9,** 515–25 (2002).

256. Hauf, S. *et al.* Dissociation of Cohesin from Chromosome Arms and Loss of Arm Cohesion during Early Mitosis Depends on Phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* **3,** e69 (2005).

257. Zhang, N., Panigrahi, A. K., Mao, Q. & Pati, D. Interaction of Sororin Protein with Polo-like Kinase 1 Mediates Resolution of Chromosomal Arm Cohesion. *J. Biol. Chem.* **286,** 41826–41837 (2011).

258. Kang, Y. H. *et al.* Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation. *Mol. Cell* **24,** 409–22 (2006).

259. Kang, Y. H. *et al.* Mammalian polo-like kinase 1-dependent regulation of the PBIP1-CENP-Q complex at kinetochores. *J. Biol. Chem.* **286,** 19744–57 (2011).

260. Lowery, D. M. *et al.* Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *EMBO J.* **26,** 2262–2273 (2007).

261. Neef, R. *et al.* Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat. Cell Biol.* **9,** 436–444 (2007).

262. Santamaria, A. *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* **18,** 4024–36 (2007).

263. Archambault, V., D'Avino, P. P., Deery, M. J., Lilley, K. S. & Glover, D. M. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphopriming-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. *Genes Dev.* **22,** 2707–2720 (2008).

264. Beck, J. & Peter, M. Regulating PLK1 dynamics by Cullin3/KLHL22-mediated ubiquitylation. *Cell Cycle* **12,** 2528–9 (2013).

265. Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S. C., Guerrero, A. & Bettencourt-Dias, M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 433–52 (2014).

266. Hanisch, A., Wehner, A., Nigg, E. A. & Sillje, H. H. W. Different Plk1 Functions Show Distinct Dependencies on Polo-Box Domain-mediated Targeting. *Mol. Biol. Cell* **125,** 351–369 (2006).

267. Park, J. E. *et al.* Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell. Mol. Life Sci.* **67,** 1957–1970 (2010).

268. Lee, K. S., Grenfell, T. Z., Yarm, F. R. & Erikson, R. L. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 9301–6 (1998).

269. Song, S., Grenfell, T. Z., Garfield, S., Erikson, R. L. & Lee, K. S. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 286–98 (2000).

270. Jang, Y.-J., Lin, C.-Y., Ma, S. & Erikson, R. L. Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 1984–9 (2002).

271. García-Alvarez, B., de Cárcer, G., Ibañez, S., Bragado-Nilsson, E. & Montoya, G. Molecular and structural basis of polo-like kinase 1 substrate recognition: Implications in centrosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 3107–12 (2007).

272. Jang, Y. J., Ma, S., Terada, Y. & Erikson, R. L. Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.* **277,** 44115–44120 (2002).

273. Mundt, K. E., Golsteyn, R. M., Lane, H. A. & Nigg, E. A. On the Regulation and Function of Human Polo-like Kinase 1 (PLK1): Effects of Overexpression on Cell Cycle Progression. (1997).

274. Xu, J., Shen, C., Wang, T. & Quan, J. Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20,** 1047–1053 (2013).

275. Lasek, A. L., McPherson, B. M., Trueman, N. G. & Burkard, M. E. The Functional Significance of Posttranslational Modifications on Polo-Like Kinase 1 Revealed by Chemical Genetic Complementation. *PLoS One* **11,** e0150225 (2016).

276. Qian, Y. W., Erikson, E. & Maller, J. L. Mitotic effects of a constitutively active mutant of the Xenopus polo-like kinase Plx1. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 8625–32 (1999).

277. Alves, P. S., Godinho, S. A. & Tavares, Á. A. The Drosophila orthologue of xPlkk1 is not essential for Polo activation and is necessary for proper contractile ring formation. *Exp. Cell Res.* **312,** 308–321 (2006).

278. Ellinger-Ziegelbauer, H. *et al.* Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells. *Genes to Cells* **5,** 491–498 (2000).

279. Kelm, O., Wind, M., Lehmann, W. D. & Nigg, E. A. Cell cycle-regulated phosphorylation of the Xenopus polo-like kinase Plx1. *J. Biol. Chem.* **277,** 25247–25256 (2002).

280. Qian, A. Y. *et al.* Purification and Cloning of a Protein Kinase That Phosphorylates and Activates the Polo like Kinase Plx1. **282,** 1701–1704 (1998).

281. Macůrek, L. *et al.* Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455,** 119–123 (2008).

282. Seki, A., Coppinger, J. & Jang, C. Bora and Aurora A Cooperatively Activate Plk1 and Control the Entry into Mitosis. *Sci. (New York,* **320,** 1655–1658 (2008).

283. Tavernier, N. *et al.* Cdk1 phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in C. elegans embryos. *J. Cell Biol.* **208,** 661–669 (2015).

284. Chan, E. H. Y., Santamaria, A., Silljé, H. H. W. & Nigg, E. A. Plk1 regulates mitotic

Aurora A function through βTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma* **117,** 457–469 (2008).

285. Thomas, Y. *et al.* Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in C. elegans and Human Cells. *Cell Rep.* **15,** 510–518 (2016).

286. Noatynska, A., Panbianco, C. & Gotta, M. SPAT-1/Bora acts with Polo-like kinase 1 to regulate PAR polarity and cell cycle progression. *Development* **137,** 3315–3325 (2010).

287. Seki, A. *et al.* Plk1- and b-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. *J. Cell Biol.* **181,** 65–78 (2008).

288. Bruinsma, W., Macůrek, L., Freire, R., Lindqvist, A. & Medema, R. H. Bora and Aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. *J. Cell Sci.* **127,** 801–811 (2014).

289. Weerdt, B. C. M. Van De *et al.* Uncoupling Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome Activity from Spindle Assembly Checkpoint Control by Deregulating Polo-Like Kinase 1 †. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 2031–2044 (2005).

290. Lowery, D. M., Lim, D. & Yaffe, M. B. Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene* **24,** 248–259 (2005).

291. Kitajima, T. S. *et al.* Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441,** 46–52 (2006).

292. Foley, E. A., Maldonado, M. & Kapoor, T. M. Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat. Cell Biol.* **13,** 1265–71 (2011).

293. Yamashiro, S. *et al.* Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1 Regulates Mitosis by Antagonizing Polo-like Kinase 1. *Dev. Cell* **14,** 787–797 (2008).

294. Yamashiro, S. *et al.* Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1 Regulates Mitosis by Antagonizing Polo-like Kinase 1. *Dev. Cell* **14,** 787–797 (2008).

295. Bruinsma, W., Raaijmakers, J. A. & Medema, R. H. Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. *Trends Biochem. Sci.* **37,** 534–42 (2012).

296. Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M. & Nigg, E. A. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* **129,** 1617–28 (1995).

297. 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.* **278,** 25277–80 (2003).

298. Donaldson, M. M., Tavares, A. A., Hagan, I. M., Nigg, E. A. & Glover, D. M. The mitotic roles of Polo-like kinase. *J. Cell Sci.* **114,** 2357–8 (2001).

299. Pinson, X., Archambault, V. & Pinson, X. Les kinases de type Polo : maîtresses du cycle cellulaire et cibles thérapeutiques. 1–16 (2012).

300. Lane, H. A. & Nigg, E. A. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* **135,** 1701–13 (1996).

301. Sumara, I. *et al.* Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. *Curr. Biol.* **14,** 1712–1722 (2004).

302. Gim?nez-Abi?n, J. F. *et al.* Regulation of Sister Chromatid Cohesion between Chromosome Arms. *Curr. Biol.* **14,** 1187–1193 (2004).

303. Kraft, C. *et al.* Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* **22,** 6598–609 (2003).

304. Petronczki, M., Lénárt, P. & Peters, J.-M. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell* **14,** 646–59 (2008).

305. Yim, H. & Erikson, R. L. Polo-like kinase 1 depletion induces DNA damage in early S prior to caspase activation. *Mol. Cell. Biol.* **29,** 2609–21 (2009).

306. Shorter, J. & Warren, G. Golgi Architecture and Inheritance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18,** 379–420 (2002).

307. Wang, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J. & Warren, G. A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J.* **22,** 3279–90 (2003).

308. Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C. & Maller, J. L. Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis. *Mol. Cell. Biol.* **18,** 4262–71 (1998).

309. Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E. & Maller, J. L. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes. *Mol. Biol. Cell* **12,** 1791–9 (2001).

310. Izumi, T. & Maller, J. L. Phosphorylation and activation of the Xenopus Cdc25

phosphatase in the absence of Cdc2 and Cdk2 kinase activity. *Mol. Biol. Cell* **6,** 215–26 (1995).

311. Abrieu, A. *et al.* 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.* **111 (Pt 12),** 1751–7 (1998).

312. Mortensen, E. M., Haas, W., Gygi, M., Gygi, S. P. & Kellogg, D. R. Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. *Curr. Biol.* **15,** 2033–7 (2005).

313. Petersen, J. & Hagan, I. M. Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* **435,** 507–12 (2005).

314. Grallert, A. *et al.* Centrosomal MPF triggers the mitotic and morphogenetic switches of fission yeast. doi:10.1038/ncb2633

315. Wachowicz, P., Fernández-Miranda, G., Marugán, C., Escobar, B. & de Cárcer, G. Genetic depletion of Polo-like kinase 1 leads to embryonic lethality due to mitotic aberrancies. *Bioessays* **38 Suppl 1,** S96–S106 (2016).

316. Liu, X. & Erikson, R. L. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99,** 8672–8676 (2002).

317. Lénárt, P. *et al.* The Small-Molecule Inhibitor BI 2536 Reveals Novel Insights into Mitotic Roles of Polo-like Kinase 1. *Curr. Biol.* **17,** 304–315 (2007).

318. Liu, Z., Sun, Q. & Wang, X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl. Oncol.* **10,** 22–32 (2016).

319. Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C. & Ferrari, S. Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* **25,** 338–48 (2006).

320. Falck,Mailand, S. & sen, B. The ATM±Chk2±Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Lett. to Nat.* (2001).

321. Qin, B., Gao, B., Yu, J., Yuan, J. & Lou, Z. Ataxia Telangiectasia-mutated-and Rad3-related Protein Regulates the DNA Damage-induced G 2 /M Checkpoint through the Aurora A Cofactor Bora Protein * □ S. (2013).

322. Yata, K. *et al.* BRCA2 coordinates the activities of cell-cycle kinases to promote genome stability. *Cell Rep.* **7,** 1547–59 (2014).

323. Lin, H.-R., Ting, N. S. Y., Qin, J. & Lee, W.-H. M Phase-specific Phosphorylation of

BRCA2 by Polo-like Kinase 1 Correlates with the Dissociation of the BRCA2-P/CAF Complex. *J. Biol. Chem.* **278,** 35979–35987 (2003).

324. Lee, M., Daniels, M. J. & Venkitaraman, A. R. Phosphorylation of BRCA2 by the Polo-like kinase Plk1 is regulated by DNA damage and mitotic progression. *Oncogene* **23,** 865–72 (2004).

325. Yoo, H. Y. *et al.* Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* **117,** 575–88 (2004).

326. Jurvansuu, J., Fragkos, M., Ingemarsdotter, C. & Beard, P. Chk1 Instability Is Coupled to Mitotic Cell Death of p53-deficient Cells in Response to Virus-induced DNA Damage Signaling. *J. Mol. Biol.* **372,** 397–406 (2007).

327. Mamely, I. *et al.* Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr. Biol.* **16,** 1950–5 (2006).

328. Peschiaroli, A. *et al.* SCFβTrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response. *Mol. Cell* **23,** 319–329 (2006).

329. van Vugt, M. A. T. M. *et al.* A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* **8,** e1000287 (2010).

330. Vidanes, G. M. *et al.* CDC5 Inhibits the Hyperphosphorylation of the Checkpoint Kinase Rad53, Leading to Checkpoint Adaptation. *PLoS Biol.* **8,** e1000286 (2010).

331. Ando, K. *et al.* Polo-like Kinase 1 (Plk1) Inhibits p53 Function by Physical Interaction and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279,** 25549–25561 (2004).

332. Dias, S. S., Hogan, C., Ochocka, A.-M. & Meek, D. W. Polo-like kinase-1 phosphorylates MDM2 at Ser260 and stimulates MDM2-mediated p53 turnover. *FEBS Lett.* **583,** 3543–3548 (2009).

333. Cheung, C. H. A., Coumar, M. S., Hsieh, H.-P. & Chang, J.-Y. Aurora kinase inhibitors in preclinical and clinical testing. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18,** 379–398 (2009).

334. Xie, S., Xie, B., Lee, M. Y. & Dai, W. Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene* **24,** 277–286 (2005).

335. Chen, J. *et al.* Polo-like kinase 1 regulates mitotic arrest after UV irradiation through dephosphorylation of p53 and inducing p53 degradation. *FEBS Lett.* **580,** 3624–3630

(2006).

336. Wolf, G. *et al.* Prognostic signi®cance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. (1997).

337. Knecht, R. *et al.* Prognostic Significance of Polo-like Kinase (PLK) Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Cancer Res.* **59,** (1999).

338. Tokumitsu, Y. *et al.* Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int. J. Oncol.* **15,** 687–779 (1999).

339. Kneisel, L. *et al.* Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J. Cutan. Pathol.* **29,** 354–358 (2002).

340. Strebhardt K, Kneisel L, Linhart C, Bernd A & Kaufmann R. Prognostic Value of Pololike Kinase Expression in Melanomas. *JAMA* **283,** 481 (2000).

341. Knecht R, Oberhauser C, S. K. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int. J. Cancer* **35,** 1031–1033 (2000).

342. Wolf, G. *et al.* Polo-like Kinase: a Novel Marker of Proliferation: Correlation with Estrogen-receptor Expression in Human Breast Cancer. *Pathol. Res. Pr.* **196,** 753–759 (2000).

343. Macmillan, J. C., Hudson, J. W., Bull, S., Dennis, J. W. & Swallow, C. J. Comparative Expression of the Mitotic Regulators SAK and PLK in Colorectal Cancer. *Anllals Surg. Ollcology* **8,** 729–740 (2001).

344. Takai, N. *et al.* Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. (2001).

345. Takai, N. *et al.* Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. *2000*

346. van Vugt, M. A. T. M. & Medema, R. H. Checkpoint adaptation and recovery: back with Polo after the break. *Cell Cycle* **3,** 1383–6 (2004).

347. Luo, J. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* **137,** 835–48 (2009).

348. Liu, X., Lei, M. & Erikson, R. L. Normal Cells, but Not Cancer Cells, Survive Severe Plk1 Depletion. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 2093–2108 (2006).

349. Renner, A. G. *et al.* Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. *Blood* **114,** 659–

662 (2009).

350. Raab, M. *et al.* Toxicity modelling of Plk1-targeted therapies in genetically engineered mice and cultured primary mammalian cells. *Nat. Commun.* **2,** 395 (2011).

351. Sur, S. *et al.* A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106,** 3964–3969 (2009).

352. Degenhardt, Y. & Lampkin, T. Targeting Polo-like Kinase in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **16,** 384–389 (2010).

353. Guan, R. *et al.* Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res.* **65,** 2698–704 (2005).

354. King, S. I. *et al.* Immunohistochemical detection of Polo-like kinase-1 (PLK1) in primary breast cancer is associated with TP53 mutation and poor clinical outcom. *Breast Cancer Res.* **14,** R40 (2012).

355. Strebhardt, K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9,** 643–660 (2010).

356. Steegmaier, M. *et al.* BI 2536, a Potent and Selective Inhibitor of Polo-like Kinase 1, Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Curr. Biol.* **17,** 316–322 (2007).

357. Jimeno, A. *et al.* A Fine-Needle Aspirate-Based Vulnerability Assay Identifies Polo-Like Kinase 1 as a Mediator of Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **9,** 311–318 (2010).

358. Tyagi, S. *et al.* Polo-like kinase1 (Plk1) knockdown enhances cisplatin chemosensitivity via up-regulation of p73α in p53 mutant human epidermoid squamous carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **80,** 1326–1334 (2010).

359. Rödel, F. *et al.* Polo-like kinase 1 as predictive marker and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Am. J. Pathol.* **177,** 918–29 (2010).

360. Harris, P. S. *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibition suppresses cell growth and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells. *BMC Cancer* **12,** 80 (2012).

361. Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 530–41 (2007).

362. Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25,** 596–601 (2000).

363. Ptacek, J. *et al.* Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438,** 679–684 (2005).

364. Schleifenbaum, A., Stier, G., Gasch, A., Sattler, M. & Schultz, C. Genetically encoded FRET probe for PKC activity based on pleckstrin. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 11786–7 (2004).

365. Calleja, V. *et al.* Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation In Vivo. *PLoS Biol.* **5,** e95 (2007).

366. Fujioka, A. *et al.* Dynamics of the Ras/ERK MAPK Cascade as Monitored by Fluorescent Probes. *J. Biol. Chem.* **281,** 8917–8926 (2006).

367. Ingham, R. J. *et al.* WW Domains Provide a Platform for the Assembly of Multiprotein Networks. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 7092–7106 (2005).

368. Piljic?, A., de Diego, I., Wilmanns, M. & Schultz, C. Rapid Development of Genetically Encoded FRET Reporters. *ACS Chem. Biol.* **6,** 685–691 (2011).

369. Bertolin, G. *et al.* A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nat. Commun.* **7,** 12674 (2016).

370. Gheghiani, L. & Gavet, O. Deciphering the spatio-temporal regulation of entry and progression through mitosis. *Biotechnol. J.* **9,** (2014).

371. Prével, C., Pellerano, M., Van, T. N. N. & Morris, M. C. Fluorescent biosensors for high throughput screening of protein kinase inhibitors. *Biotechnol. J.* **9,** 253–265 (2014).

372. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. & Medema René H. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. (2009).

373. Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I. & Pines, J. Cdc25B and Cdc25C Differ Markedly in their Properties as Initiators of Mitosis. *J. Cell Biol.* **146,** 573–583 (1999).

374. Gheghiani, L., Loew, D., Lombard, B., Mansfeld, J. & Gavet, O. PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis. *Cell Rep.* **19,** 2060–2073 (2017).

375. Gheghiani, L. & Gavet, O. *Spatiotemporal investigation of phosphorylation events during cell cycle progression*. *Methods in Molecular Biology* **1342,** (2016).

376. Marumoto, T. *et al.* Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes to Cells* **7,** 1173–1182 (2002).

377. Goedhart, J. *et al.* Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* **3,** 751 (2012).

378. Goedhart, J. *et al.* Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods* **7,** 137–9 (2010).

379. Manfredi, M. G. *et al.* Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. (2006).

380. Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. & Conti, E. Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. *Mol. Cell* **12,** 851–862 (2003).

381. Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. & Sen, S. Interaction and Feedback Regulation between STK15/BTAK/Aurora-A Kinase and Protein Phosphatase 1 through Mitotic Cell Division Cycle. *J. Biol. Chem.* **276,** 46219–46224 (2001).

382. Horn, V. *et al.* Functional interaction of Aurora-A and PP2A during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **18,** 1233–41 (2007).

383. Hammond, D. *et al.* Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J. Cell Sci.* **126,** 3429–40 (2013).

384. Zeng, K., Bastos, R. N., Barr, F. A. & Gruneberg, U. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J. Cell Biol.* **191,** 1315–1332 (2010).

385. Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G. & Maller, J. L. A Novel Mechanism for Activation of the Protein Kinase Aurora A. *Curr. Biol.* **52,** 507–513 (2003).

386. Joukov, V., Walter, J. & Nicolo, A. De. The Cep192-organized Aurora A-Plk1 cascade is essential for centrosome cycle and bipolar spindle assembly V. *NIH Public Access* **55,** 759–785 (2014).

387. Hirota, T. *et al.* Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* **114,** 585–598 (2003).

388. Reboutier, D., Troadec, M. B., Cremet, J. Y., Fukasawa, K. & Prigent, C. Nucleophosmin/B23 activates aurora a at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J. Cell Biol.* **197,** 19–26 (2012).

389. Van Horn, R. D. *et al.* Cdk1 activity is required for mitotic activation of Aurora A during G 2/M transition of human cells. *J. Biol. Chem.* **285,** 21849–21857 (2010).

390. Aspinall Claire F., Daniella Zheleva, Anthony Tighe & Stephen S. Taylor. Mitotic entry: Non-genetic heterogeneity exposes the requirement for Plk1. (2015).

391. Gilmartin, A. G. *et al.* Distinct concentration-dependent effects of the polo-like kinase 1-specific inhibitor GSK461364A, including differential effect on apoptosis. *Cancer Res.* **69,** 6969–77 (2009).

392. Burkard, M. E. *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. U. S. A.* **104,** 4383–8 (2007).

393. Bruinsma, W. *et al.* Spatial Separation of Plk1 Phosphorylation and Activity. *Front. Oncol.* **5,** 132 (2015).

394. 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.* **278,** 25277–80 (2003).

395. Liu, D., Davydenko, O. & Lampson, M. A. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore?microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* **198,** 491–499 (2012).

396. Hara, K., Tydeman, P. & Kirschner, M. A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in Xenopus eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77,** 462–6 (1980).

397. Ferguson, A. M. *et al.* Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases. **25,** 2853–2860 (2005).

398. Abrieu, A. *et al.* 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.* **1757,** 1751–7 (1998).

399. Coulonval, K., Bockstaele, L., Paternot, S. & Roger, P. P. Phosphorylations of Cyclin-dependent Kinase 2 Revisited Using Two-dimensional Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **278,** 52052–52060 (2003).

400. Hirai, H. *et al.* Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol. Cancer Ther.* **8,** 2992–3000 (2009).

401. Pagliuca, F. W. *et al.* Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery. *Mol. Cell* **43,** 406–17 (2011).

402. Daub, H. *et al.* Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *Mol. Cell* **31,** 438–448 (2008).

403. Oppermann, F. S. *et al.* Combination of Chemical Genetics and Phosphoproteomics for Kinase Signaling Analysis Enables Confident Identification of Cellular Downstream Targets. *Mol. Cell. Proteomics* **11,** O111.012351-O111.012351 (2012).

404. Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 10762–7 (2008).

405. Walter, a O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. & Lees, E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* **19,** 4906–4916 (2000).

406. Littlepage, L. E. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99,** 15440–15445 (2002).

407. Kwon, Y. G., Lee, S. Y., Choi, Y., Greengard, P. & Nairn, A. C. Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94,** 2168–2173 (1997).

408. Okumura, E. *et al.* Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a greatwall kinase-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **204,** 881–889 (2014).